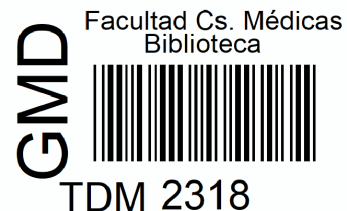




**UNR** Universidad  
Nacional de Rosario



Facultad de Ciencias Médicas  
Doctorado en Ciencias Biomédicas  
Tesis doctoral

**“DESARROLLO DE MATRICES POLIMÉRICAS PARA  
EL TRANSPORTE Y CONTROL DE LA LIBERACIÓN DE  
FÁRMACOS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA”**

Presentada por Lic. Guillermo Iván Tejada Jacob

Dirección: Dr. Darío Leonardi

Co-dirección: Dra. María Celina Lamas

Instituto de Química Rosario (IQUIR-CONICET)

Rosario, Santa Fe, Argentina

-2020-



# AGRADECIMIENTOS

*Quisiera agradecer a todas las personas e instituciones que de alguna forma me han ayudado durante la realización de esta Tesis:*

*En primer lugar agradecer a mis directores Celina y Darío, quienes desde el primer han confiado en mí, permitiéndome trabajar junto a ellos, han dedicado tiempo en la dirección de esta Tesis, su paciencia y quienes encontré mucha contención y apoyo.*

*A Claudio, por permitirme trabajar en su laboratorio, utilizar el equipamiento del laboratorio.*

*A Gabi, Dani, Agus, Rene y Silvina quienes han compartido sus conocimientos conmigo y las charlas de almuerzo.*

*A Nati, por estar siempre para darme consejos, corregirme, enseñarme día a día y que ha convertido las horas de trabajo en el laboratorio más ameno.*

*A Jose y Mavi, por su contención y compañerismo dentro y fuera del laboratorio, quienes siempre estuvieron dispuestas a darme una mano.*

*A Gise, quien me ha acompañado en este tramo de doctorado.*

*A Maxi y Laura, por su buena predisposición y que han colaborado en los ensayos antifúngicos in vitro en este trabajo.*

*A Vera Álvarez, por su calidez humana, brindarme sus conocimientos y recibirme en el grupo CoMP en mis estadías de investigación en el INTEMA.*

*A Verónica Lasalle, por permitirme realizar una estadía de investigación en el Departamento de Química de la Universidad Nacional del Sur.*

*Al Dr. Alfredo Rigalli, por darme contención y consejos desde el primer momento que me reuní y motivarme a realizar el doctorado en Cs Biomédicas.*

*A la Facultad de Ciencias Médicas por abrirme las puertas y poder realizar mi doctorado durante este tiempo.*

*A la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas por formarme desde mí ingreso a la universidad pública hasta poder finalizar mi carrera de grado en Licenciatura en Química.*

*A los docentes de ambas Facultades, los cuales me llevo muchos consejos, aprendizaje y permitieron poder formarme tanto académicamente como personalmente.*

*Al Instituto de Química de Rosario, por abrirme sus puertas y brindarme acceso al equipamiento.*

*Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por otorgarme la beca para la culminación de este trabajo de Tesis doctoral.*

*A mis amigos, Ariel, Fede, Facu, Negra, Pini, Mel, Luchi, Pablo, Anto, Meli, Juli, Agus, Yami O., Yami M., Bruno, Nico, Mati y pela por estar siempre presentes y en todo momento.*

*A Leyla y Astor, dos miembros de la familia que ya no están pero han estado siempre a lado mío estudiando a la par.*

*A mi hermana, Virginia, que admiro un montón, que me ha dado muchísima contención, me ha brindado sus consejos, sus palabras inspiradoras y que siempre estuvo ahí para ayudarme en todo.*

*A mi cuñado Seba, que hoy además es mi amigo, quien compartí muchos momentos y aprendí mucho de sus consejos.*

*A mis padres por estar siempre presentes, enseñarme a no rendirme nunca y motivarme a siempre seguir formándome tanto como profesional y como persona.*

*A todos MUCHAS GRACIAS!!*

# ÍNDICE

<b>INDICE</b> .....	I
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	IX
<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	XIII
<b>ABREVIATURAS Y SIMBOLOS</b> .....	XIV
<b>PUBLICACIONES CIENTIFICAS ORIGINADAS A PARTIR DE ESTE TRABAJO DE TESIS</b> .....	XVII
<b>PRESENTACIONES A REUNIONES CIENTIFICAS</b> .....	XVIII
<b>RESUMEN</b> .....	XXI
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	1
Candidiasis.....	1
Candidiasis bucofaríngea.....	1
Tratamiento de la candidiasis bucofaríngea.....	2
Mecanismo de acción del nitrato de miconazol.....	3
Formulaciones farmacéuticas, principio activo y excipientes.....	3
Vías de administración.....	3
Liberación de los IFAs de las formulaciones farmacéuticas.....	4
Matrices poliméricas mucoadhesivas.....	5
Polímeros comúnmente utilizados en la formulación de matrices poliméricas mucoadhesivas.....	6
Quitosano.....	6
Pectina.....	7
Hidroxipropil metilcelulosa.....	7
Goma arábica.....	8
Gelatina.....	9
Carbopol.....	10
Alginato.....	11

Carragenatos.....	11
Polietilenglicol.....	12
<b>HIPOTESIS SUSTANTIVA.....</b>	<b>14</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>14</b>
<b>CAPITULO I: “Formulación de matrices poliméricas mucoadhesivas basadas en la interacción polimérica catiónica-aniónica y catiónica-no iónica”.....</b>	<b>15</b>
<b>OBJETIVOS ESPECIFICOS.....</b>	<b>16</b>
<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>17</b>
Materiales.....	17
Métodos.....	17
Preparación de las matrices.....	17
Caracterización de los sistemas.....	18
Espesor.....	18
Resistencia al plegamiento.....	18
Propiedades mecánicas.....	19
Adhesividad <i>in vitro</i> .....	20
Índice de hinchamiento.....	22
Espectroscopía infrarroja.....	22
Microscopía electrónica de barrido.....	22
Calorimetría diferencial de barrido.....	23
Difracción de rayos X.....	23
Estudio de disolución del IFA y liberación desde los sistemas.....	23
Actividad <i>in vitro</i> .....	24
Microorganismos y medios de cultivo.....	24
Halo de inhibición.....	24
Análisis estadístico.....	25
<b>RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>	<b>26</b>

Espesor de las matrices, resistencia al plegamiento, resistencia a la tracción y elongación.....	26
Adhesividad <i>in vitro</i> .....	29
Índice de hinchamiento.....	30
Espectroscopía infrarroja.....	31
Microscopía electrónica de barrido.....	32
Calorimetría diferencial de barrido.....	34
Difracción de rayos X.....	35
Estudio de disolución del IFA y liberación desde los sistemas.....	36
Actividad <i>in vitro</i> – Halo de inhibición .....	38
Selección de una potencial formulación de aplicación bucal.....	39
<b>CONCLUSIONES</b> .....	41

**CAPITULO II: “Formulación de matrices poliméricas mucoadhesivas basadas en las interacciones de un polímero catiónico y distintos polímeros aniónicos con diferentes densidades de carga” .....**

<b>CONSIDERACIONES GENERALES PARA EL PRESENTE</b>	
<b>CAPITULO</b> .....	44
<b>OBJETIVOS ESPECIFICOS</b> .....	44
<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	45
Materiales.....	45
Métodos.....	45
Preparación de las matrices.....	45
Caracterización de los sistemas.....	46
Espesor.....	46
Resistencia al plegamiento.....	46
Propiedades mecánicas.....	46
Adhesividad <i>in vitro</i> .....	46

Índice de hinchamiento.....	46
Espectroscopía infrarroja.....	46
Microscopía electrónica de barrido.....	46
Difracción de rayos X.....	46
Estudio de disolución del IFA y liberación desde los sistemas.....	46
Actividad <i>in vitro</i> – Halo de inhibición .....	46
Análisis térmico diferencial.....	46
<b>RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>	<b>48</b>
Espesor de las formulaciones, resistencia al plegamiento y propiedades mecánicas.....	48
Adhesividad <i>in vitro</i> .....	50
Índice de hinchamiento.....	51
Microscopía electrónica de barrido.....	53
Espectroscopía infrarroja.....	55
Análisis térmico diferencial.....	57
Difracción de rayos X.....	59
Estudio de disolución del IFA y liberación desde los sistemas.....	61
Actividad <i>in vitro</i> – Halo de inhibición.....	62
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>65</b>
<b>CAPITULO III: “Efecto de la incorporación del NM, suspendido o previamente solubilizado, en las características de las matrices poliméricas”.....</b>	<b>66</b>
<b>CONSIDERACIONES GENERALES PARA EL PRESENTE CAPITULO.....</b>	<b>67</b>
<b>OBJETIVOS ESPECIFICOS.....</b>	<b>67</b>
<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>68</b>
Materiales.....	68
Métodos.....	68

Preparación de las matrices.....	68
Caracterización de los sistemas.....	70
Espesor.....	70
Resistencia al plegamiento.....	70
Propiedades mecánicas.....	70
Adhesividad <i>in vitro</i> .....	70
Índice de hinchamiento.....	70
Microscopía electrónica de barrido.....	70
Difracción de rayos X.....	70
Estudio de disolución del IFA y liberación desde los sistemas.....	70
Actividad <i>in vitro</i> – Halo de inhibición.....	70
Microscopía óptica.....	70
Análisis térmicos.....	71
Actividad <i>in vitro</i> – Tiempo de muerte.....	71
<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b> .....	<b>72</b>
Espesor y resistencia al plegamiento.....	72
Propiedades mecánicas.....	73
Microscopía óptica.....	76
Adhesividad <i>in vitro</i> .....	78
Índice de hinchamiento.....	79
Microscopía electrónica de barrido.....	82
Difracción de rayos X.....	84
Análisis térmicos.....	86
Estudio de disolución del IFA y liberación desde los sistemas.....	88
Actividad <i>in vitro</i> – Halos de inhibición.....	90
Actividad <i>in vitro</i> – Tiempo de muerte.....	91
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>93</b>

<b>CAPITULO IV: “Formulación de discos microparticulados”</b> .....	95
<b>CONSIDERACIONES GENERALES PARA EL PRESENTE</b>	
<b>CAPITULO</b> .....	96
<b>OBJETIVOS ESPECIFICOS</b> .....	96
<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	97
Materiales .....	97
Métodos .....	97
Secado por aspersion .....	97
Preparación de micropartículas y discos microparticulados .....	98
Caracterización de las micropartículas .....	99
Eficacia de encapsulamiento .....	99
Estudio de disolución del IFA y liberación desde los sistemas .....	100
Tiempo de residencia <i>in vitro</i> .....	100
Análisis de morfológico y determinación de tamaño mediante microscopía electrónica de barrido .....	101
Espectroscopía infrarroja .....	102
Análisis térmicos .....	102
Difracción de rayos X .....	102
Actividad <i>in vitro</i> – Halos de inhibición en función del tiempo .....	103
<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b> .....	104
Eficacia de encapsulamiento y estudios de disolución .....	104
Tiempo de residencia <i>in vitro</i> .....	105
Análisis de morfológico y determinación de tamaño mediante microscopía electrónica de barrido .....	105
Espectroscopía infrarroja .....	107
Análisis térmicos .....	109
Difracción de rayos X .....	113
Actividad <i>in vitro</i> – Halo de inhibición en función del tiempo .....	116
<b>CONCLUSIONES</b> .....	118

<b>CAPITULO V: “Formulación de sistemas poliméricos nanoparticulados”</b> .....	119
<b>CONSIDERACIONES GENERALES PARA EL PRESENTE</b>	
<b>CAPITULO</b> .....	120
<b>OBJETIVOS ESPECIFICOS</b> .....	120
<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	121
Materiales.....	121
Métodos.....	121
Preparación de las nanopartículas.....	121
Caracterización de las nanopartículas.....	122
Eficacia de encapsulamiento.....	122
Potencial Zeta, determinación de tamaño e índice de polidispersidad.....	123
Difracción de rayos X.....	123
Estudio de disolución del IFAs y liberación desde los sistemas.....	124
Actividad <i>in vitro</i> mediante el método de microdilución en caldo.....	124
Preparación de soluciones madre.....	124
Evaluación de la concentración inhibitoria mínima.....	124
Actividad <i>in vitro</i> - Determinación de la concentración fungicida mínima.....	126
Actividad <i>in vitro</i> – Halo de inhibición en función del tiempo.....	126
<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b> .....	127
Eficacia de encapsulamiento, potencial zeta, determinación de tamaño e índice de polidispersidad.....	127
Difracción de rayos X.....	128
Estudio de disolución del IFAs y liberación desde los sistemas.....	131
Actividad <i>in vitro</i> – Determinación de la CIM y CFM.....	133
Actividad <i>in vitro</i> – Halo de inhibición en función del tiempo.....	134
<b>CONCLUSIONES</b> .....	136
<b>CONCLUSIONES FINALES Y PROYECCIONES A FUTURO</b> .....	137

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....139**

# INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura química del nitrato de miconazol.....	2
<b>Figura 2.</b> Estructura química del quitosano.....	6
<b>Figura 3.</b> Estructura química de la pectina.....	7
<b>Figura 4.</b> Estructura química de la hidroxipropil metilcelulosa.....	8
<b>Figura 5.</b> Estructura química de la goma arábica.....	9
<b>Figura 6.</b> Estructura química de la gelatina.....	10
<b>Figura 7.</b> Estructura química del carbopol.....	10
<b>Figura 8.</b> Estructura química del alginato.....	11
<b>Figura 9.</b> Estructura química de los carragenatos: a) $\kappa$ -, b) $\iota$ - y c) $\lambda$ -.....	12
<b>Figura 10.</b> Estructura química del polietilenglicol 400.....	13
<b>Figura 11.</b> Esquema de un micrómetro digital midiendo una matriz.....	18
<b>Figura 12.</b> Plegamiento de las matrices.....	19
<b>Figura 13.</b> Esquema de preparación de las matrices para ensayo de tracción.....	19
<b>Figura 14.</b> Determinación de tracción y elongación de las matrices, empleando una maquina universal Instron.....	20
<b>Figura 15.</b> Maquina universal Instron adaptada para ensayo de adhesividad.....	21
<b>Figura 16.</b> Índice de hinchamiento de las matrices en saliva artificial a 37 °C.....	31
<b>Figura 17.</b> Espectros IR de las matrices poliméricas.....	32
<b>Figura 18.</b> Microscopía electrónica de barrido. A) NM, B) Q, C) HPMC, D) PC, E-F) Vista superficial de las matrices E) Q-HPMC, F) Q-PC); G-H) Corte transversal de las matrices G) Q-HPMC, H) Q-PC .....	33
<b>Figura 19.</b> Curvas de CDB para el NM y las formulaciones poliméricas.....	35
<b>Figura 20.</b> Difractogramas del NM y las formulaciones poliméricas.....	36
<b>Figura 21.</b> Ensayo de disolución del NM y las formulaciones desarrolladas en 900 mL de agua destilada conteniendo 1% v/v de PEG 400 a 37 °C.....	37
<b>Figura 22.</b> Caracterización de las formulaciones: A) Espesor, B) Resistencia a la tracción y C) Elongación.....	49
<b>Figura 23.</b> Adhesividad <i>in vitro</i> de las diferentes formulaciones.....	51
<b>Figura 24.</b> Índice de hinchamiento de las diferentes formulaciones.....	52
<b>Figura 25.</b> Relación entre la adhesividad y el índice de hinchamiento a los 5 min.....	53

<b>Figura 26.</b> Microscopía electrónica de barrido. A) NM, B) Q, C) GEL, D) GA, E) CB, F) ALG, G) Sección superficial de las matrices G) Q-GEL, H) Q-GA, I) Q-CB y J) Q-ALG.....	54
<b>Figura 27.</b> Espectros IR de los polímeros de partida y las formulaciones poliméricas.....	57
<b>Figura 28.</b> Análisis térmico diferencial para el NM, los polímeros y las diferentes formulaciones poliméricas.....	58
<b>Figura 29.</b> Difractogramas del NM, los polímeros y formulaciones poliméricas....	60
<b>Figura 30.</b> A) Halos de inhibición para el cultivo de <i>C. glabrata</i> B) Comparación entre las actividades antifúngicas del NM, Q sin fármaco, Q-GEL-NM y Q-CB-NM...	64
<b>Figura 31.</b> Espesor de las diferentes formulaciones.....	73
<b>Figura 32.</b> Resistencia a la tracción de las diferentes formulaciones.....	74
<b>Figura 33.</b> Porcentaje de elongación de las diferentes formulaciones.....	75
<b>Figura 34.</b> Morfología de la superficie de las matrices. A) Q, B) $\kappa$ -C, C) $\iota$ -C, D) $\lambda$ -C, A1) Q-NM-SUS, B1) $\kappa$ -C-NM-SUS, C1): $\iota$ -C-NM-SUS, D1) $\lambda$ -C-NM-SUS, A2) Q-NM-SOL, B2) $\kappa$ -C-NM-SOL, C2) $\iota$ -C-NM-SOL, D2) $\lambda$ -C-NM-SOL, E) Q- $\kappa$ -C, F) Q- $\iota$ -C, G) Q- $\lambda$ -C, E1) Q- $\kappa$ -C-NM-SUS, F1) Q- $\iota$ -C-NM-SUS, G1): Q- $\lambda$ -C-NM-SUS, E2) Q- $\kappa$ -C-NM-SOL, F2) Q- $\iota$ -C-NM-SOL, G2) Q- $\lambda$ -C-NM-SOL.....	77
<b>Figura 35.</b> Adhesividad de las formulaciones seleccionadas.....	79
<b>Figura 36.</b> Índice de hinchamiento de las formulaciones seleccionadas sin IFA y con NM suspendido y solubilizado. A) Q, B) Q- $\kappa$ -C y C) Q- $\lambda$ -C.....	81
<b>Figura 37.</b> Microscopía electrónica de barrido: A) NM, B) $\kappa$ -C, C) Q, D) $\lambda$ -C, E)-H) secciones superficiales de las formulaciones, E) y G) Q- $\kappa$ -C-NM-SOL, F) y H) Q- $\lambda$ -C-NM-SOL, I) : cristal de NM en Q- $\kappa$ -C-NM-SUS y J) cristal de NM en Q- $\lambda$ -C-NM-SUS..	83
<b>Figura 38.</b> Difractogramas del NM, los polímeros formadores de matriz y las diferentes formulaciones.....	84
<b>Figura 39.</b> Curvas de ATG (A y B) y ATGD (C y D). A) y C) NM, polímeros formadores de matriz y formulaciones de Q- $\kappa$ -C. B) y D) NM, polímeros formadores de matriz y formulaciones de Q- $\lambda$ -C.....	86
<b>Figura 40.</b> Curvas de CDB del NM y las formulaciones poliméricas basadas en Q- $\lambda$ -C y Q- $\kappa$ -C.....	88
<b>Figura 41.</b> Liberación acumulada (%) del NM y las formulaciones seleccionadas.	89

<b>Figura 42.</b> Halos de inhibición producidos por las formulaciones seleccionadas en cepas de <i>C. albicans</i> .....	91
<b>Figura 43.</b> Tiempo de muerte para el NM, Q y las formulaciones seleccionadas....	92
<b>Figura 44.</b> Esquema del proceso de secado por aspersion.....	98
<b>Figura 45.</b> Método de compresión de los sistemas para obtener discos microparticulados.....	99
<b>Figura 46.</b> Esquema del aparato de desintegración USP modificado.....	101
<b>Figura 47.</b> Microscopía electrónica de barrido e histograma de tamaño de partículas del: A) NM y B-G) micropartículas cargadas: B) Q, C) GEL, D) HPMC, E) Q-GEL, F) Q-HPMC y G) HPMC-GEL.....	107
<b>Figura 48.</b> Espectros infrarrojos del NM, polímeros formadores de matriz y micropartículas cargadas y descargadas.....	108
<b>Figura 49.</b> Espectros infrarrojos de Q, HPMC, GEL y micropartículas basadas en combinaciones de polímeros.....	109
<b>Figura 50.</b> Curvas de ATG de los sistemas desarrollados: A) Q, B) GEL, C) HPMC, D) Q-GEL, E) Q-HPMC y F) HPMC-GEL.....	111
<b>Figura 51.</b> Curvas de ATGD de los sistemas desarrollados: A) Q, B) GEL, C) HPMC, D) Q-GEL, E) Q-HPMC y F) HPMC-GEL.....	112
<b>Figura 52.</b> Difractogramas del NM y de los sistemas desarrollados: A) Q, B) GEL, C) HPMC.....	114
<b>Figura 53.</b> Difractogramas del NM y de los sistemas desarrollados: A) Q-GEL, B) Q-HPMC y C) HPMC-GEL.....	115
<b>Figura 54.</b> Halos de inhibición producidos por los diferentes sistemas desarrollados.....	117
<b>Figura 55.</b> Preparación de las microplacas de 96 pocillos para la determinación de la CIM de los sistemas siguiendo los lineamientos del CLSI.....	125
<b>Figura 56.</b> Difractogramas de: A) NM, polímeros de partida y las nanopartículas cargadas con este IFA y B) CHLID y los sistemas, polímeros de partida y las nanopartículas cargadas con este IFA.....	130
<b>Figura 57.</b> Ensayo de velocidad disolución de: A) CHLID y nanosistemas cargados con CHLID, B) NM y nanosistemas cargados con NM en saliva artificial, C) NM y nanosistemas cargados con NM en LSS 1% p/v.....	132

**Figura 58.** Halos de inhibición producidos por los diferentes sistemas desarrollados.....135

# INDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Composición de las formulaciones y resultados de los ensayos de espesor, resistencia a la tracción, elongación y plegamiento.....	27
<b>Tabla II.</b> Composición de las formulaciones y resultados de adhesividad.....	29
<b>Tabla III.</b> Halos de inhibición(en mm) producidos por las distintas formulaciones en cepas de <i>Candida</i> .....	38
<b>Tabla IV.</b> Composición de las formulaciones cargadas con NM (2% p/p).....	46
<b>Tabla V.</b> Valores de liberación del fármaco después de 30, 60, 90 y 120 min.....	61
<b>Tabla VI.</b> Halos de inhibición(en mm) producidos por las distintas formulaciones en cepas de <i>Candida</i> .....	63
<b>Tabla VII.</b> Composición de las formulaciones.....	69
<b>Tabla VIII.</b> Propiedades del NM y los sistemas microparticulados estudiados.....	106
<b>Tabla IX.</b> Temperaturas de fusión obtenidos por CDB para todos los sistemas estudiados.....	113
<b>Tabla X.</b> Composición de las nanopartículas desarrolladas.....	122
<b>Tabla XI.</b> Propiedades de los sistemas nanoparticulados estudiados.....	128
<b>Tabla XII.</b> Valores de CIM <sub>100</sub> , CIM <sub>50</sub> y las CFM de los sistemas nanoparticulados y el NM.....	134

# ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

ALG	Alginato
ANMAT	Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica
ATCC	Coleccion Americana de cultivos tipo (del inglés American Type Culture Collection)
ATD	Análisis térmico diferencial
ATG	Análisis termogravimétrico
ATGD	Análisis termogravimétrico derivado
ATR	Reflectancia total atenuada
C	Carragenato
CB	Carbopol
CCC	Colección de Cultivos del Centro de Referencia de Micología
CDB	Calorimetría diferencial de barrido
CHLID	Clorhidrato de lidocaína
CFM	Concentración fungicida mínima
CIM	Concentración inhibitoria mínima
CLSI	Instituto de estándares Clínicos y de Laboratorio (del inglés, The Clinical and Laboratory Standards Institute)
DE	Desvío estándar
DM	Grado de metoxilación
DMSO	Dimetilsulfoxido
DRX	Difracción de rayos X
EE	Eficacia de encapsulamiento

g	gramo (s)
GA	Goma arábica
GEL	Gelatina
h	horas (s)
HR	Humedad relativa
HPMC	Hidroxipropil metilcelulosa
IFA	Ingrediente farmacéutico activo
IR	Espectroscopía infrarroja
Kv	kilo volt (s)
MEB	Microscopía electrónica de barrido
mA	mili amper (s)
mg	mili gramo (s)
min	minuto (s)
mL	mililitro (s)
mm	milímetro (s)
Mps	Micropartículas
mTorr	mili torrecelli (s)
N	Newton
NM	Nitrato de miconazol
Nps	Nanopartículas
PEG 400	Polietilenglicol 400
PC	Pectina
Q	Quitosano

Q <sub>30</sub>	Porcentaje del ingrediente farmacéutico activo disuelto, medido a los 30 minutos del ensayo de velocidad de disolución
s	segundo (s)
T <sub>f</sub>	Temperatura de fusión
UFC	Unidades formadoras de colonias
µmg	micro gramo (s)
USP	Farmacopea de los Estados Unidos (del inglés, United States Pharmacopeia)

# **PUBLICACIONES CIENTÍFICAS ORIGINADAS A PARTIR DE ESTE TRABAJO DE TESIS**

1. Capítulo I: “Development and Evaluation of Buccal Films Based on Chitosan for the Potential Treatment of Oral Candidiasis”. **TEJADA, G.**; BARRERA M.G.; PICCIRILLI G.N.; SORTINO M.; FRATTINI A.; SALOMÓN C.J.; LAMAS M.C.; LEONARDI D. **AAPS PHARMSCITECH**, 18(4), 936-946, **2017**. ISSN 1530-9932.
2. Capítulo II: “Formulation and *in-vitro* efficacy of antifungal mucoadhesive polymeric matrices for the delivery of miconazole nitrate”. **TEJADA, G.**; PICCIRILLI, G.N.; SORTINO, M.; SALOMÓN, C.J.; LAMAS, M.C.; LEONARDI, D. **MATERIALS SCIENCE & ENGINEERING. C, BIOMIMETIC MATERIALS, SENSORS AND SYSTEMS**, 79, 140-150, **2017**. ISSN 0928-4931.
3. Capítulo III: “Effect of drug incorporation technique and polymer combination on the performance of biopolymeric antifungal buccal films”. **TEJADA, G.**; LAMAS, M.C; SVETAZ, L.; SALOMÓN, C.J.; ALVAREZ, V.A.; LEONARDI D. **INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS**, 548(1), 431-442, **2018**. ISSN 0378-5173.
4. Capítulo IV: “Composite microparticles based of natural mucoadhesive polymers with promising structural properties to protect and improve the antifungal activity of miconazole nitrate”. **TEJADA G.**; LAMAS, M.C.; SORTINO, M.; ALVAREZ, V.A.; LEONARDI, D. **AAPS PHARMSCITECH**, 19(8), 3712-3722, **2018**. ISSN 1530-9932.
5. Capítulo V: “Nanoparticulated Systems Based on Natural Mucoadhesive Polymers Loaded with Miconazole Nitrate and lidocaine chlorhydrate for the treatment of topical candidiasis.” **TEJADA G.**; GARCÍA, P.; SVETAZ, I.; LASSALLE, V.; ALVAREZ, V.A.; LAMAS, M.C.; LEONARDI, D., enviado para su publicación en el **INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS**. (Diciembre **2019**)

# PRESENTACIONES A REUNIONES CIENTÍFICAS

## Congresos Internacionales

1. *“Formulation and evaluation of mucoadhesive buccal films based on chitosan/hydroxypropylmethylcellulose and chitosan/pectin”*. **TEJADA JACOB, G.**, BARRERA, M.G., PICCIRILLI, G., SORTINO, M., FRATINI, A., SALOMÓN, C., LAMAS, M.C., LEONARDI, D. Presentado en la 4° Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICiFa) en el mes de Octubre en la Ciudad de Rosario, Santa Fe, **2016**
2. *“Development and characterization of biodegradable microparticles based on natural mucoadhesive polymers and miconazole nitrate”*. **TEJADA JACOB, G.**, SORTINO, M., ALVAREZ, V., LAMAS, M.C., LEONARDI, D. Presentado en el XVI Latin American Polymer Symposium (SLAP) en el mes de noviembre en la Ciudad de Mar del Plata, Buenos Aires, **2018**
3. *“Desarrollo y caracterización de micropartículas biodegradables basadas en polímeros naturales cargadas con nitrato de miconazol”*. **TEJADA JACOB, G.**, BARRERA, M.G., SORTINO, M., ALVAREZ, V., LAMAS, M.C., LEONARDI, D. Presentado en la 5° Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICiFa) en el mes de noviembre en la Ciudad de La Punta, San Luis, **2018**
4. *“Desarrollo y caracterización de sistemas nanoparticulados cargados con nitrato de miconazol”*. **TEJADA JACOB, G.**, LASSALLE, V., ALVAREZ, V., SORTINO, M., LAMAS, M.C., LEONARDI, D. Presentado en la IX Escuela Internacional NanoAndes en el mes de octubre en la Ciudad de Santiago, Chile, **2019**

## Congresos Nacionales

1. *“Evaluación in vitro de películas bucales mucoadhesivas basadas en Qitosano/Pectina”*. **TEJADA JACOB, G.**, SORTINO M., PICCIRILLI, G., LAMAS, M.C., LEONARDI, D. Presentado en el 9° Congreso ETIF 2016 en el mes de octubre en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, **2016**
2. *“Evaluación de las propiedades de matrices mucoadhesivas de quitosano”*. **TEJADA JACOB, G.**, OTTAVIANO, N., LEONARDI, D., BARRERA, M.G. Presentado en la X Jornada de Ciencia y Tecnología en el mes de octubre en la Ciudad de Rosario, Santa Fe, **2016**
3. *“Formulación de matrices poliméricas mucoadhesivas con actividad antifúngica basadas en quitosano/hidroxipropil metilcelulosa”*. **TEJADA JACOB, G.**, BARRERA, M.G., PICCIRILLI, G., SORTINO, M., LAMAS, M.C., LEONARDI, D. Presentado en el XVIII Congreso y XXXVI Reunión Anual Sociedad de Biología en el mes de noviembre en la Ciudad de Rosario, Santa Fe, **2016**
4. *“Caracterización de tres formulaciones de películas bucales mucoadhesivas con actividad antifúngica basadas en quitosano/carbopol”*. **TEJADA JACOB, G.**, SORTINO, M., LAMAS, M.C., LEONARDI, D. Presentado en las 4tas Jornadas Profesionales Farmacéuticas en el mes de junio en Termas de Rio Hondo, Santiago del Estero, **2017**
5. *“Desarrollo y caracterización de películas bucales mucoadhesivas basadas en quitosano para el tratamiento potencial de la candidiasis oral”*. **TEJADA JACOB, G.**, SORTINO, M., LAMAS, M.C., LEONARDI, D. Presentado en las XIII Jornadas de Farmacia y Bioquímica Industrial en el mes de agosto en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, **2017**
6. *“Desarrollo y caracterización de sistemas nanoparticulados conteniendo nitrato de miconazol”*. **TEJADA JACOB, G.**, LASSALLE, V., ALVAREZ, V., SORTINO, M., LAMAS, M.C., LEONARDI, D. Presentado en 6tas Jornadas

Profesionales Farmacéuticas en el mes de junio en Mar del Plata, Buenos Aires, **2019**

7. *“Desarrollo de nanopartículas con actividad antifúngica para el potencial tratamiento de micosis bucales”*. **TEJADA JACOB, G.**, SORTINO, M., GARCIA, P., LAMAS, M.C., LEONARDI, D., LASSALLE, V., ALVAREZ, V. Presentado en el XIII Simposio Argentino de Polímeros (SAP) en el mes de octubre en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, **2019**

# RESUMEN

La candidiasis bucofaríngea es la infección oportunista que afecta más fácilmente a pacientes con inmunodeficiencias adquiridas (VIH-Sida), y a aquellos sometidos a quimioterapia. Esta patología es tratada comúnmente por vía oral con comprimidos antifúngicos y por vía tópica empleando buches de nistatina o gel de nitrato de miconazol (NM). Formulaciones como los buches y los geles requieren varias aplicaciones diarias ya que se eliminan fácilmente por la saliva. Una alternativa al tratamiento tópico mencionado, podría basarse en matrices poliméricas de aplicación bucal, de pequeño tamaño y espesor, las cuales presentarían flexibilidad, fácil aplicación y permitirían la adhesión en el sitio de acción reduciendo el número de aplicaciones diarias y podrían llevar a un mejor cumplimiento del tratamiento por parte de los pacientes.

El objetivo de este trabajo de Tesis, fue desarrollar y caracterizar matrices poliméricas basadas en combinaciones de polímeros mucoadhesivos catiónicos, aniónicos y no iónicos, cargadas con nitrato de miconazol. Las matrices poliméricas se caracterizaron en términos de propiedades mecánicas, adhesividad e hinchamiento, así como liberación de fármaco. Las diferentes formulaciones fueron investigadas mediante microscopía electrónica de barrido (MEB); las interacciones entre polímeros se analizaron mediante espectroscopía infrarroja (IR) y la estructura cristalina de los fármacos fue estudiada por difracción de rayos X (DRX). Por último, se investigó la actividad antifúngica de las formulaciones, empleando para ello cultivos de diferentes patógenos oportunistas fúngicos pertenecientes al género *Candida*.

En una primera parte (Capítulo I) se utilizaron quitosano (Q), pectina (PC) e hidroxipropil metilcelulosa (HPMC) para formar las matrices poliméricas. Se encontró que la formulación basada en Q-HPMC resultó ser la más apropiada en términos de elongación, resistencia a la ruptura, hinchamiento y adhesividad. La evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* mostró una actividad significativa del fármaco modelo cuando se cargó en matrices conteniendo Q. Estos hallazgos sugirieron que las matrices basadas en Q son un enfoque prometedor para administrar NM en el tratamiento de la candidiasis.

En una segunda instancia del trabajo (Capítulo II) se utilizó Q como polímero catiónico y distintos polímeros aniónicos con diferentes densidades de carga (gelatina (GEL), goma arábica (GA), carbopol (CB) y alginato (ALG)) para desarrollar las matrices poliméricas. Las formulaciones más apropiadas fueron las basadas en Q-GEL y Q-CB las cuales mostraron buenas propiedades mecánicas y de adhesividad, índice de hinchamiento bajo, mayor liberación del fármaco y mejor actividad *in vitro* contra cultivos de *Candida* que el NM en polvo. Por lo tanto, estas formulaciones también podrían ser consideradas como un sistema terapéutico alternativo para el tratamiento de la candidiasis oral.

A continuación se decidió analizar la influencia de agregar al fármaco de manera solubilizada o suspendida en las características finales de las matrices (Capítulo III). Se desarrollaron y caracterizaron matrices poliméricas basadas en Q y diferentes carragenatos (C): kappa ( $\kappa$ ), lambda ( $\lambda$ ) e iota (i). Las formulaciones basadas en combinaciones de Q- $\kappa$ -C y Q- $\lambda$ -C mostraron un efecto protector térmico sobre el fármaco, presentaron una superficie homogénea, alta resistencia a la tracción, elongación y adhesividad moderada, y al mismo tiempo hinchamiento durante 24 h sin sufrir desintegración. Se observó que la combinación de Q y  $\lambda$ -C produjo matrices con los valores más altos de resistencia a la tracción y adhesividad. Con respecto a la incorporación del NM de manera suspendida o solubilizada, no se detectaron diferencias significativas en el comportamiento mecánico de las matrices estudiadas. Sin embargo, se observó una tendencia: las formulaciones con el NM incorporado de manera solubilizada mostraron una mayor resistencia a la tracción, elongación y adhesividad que aquellas con el fármaco de manera suspendido.

La cuarta parte de este trabajo de Tesis (Capítulo IV) estuvo focalizada en el desarrollo y caracterización de discos adhesivos basados en micropartículas (MPs) poliméricas cargadas con NM. Se formularon MPs basadas en Q, GEL e HPMC cargadas con NM por medio de secado por aspersión y posteriormente las mismas se comprimieron para obtener discos microparticulados. La caracterización de los sistemas incluyó la determinación de la eficacia de encapsulamiento de las MPs y la adhesividad de los discos en encía de cerdo. La estructura cristalina del fármaco se estudió mediante DRX. La morfología y el tamaño del NM y de las MPs se investigaron mediante MEB. Finalmente se estudió la liberación del NM y actividad

de las formulaciones en el tiempo, sobre un cultivo de *C. albicans*. Las MPs basadas en HPMC liberaron el 100% del NM a los 30 min de ensayo, mientras que las MPs basadas en Q-GEL y Q-HPMC liberaron entre 35 y 44% del NM. El estudio por DRX indicó que el NM se encontró en un estado amorfo cuando fue cargado en las MPs. En el ensayo de actividad en el tiempo se determinó que el sistema basado en Q-GEL fue activo incluso después de 7 h de ensayo. Por lo tanto, este sistema que permite una liberación prolongada del activo podría permitir reducir el número de aplicaciones diarias durante el tratamiento de la candidiasis bucofaríngea.

Finalmente (Capítulo V) se decidió realizar nanopartículas (NPs) poliméricas basadas en Q y GEL conteniendo NM y clorhidrato de lidocaína (CHLID). Los sistemas se caracterizaron en cuanto a: eficacia de encapsulamiento, tamaño e índice de polidispersidad, análisis térmicos y DRX. Adicionalmente, se evaluó la liberación de los IFAs desde las matrices y la actividad de los sistemas conteniendo NM mediante ensayos *in vitro* en cultivo de *C. albicans*. Los resultados demostraron que las NPs poliméricas permitieron mantener la liberación sostenida de los IFAs en el tiempo. Los sistemas nanoparticulados basados en Q y GEL presentaron actividad contra los cultivos de *Candida* aún luego de 24 h de comenzado el ensayo. Este hecho permitiría reducir notablemente el número de aplicaciones durante la terapéutica farmacológica de la mencionada patología, lo cual podría llevar a una mayor adherencia del paciente al tratamiento indicado.

# INTRODUCCION GENERAL

## **Candidiasis**

En diversas áreas geográficas las micosis son afecciones endémicas o tienen una incidencia muy alta, siendo uno de los principales problemas de salud pública. Los principales grupos de riesgo lo constituyen los pacientes inmunodeprimidos, donde estas afecciones se instalan como oportunistas y su tratamiento representa un verdadero desafío. Dentro de este grupo podemos mencionar aquellos pacientes cuya inmunodepresión se origina por enfermedades (VIH, lupus eritematoso sistémico, y enfermedades autoinmunes, entre otros) o por tratamientos quirúrgicos, farmacológicos o radiantes (trasplantes de diversos órganos, aplicación de radiaciones en cáncer, quimioterapia antineoplásica de largo plazo, uso de corticoides, y de inmunosupresores) [1].

La candidiasis es causada por levaduras del género *Candida*, las cuales son patógenos oportunistas que residen como huésped en el tracto genitourinario, gastrointestinal, y en la piel. Estas levaduras pueden causar infecciones de las mucosas e invadir los tejidos más profundos provocando infecciones sistémicas, septicemia e inclusive la muerte cuando el sistema inmune del individuo se encuentra debilitado [1]. Las mucosas que principalmente se ven afectadas por levaduras del género *Candida* son la vaginal y la bucal, dando lugar a la candidiasis vaginal y bucofaríngea respectivamente [2, 3].

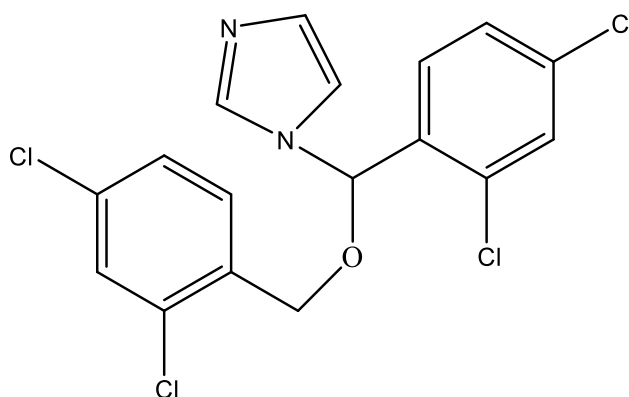
## **Candidiasis bucofaríngea**

La candidiasis bucofaríngea es una infección causada por hongos levaduriformes del género *Candida* que se multiplican en la lengua y en el revestimiento de la boca. Se caracteriza por presentar lesiones aterciopeladas y blanquecinas en la boca y lengua, sangrado al cepillar los dientes y dolor al tragar. Los cambios en la inmunidad, la diabetes y el estado hormonal del paciente, entre otros factores, favorecen la aparición de la infección [4]. Actualmente se han

identificado 150 especies del género *Candida*, siendo *C. albicans* el patógeno oportunista más frecuentemente detectado como el causante de la infección. Algunas otras especies patógenas para los seres humanos incluyen *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii* y *C. stellatoidea* [5].

### Tratamiento de la candidiasis bucofaríngea

Normalmente, una vez que se han hecho las pruebas para confirmar la presencia de hongos levaduriformes del género *Candida* como los causantes de la patología, la misma es tratada con antimicóticos ya sea en forma tópica u oral [6, 7]. Los fármacos más frecuentemente utilizados para tratar esta patología son nistatina, clotrimazol, fluconazol, itraconazol y nitrato de miconazol, entre otros [8]. El nitrato de miconazol (NM) es un agente antifúngico perteneciente a la familia de los azoles (Figura 1) [1, 9], utilizado ampliamente para el tratamiento de la candidiasis oral [10]. El mismo se prescribe en forma de gel al 2%, y debe aplicarse sobre la mucosa oral tres o cuatro veces por día para mantener su efecto terapéutico [11].



**Figura 1.** Estructura química del nitrato de miconazol

## **Mecanismo de acción del nitrato de miconazol**

El NM, como todos los azoles, daña los organismos fúngicos al interferir con la biosíntesis del ergosterol, ocasionando niveles tóxicos de esterol metilado [12]. Recientemente, Kobayashi y colaboradores describieron un segundo mecanismo antifúngico para el NM: la acumulación de especies reactivas de oxígeno inducidas por fármacos dentro del organismo fúngico, que da como resultado daño oxidativo y muerte celular [13].

## **Formulaciones farmacéuticas, principios activos y excipientes**

La Farmacopea Argentina define a los medicamentos como toda preparación o producto farmacéutico empleado para la prevención, diagnóstico y/o tratamiento de una enfermedad o estado patológico, o para modificar sistemas fisiológicos. Los medicamentos contienen uno o varios principios activos y excipientes, formulados bajo una determinada forma farmacéutica. Llamamos principio activo a toda sustancia química, de origen natural o sintético, que posee un efecto farmacológico específico [14]. En 2012, a través de la disposición 4990 de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), se adoptó la terminología de ingrediente farmacéutico activo (IFA) para referirse a principio activo. Por otra parte un excipiente es toda sustancia de origen natural o sintética presente en una preparación farmacéutica incorporada sin propósito terapéutico, pero necesario para transportar, administrar al IFA y ayudar al mismo a cumplir su efecto terapéutico [14].

## **Vías de administración**

Existen diferentes vías de administración de fármacos, entre las que se encuentran las vías oral, inyectable, y tópica. En general la vía oral es la más comúnmente utilizada, ya que permite una fácil administración y es indolora, sin embargo presenta algunas desventajas. Cuando se administra un medicamento por vía oral, éste debe solubilizarse en el tracto gastrointestinal, para poder absorberse en el intestino, pasando previamente por el hígado y como consecuencia sufriendo

el efecto del primer paso hepático. Luego el IFA (ya biodisponible) es transportado por la vía sanguínea, y actúa tanto en las zonas afectadas por la patología como en las zonas del organismo no afectadas por la misma. Muchos fármacos presentan problemas de solubilidad, por lo tanto, la dosis administrada debe ser alta para lograr una acción terapéutica; otros a causa del efecto del primer paso hepático sufren degradación parcial o transformación a compuestos menos activos, reduciendo la dosis efectiva del IFA que llega al sitio de acción. Sumado a esto, solo una parte del fármaco biodisponible llega al sitio de acción, ya que en general las formulaciones farmacéuticas no son sitio dirigidas [15]. Por lo tanto, cuando la patología es superficial y no está diseminada en una gran superficie, la vía tópica es una alternativa de tratamiento.

La vía tópica es una ruta de elección cuando se desea evitar efectos secundarios inherentes a la vía oral o cuando el IFA tiene una acción terapéutica específica en alguno de los compartimentos de la mucosa o piel.

### **Liberación de los IFAs desde las formulaciones farmacéuticas**

Independientemente de la vía de administración seleccionada para un tratamiento, para que una forma farmacéutica pueda ejercer su efecto terapéutico debe ser capaz de liberar al IFA que transporta. Es así que han sido empleados determinados excipientes para modificar la velocidad de liberación de diferentes fármacos desde las formulaciones. Se han diseñado formulaciones capaces de aumentar la solubilidad y velocidad de disolución de IFAs poco solubles, y de esa manera obtener un efecto terapéutico más rápido [16]. También se han empleado matrices poliméricas para desarrollar formulaciones farmacéuticas de administración oral capaces de permanecer adheridas al tracto gastrointestinal y liberar al fármaco de manera controlada, por largos períodos de tiempo, disminuyéndose de esta manera el número de dosis a administrar para lograr el efecto terapéutico [17].

## **Matrices poliméricas mucoadhesivas**

Existen distintos tipos de sistemas de liberación modificada de fármacos, entre los que podemos mencionar: liposomas, complejos de inclusión empleando ciclodextrinas, micro y nanopartículas, microemulsiones, micelas y micelas mixtas, hidrogeles y matrices poliméricas [18–20].

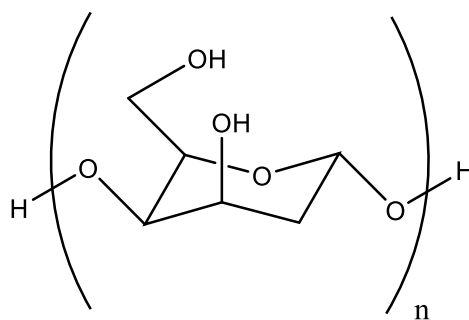
Las matrices poliméricas que permiten modificar y controlar la liberación de activos se basan en general en: 1) polímeros cuya solubilidad es pH dependiente, es decir a un determinado valor de pH pueden absorber fluidos generándose erosión o poros en su estructura liberando al IFA, o 2) una red compuesta por polímeros que interaccionan entre sí por diferentes tipo de interacciones, y que dentro de la mencionada red se encuentra disperso el IFA. Dependiendo de la fuerza de las interacciones entre los polímeros la red será más o menos permeable a la salida del fármaco. En general las redes poliméricas más fuertes están basadas en complejos polielectrolíticos entre polímeros con cargas opuestas. Estos complejos pueden absorber agua generándose poros en su estructura sin llevar a disolver o erosionar la matriz debido a los entrecruzamientos físicos o químicos entre los componentes. Los complejos polielectrolíticos son establecidos por interacciones entre dos macromoléculas con cargas opuestas, generándose fuerzas electrostáticas: enlaces hidrógeno, de van der Waals y enlaces hidrofóbicos [21].

El empleo de nuevos sistemas terapéuticos ha aportado un importante avance en el campo de la tecnología farmacéutica, y ha sido posible gracias a la introducción de nuevos materiales, particularmente polímeros biocompatibles. Dentro de los polímeros que pueden usarse para la formulación de matrices poliméricas mucoadhesivas, los más empleados por su versatilidad son aquellos de origen: 1) natural (quitosano, dextranos, almidón, y celulosa, entre otros), 2) semisintéticos (como por ejemplo derivados celulósicos) o 3) sintéticos (derivados acrílicos y poliésteres, entre otros) [22].

## Polímeros comúnmente utilizados en la formulación de matrices poliméricas mucoadhesivas

### a. *Quitosano*

El quitosano (Q, Figura 2) es un polisacárido obtenido a partir del desecho de las pesqueras, ya que es el derivado más importante de la quitina. La quitina es el segundo polímero natural más abundante en el mundo y sus principales fuentes de obtención son los caparazones de los camarones y cangrejos [23]. El Q puede ser considerado una base fuerte por poseer grupos aminos con un valor de pKa de 6,3. Por debajo de un valor de pH de 6,3 el grupo amino se protona lo que convierte al Q en un polielectrolito catiónico [24]. Adicionalmente, este polímero es biocompatible, biodegradable, no tóxico y posee una leve actividad antimicrobiana, haciendo que el Q sea empleado ampliamente en formulaciones farmacéuticas [25]. Como polication, el Q tiene la capacidad de formar complejos polielectrolíticos con polianiones, siendo muy propicio para el desarrollo de diferentes tipos de sistemas de administración de liberación controlada de fármacos, desde comprimidos de liberación modificada hasta películas mucoadhesivas [26].

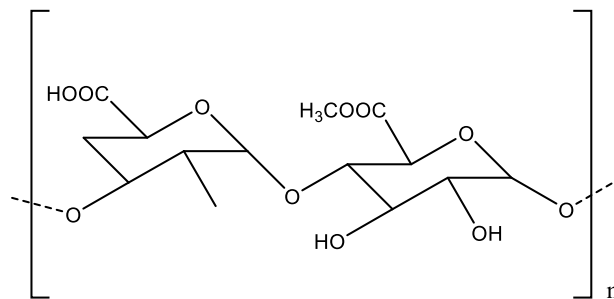


**Figura 2.** Estructura química del quitosano

### **b. Pectina**

La pectina (PC, Figura 3) es un polímero natural que constituye las paredes celulares de la mayoría de las plantas [27]. Es un polisacárido no tóxico, compuesto de residuos de ácido D-galacturónico con enlaces  $\alpha$ -1,4, en donde los grupos carboxilo del ácido urónico son completa o parcialmente esterificados con metilo [28]. El grado de metoxilación (DM) se utiliza para clasificarlas como PC de alto metoxilo (DM <50) y PC de bajo metoxilo (DM > 50) [29]. Su valor de pKa es de aproximadamente 3,5 y la molécula se encuentra cargada negativamente a pH neutro [30]. La PC se ha empleado recientemente para diferentes aplicaciones biomédicas, incluyendo la administración de fármacos formando parte de matrices de comprimidos y cubiertas poliméricas, administración de genes, cicatrización de heridas e ingeniería de tejidos, entre otras [27, 29].

El carácter aniónico de éste polímero le permite interactuar con polímeros que se encuentren cargados positivamente, y así formar matrices poliméricas capaces de transportar y liberar diferentes IFAs.



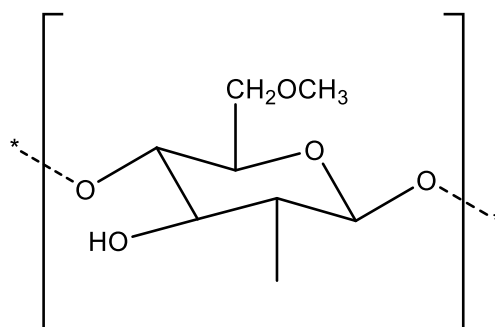
**Figura 3.** Estructura química de la pectina

### **c. Hidroxipropil metilcelulosa**

La hidroxipropil metilcelulosa (HPMC, Figura 4) es uno de los derivados más importantes de la celulosa, es un polímero no iónico, fácilmente disponible y que se ha demostrado que forma matrices transparentes, inodoras, insípidas y solubles en agua [31]. Es un polímero hidrofílico, biodegradable y biocompatible que tiene una

amplia gama de aplicaciones en administración de fármacos, pinturas, cosméticos, recubrimientos, agricultura y textiles [32].

En la industria farmacéutica, la HPMC es de especial interés para la formulación de matrices para la liberación controlada de fármacos [33], debido a que una de sus características más importantes es su alta capacidad de hinchamiento, que tiene un efecto significativo en la liberación de los fármacos incluidos en estas matrices. Al entrar en contacto con el agua o algún fluido biológico, se produce una relajación de la cadena del polímero con una expansión del volumen, permitiendo que el fármaco incorporado difunda fuera de la matriz [34].

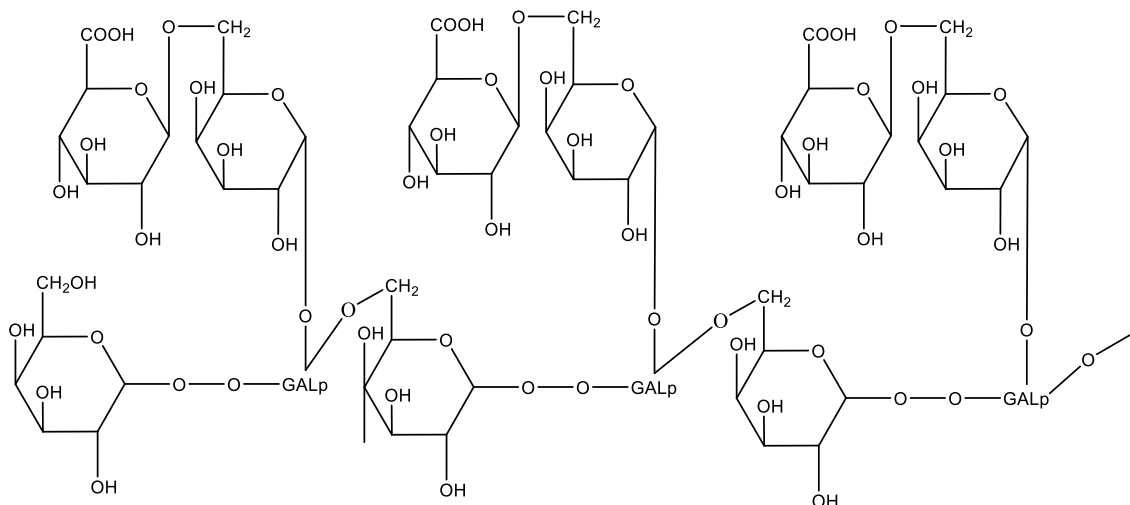


**Figura 4.** Estructura química de la hidroxipropil metilcelulosa

#### **d. Goma arábiga**

La goma arábiga (GA, Figura 5) es un polímero biocompatible y biodegradable que se obtiene del exudado de los tallos y ramas de árboles de Acacia [35]. Es un polisacárido complejo, que tiene una estructura principal formada por unidades  $\beta$ -D-galactopiranosilo unidas por enlaces 1,3. Las cadenas laterales se componen de dos a cinco unidades  $\beta$ -D-galactopiranosilo unidas por enlaces 1,3, unidas a la cadena principal por enlaces 1,6. La composición principal es 39–42% de galactosa, 24–27% de arabinosa, 12–16% de ramnosa, 15–16% de ácido glucurónico y 1,5–2,6% de proteínas [36]. La GA es un polielectrolito débil, contiene grupos carboxílicos que se encuentran cargados negativamente por encima de un valor de pH de 2. Es soluble en agua, tiene propiedades

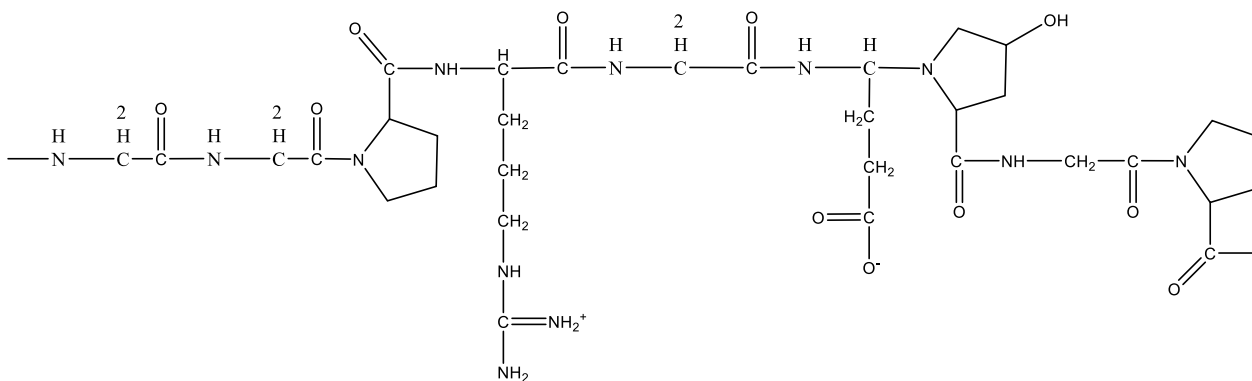
emulsionantes, estabilizantes y tiene una baja viscosidad. La GA se emplea ampliamente en procesos de microencapsulación, en la formación de matrices, y para aumentar la estabilidad de emulsiones [37]. Se utiliza principalmente en formulaciones farmacéuticas orales y tópicas. También se emplea en la preparación de comprimidos como aglutinante, y como bioadhesivo en nuevas formulaciones de matrices de liberación modificada [38, 39].



**Figura 5.** Estructura química de la goma arábiga

### ***e. Gelatina***

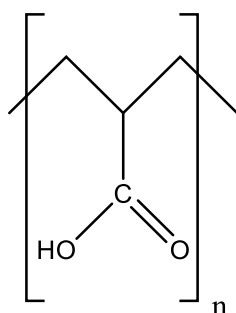
La gelatina (GEL, Figura 6) es un polímero natural, biocompatible y biodegradable, que se obtiene por desnaturalización térmica o degradación física y química del colágeno [40]. La GEL dependiendo del valor de pH del medio puede cargarse positiva o negativamente. Este polímero ha tomado gran relevancia en la industria alimentaria debido a su abundancia, bajo costo relativo y también en la industria farmacéutica como formador de matrices poliméricas para la administración de fármacos [41].



**Figura 6.** Estructura química de la gelatina

**f. Carbopol**

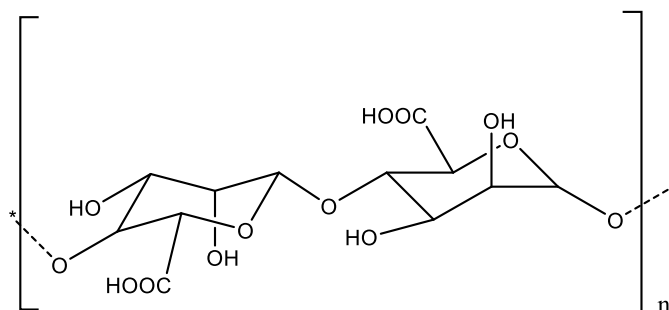
El carbopol (CB, Figura 7) es un polímero del ácido acrílico con un alto peso molecular, es un polímero sintético que puede ser aniónico, dependiendo del valor del pH (por encima de un valor de pH de 5,5 posee carga negativa) y, por lo tanto, puede generar interacciones iónicas con polielectrolitos catiónicos. Este polímero se emplea frecuentemente como componente principal de los sistemas de administración de fármacos para aplicaciones bucales, transdérmicas, oculares, rectales y nasales [42]. Además ha sido reportado que el CB se utiliza en la formulación de matriciales poliméricas para la liberación prolongada de fármacos [43].



**Figura 7.** Estructura química del carbopol

### g. *Alginato*

El alginato (ALG, Figura 8) es un polisacárido natural extraído de la pared celular de varias especies de algas pardas. Está compuesto por residuos de ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G) y  $\beta$ -D-manurónico (M), unidos por enlace 1-4, con grupos hidroxilo libres y carboxilato distribuidos a lo largo de la estructura principal [44]. Es un polímero aniónico a pH neutro, por encima de los valores de pKa de las unidades de ácido gulurónico y manurónico (3,38 y 3,65, respectivamente), los grupos carboxilo se encuentran en forma ionizada lo que permitiría formar matrices basadas en interacciones iónicas con polímeros catiónicos [45]. La capacidad de formar hidrogeles del ALG ha llevado su uso a la formulación de matrices de administración de fármacos y células, apósitos para curar heridas e ingeniería de tejidos [46]. Además, debido a sus propiedades mucoadhesivas se lo emplea en la preparación de sistemas de liberación controlada de fármacos [47, 48].

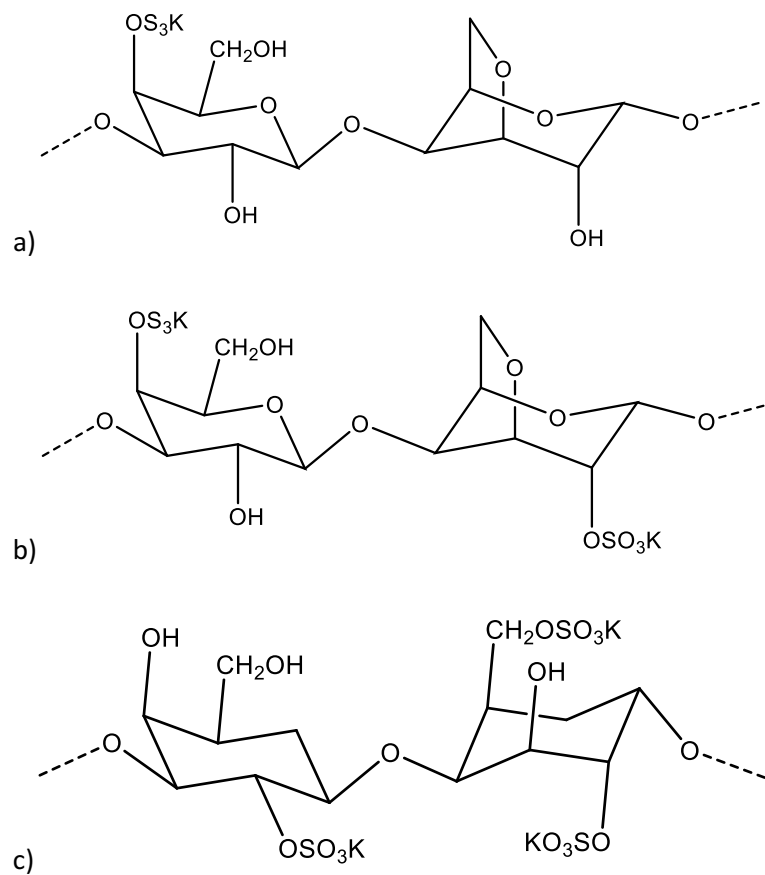


**Figura 8.** Estructura química del alginato

### h. *Carragenatos*

Los carragenatos (C) son polisacáridos aniónicos de galactosa, solubles en agua, extraídos de las algas rojas (*Rhodophyta*) [49]. Se utilizan ampliamente en las industrias farmacéutica y alimentaria como agentes gelificantes y estabilizantes [50].

Los isómeros de C ( $\kappa$ ),  $\iota$ , y  $\lambda$ -, (Figura 9) difieren en el número y la posición de los grupos éster sulfato en las unidades de galactosa:  $\kappa$ - tiene uno,  $\iota$ - tiene dos y  $\lambda$ - tiene tres. Su carácter aniónico les permite interactuar con polielectrolitos catiónicos [51]. También se ha informado de que el poder gelificante de los carragenatos  $\kappa$ - y  $\iota$ - imparte excelentes propiedades de formación de matrices poliméricas [52]. Debido a su biocompatibilidad se han utilizado ampliamente los C en la formulación de sistemas de liberación prolongada de fármacos [53].

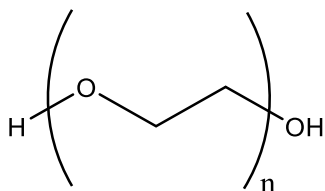


**Figura 9.** Estructura química de los carragenatos: a)  $\kappa$ -, b)  $\iota$ - y c)  $\lambda$ -

### ***i. Polietilenglicol***

El polietilenglicol 400 (PEG 400, Figura 10) es un polímero no iónico, no tóxico, biocompatible y biodegradable [54]. Los polietilenglicoles según sus pesos

moleculares pueden ser líquidos (de 200 a 600), semisólidos (de 800 a 1500) o sólidos (de 4000 en adelante) [55]. Es un polímero inodoro, no volátil y se utiliza en una diversidad de fines farmacéuticos como solubilizante, cosolvente, y para plastificar (dar elasticidad) matrices polimericas, entre otras aplicaciones [56, 57].



**Figura 10.** Estructura química del polietilenglicol 400

## **HIPOTESIS SUSTANTIVA**

El desarrollo de matrices poliméricas que se adhieran a la encía de un potencial paciente con candidiasis bucofaríngea, y que liberen gradualmente al fármaco antifúngico en el sitio de acción, reducirá notablemente el número de aplicaciones, mejorando de esta manera la adherencia del paciente al tratamiento indicado.

## **OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar y caracterizar matrices poliméricas que permitan el transporte y el control de la liberación de nitrato de miconazol.

# CAPITULO I

*“Formulación de matrices poliméricas mucoadhesivas basadas en la interacción polimérica catiónica-aniónica y catiónica-no iónica”*

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Desarrollar matrices poliméricas mucoadhesivas basadas en las interacciones entre un polímero catiónico y uno aniónico o entre uno catiónico y uno no iónico.
- Caracterizar físico-químicamente los sistemas en cuanto a: espesor, índice de hinchamiento, difracción de rayos X, espectroscopía infrarroja, calorimetría diferencial de barrido y microscopía electrónica de barrido.
- Estudiar los sistemas obtenidos en cuanto a su adhesividad a encías de cerdo, resistencia a la ruptura y elongación.
- Evaluar la liberación del IFA desde las matrices y la actividad de los sistemas mediante ensayos *in vitro* en cultivos de diferentes especies del género *Candida*.

# MATERIALES Y METODOS

## *Materiales*

Q (230 KDa de peso molecular promedio y 80,6% de N-deacetilación) fue suministrado por Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, EE. UU.), PC (18,1 kDa de peso molecular promedio y 81% de grado de esterificación) fue suministrada por Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Alemania), HPMC (250 kDa de peso molecular promedio, 19–24% de contenido de metoxilo y 7–12% de contenido de hidroxipropilo) se adquirió de Eigenmann & Veronelli (Milán, Italia). NM de grado farmacéutico (99,49% de pureza) fue suministrado por Parafarm, (Buenos Aires, Argentina). Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

## *Métodos*

### **Preparación de las matrices**

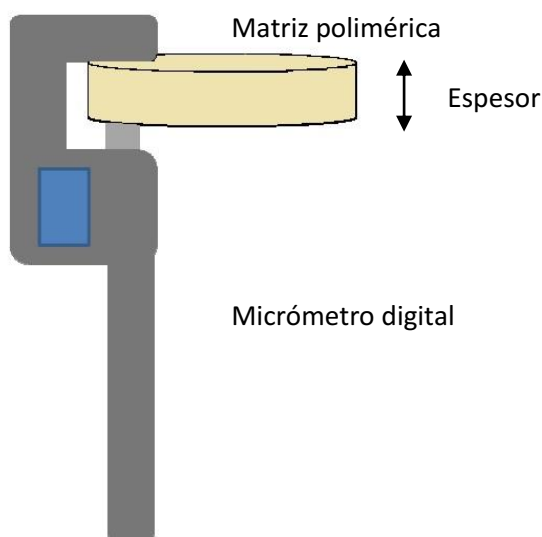
El Q (3% p/v) se dispersó en una solución de ácido láctico (10% v/v) y se agitó durante 24 h con el fin de solubilizar al polímero. Las soluciones de PC y HPMC (3% p/v) se prepararon por disolución de los polímeros en agua destilada. Cada solución (20 mL) se goteó sobre la solución de Q (20 mL) a 80 °C bajo agitación magnética, a continuación el NM (2% p/p respecto a la masa total de polímeros utilizados) solubilizado en PEG 400 (utilizado también como plastificante) se adicionó a la mezcla y la misma se agitó a 200 rpm durante 2 h. Las soluciones resultantes se vertieron en placas de Petri y se secaron en estufa a 40 °C durante 72 h y 58% humedad relativa (HR). Luego del secado las matrices fueron neutralizadas adicionando una solución de buffer fosfato (pH = 6,8), fueron lavadas con agua destilada y nuevamente secadas [43, 58]. Finalmente las matrices secas fueron retiradas de las placas de Petri para su caracterización. Adicionalmente, y siguiendo el mismo procedimiento, fueron preparadas como

control las mismas matrices pero sin el agregado de NM. La composición de las matrices poliméricas se detalla en la Tabla I, página 27.

## Caracterización de los sistemas

### Espesor de las matrices

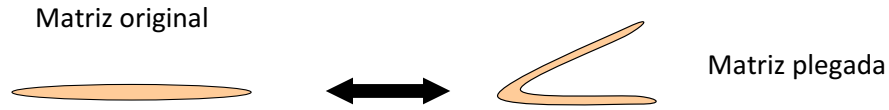
El espesor de las matrices fue medido empleando un micrómetro digital (Schwyz, China) como se esquematiza en la Figura 11. Por cada matriz se realizaron 5 mediciones en distintos sectores de la misma y se calculó el valor promedio [59].



**Figura 11.** Esquema de un micrómetro digital midiendo una matriz

### Resistencia al plegamiento

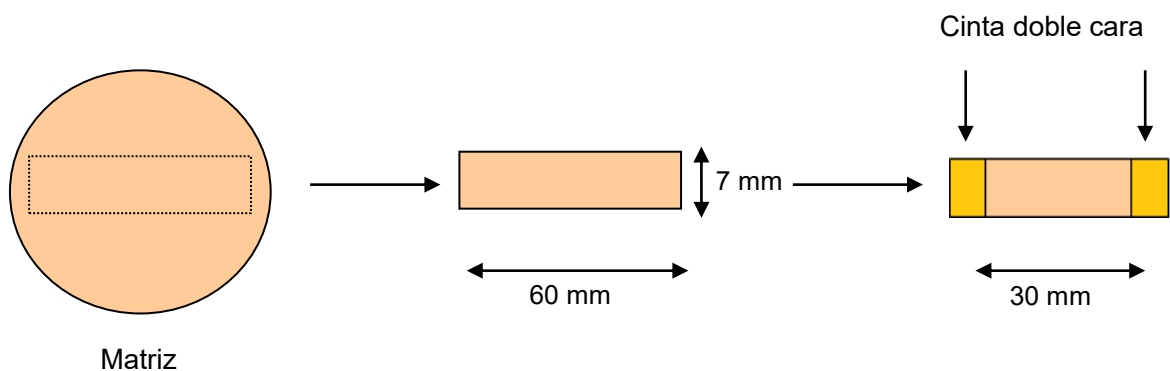
La resistencia al plegamiento de las formulaciones se determinó doblando manualmente las matrices en el mismo lugar. Las matrices cumplen dicho ensayo si luego de ser plegadas 300 veces mantienen su estructura (Figura 12) [60]. Esta prueba se desarrolló por triplicado.



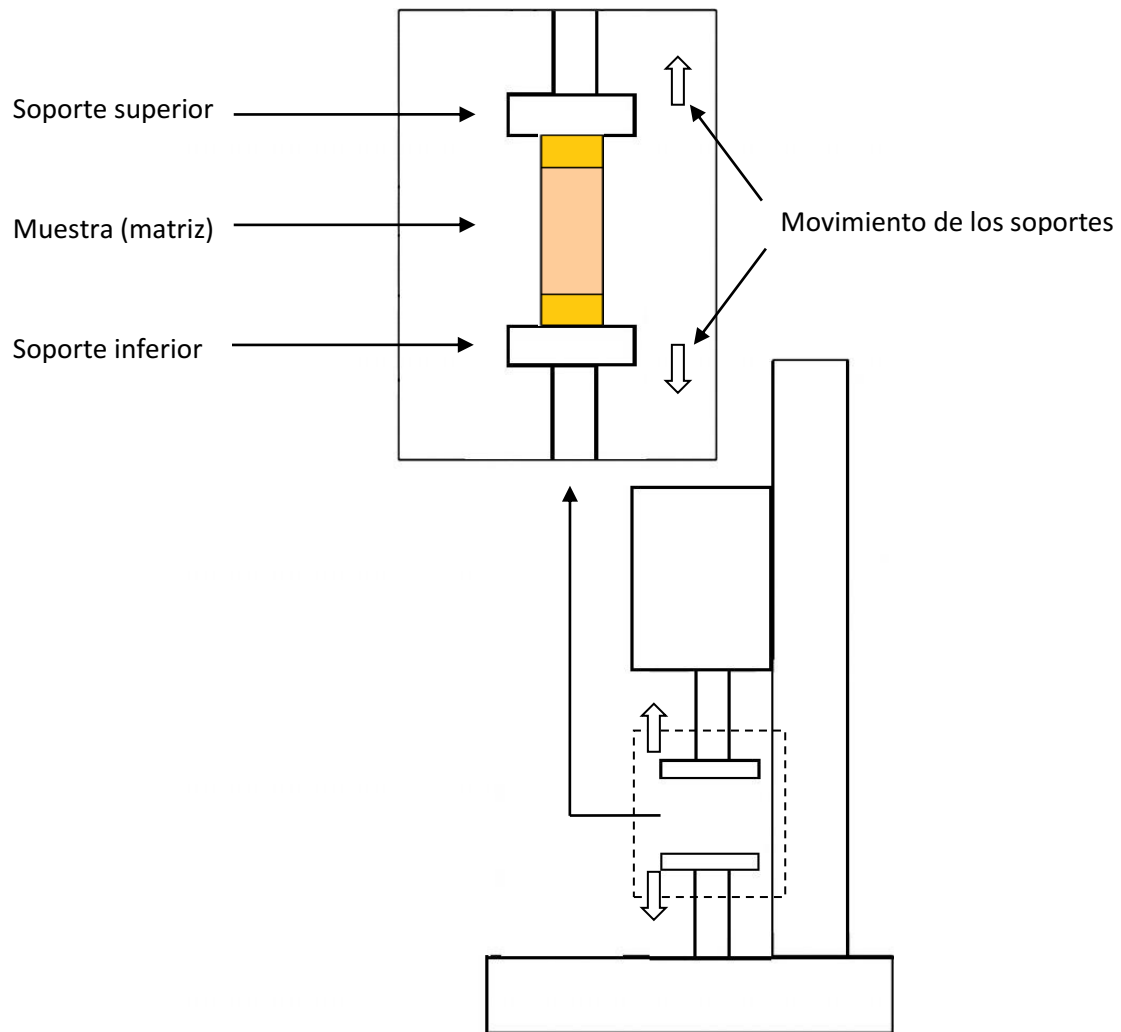
**Figura 12.** Plegamiento de las matrices

### Propiedades mecánicas

Se empleó una máquina universal Instron, de columna única, serie 3340 (Norwood, MA, Estados Unidos) con una celda de carga de 10 N para evaluar la resistencia mecánica de las matrices. El ensayo se desarrolló por triplicado. Previamente a las mediciones, las matrices fueron acondicionadas durante 24 h a 25 °C y 58% de HR. Las matrices se cortaron en tiras de 7 mm de ancho y 60 mm de largo para evaluar las propiedades de tracción. Para evitar rupturas y deslizamientos en el dispositivo de prueba, los extremos de cada tira se montaron con cinta adhesiva de doble cara y se agregaron cuadrados de 30 mm de cartulina (Figura 13). La longitud de la matriz expuesta entre los extremos de la cartulina fue de 30 mm. La distancia de agarre inicial fue de 30 mm, y la velocidad de desplazamiento fue de 0,05 mm/s. Se determinó la fuerza necesaria para producir la ruptura de cada matriz. Adicionalmente, se obtuvo la elongación de cada sistema al momento de la ruptura, calculada como el porcentaje de cambio en la longitud de la matriz con respecto a la distancia original entre los agarres (30 mm) (Figura 14).



**Figura 13.** Esquema de preparación de las matrices para ensayo de tracción



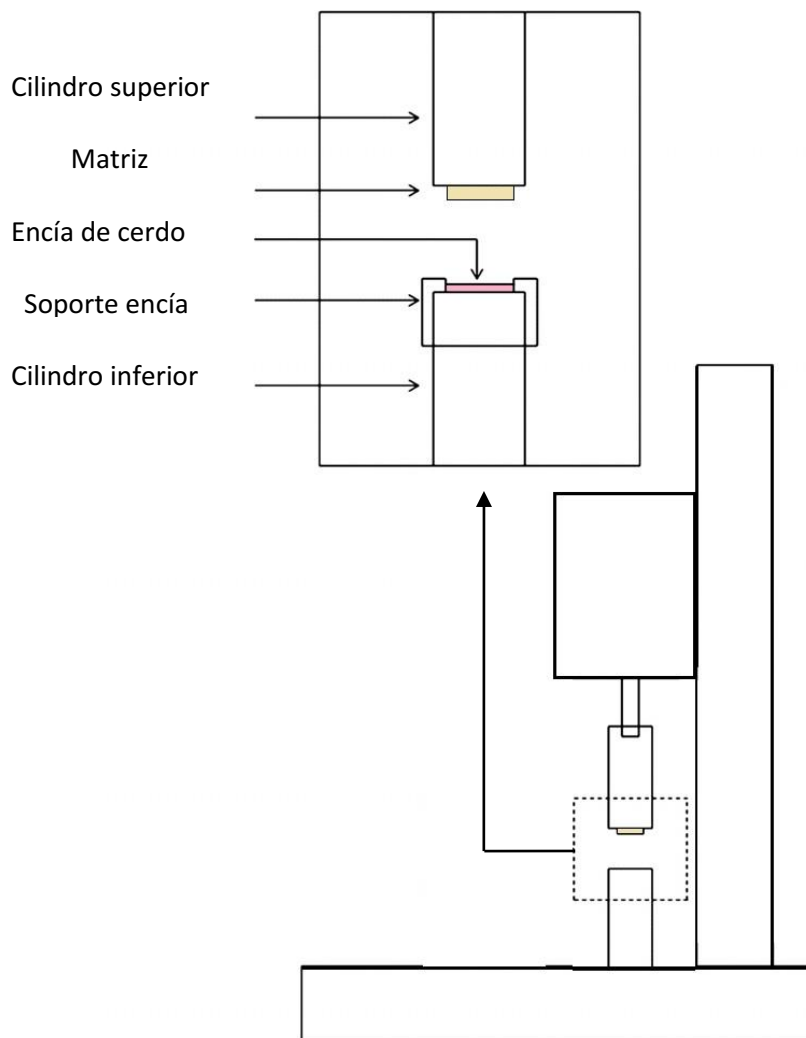
**Figura 14.** Determinación de tracción y elongación de las matrices, empleando una maquina universal Instron

### **Adhesividad *in vitro***

La adhesividad de las matrices se evaluó *in vitro* midiendo la fuerza requerida para separar cada formulación de una porción de encía de cerdo (obtenida del frigorífico "Paladini SA", V.G. Galvez, Argentina), utilizando una máquina universal Instron acondicionada para esta caracterización, adicionando dos cilindros de acero tanto en la parte superior como en la inferior de la misma (Figura 15). En la cara superior del cilindro inferior de acero se colocó una porción de encía de cerdo, asegurada por medio de un soporte metálico para evitar su desplazamiento. Al cilindro superior, en la cara inferior, se adhirieron las distintas muestras de las

matrices poliméricas (de 2,5 cm, igual diámetro que el cilindro, Figura 15). Previamente al ensayo, las formulaciones fueron hidratadas con saliva artificial (0,1 mL, pH = 6,8) durante 10 minutos. La composición de la saliva artificial empleada fue una solución de buffer fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{NaCl}$ ) [61].

Para realizar el ensayo, el cilindro superior se movió hacia abajo hasta que la matriz estuvo en contacto con la superficie de la encía de cerdo. La matriz permaneció en contacto con el disco durante 5 minutos y luego se movió hacia arriba a una velocidad constante de 1,0 mm/s. Se determinó la fuerza requerida para separar a cada matriz de la encía. La prueba se realizó por triplicado [62].



**Figura 15.** Máquina universal Instron adaptada para ensayo de adhesividad

## Índice de hinchamiento

Para estimar la cantidad de fluido adsorbido por las matrices a distintos tiempos, se tomaron muestras de las mismas de 2,5 cm de diámetro, las que fueron sumergidas en 1 mL de saliva artificial (pH = 6,8) a una temperatura de 25 °C. A intervalos de tiempo predeterminados (0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120 y 150 min), las muestras fueron retiradas y pesadas, limpiando cuidadosamente el exceso del medio antes de determinar su peso. Luego se colocaron nuevamente en 1 mL de medio para continuar con el procedimiento hasta la finalización del ensayo o hasta la desintegración de la matriz. El porcentaje de fluido adsorbido fue calculado utilizando la Ecuación 1:

$$\text{Índice de hinchamiento} = (M_t - M_s) / M_s \quad [\text{Ecuación 1}]$$

Siendo  $M_t$  el peso de la matriz a un determinado tiempo y  $M_s$  el peso inicial de la matriz seca [63]. La prueba se realizó por triplicado.

## Espectroscopía infrarroja

Los espectros infrarrojos (IR) con transformada de Fourier (FT-IR) se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro FT-IR-Prestige-21 (Shimadzu, Tokio, Japón) empleando pastilla de KBr (2 mg de muestra en 100 mg KBr) para la determinación del NM y los polímeros, y reflectancia total atenuada (ATR) con cristal de diamante para el análisis de las matrices. El rango de escaneo fue de 700 a 3900  $\text{cm}^{-1}$  con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

## Microscopía electrónica de barrido

La morfología del NM, los polímeros y las matrices se investigó mediante microscopía electrónica de barrido (MEB), empleando un microscopio electrónico de barrido (SEM, AMR 1000, Leitz, Wetzlar, Alemania). Las muestras se montaron en un soporte de aluminio por medio de un adhesivo conductor de doble faz. Este

soporte se recubrió con una fina capa de oro durante 15 min a 70-80 mTorr para hacerlo conductor antes de obtener las micrografías. Todas las muestras se examinaron utilizando una aceleración de voltaje de 20 kV.

### **Calorimetría diferencial de barrido**

Las propiedades térmicas del NM, de los polímeros y de las formulaciones se evaluaron utilizando un calorímetro Shimadzu TA-60 (Kyoto, Japón). La masa empleada de las matrices fue de 20 mg (equivalentes a 0,4 mg de NM) y NM en polvo (5 mg) [64]. El instrumento fue calibrado utilizando indio y zinc como estándares. Cada muestra, se colocó en un recipiente de aluminio prensado, y el mismo fue calentado a una velocidad de 5 °C/min de 30 hasta 300 °C, bajo atmósfera de N<sub>2</sub> (flujo de 30 mL/min). Como referencia se empleó un recipiente de aluminio vacío.

### **Difracción de rayos X**

Para la obtención de los difractogramas se utilizó un difractómetro X'Pert Philips 5000, en modo de reflexión a temperatura ambiente. El equipo operó con radiación CuK $\alpha$  ( $\lambda = 1.540562 \text{ \AA}$ ), un voltaje de 40 kV, una corriente de 20 mA y el intervalo de medición utilizado fue de 10 a 50° con paso de 0,02° ( $2\theta$ ). El ensanchamiento de picos bajos y el fondo se aseguraron utilizando una geometría de haz paralela por medio de una lente de rayos X y un monocromador de grafito colocado antes de la ventana del detector. La adquisición y evaluación de los datos se realizaron con el paquete Stoe Visual-Xpow, versión 2.75 (Alemania).

### **Estudio de disolución del IFA y liberación desde los sistemas**

Los estudios de disolución del NM en polvo y de las formulaciones se realizaron en 900 mL de agua destilada conteniendo PEG 400 (1% v/v) a 37 °C, utilizando un equipo de disolución (Hanson Research, SR8 8-Flask Bath, Ontario, Canadá) equipado con paletas rotando a 50 rpm según USP XXIII [65]. Las matrices

se fijaron al fondo de los vasos utilizando cianoacrilato como adhesivo, mientras que el NM se dispersó en el medio de disolución. A diferentes intervalos de tiempo (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 90 min), se retiraron alícuotas de 5 mL a través de un filtro de 0,45 µm. Se añadió un volumen igual del medio de disolución después de cada extracción para mantener un volumen constante. La cantidad de NM liberado se determinó mediante UV a 272 nm. El ensayo se realizó por triplicado.

### **Actividad *in vitro***

#### **Microorganismos y medios de cultivo**

Se trabajó con *C. albicans* (ATCC 10231), *C. glabrata* (CCC115-00), *C. tropicalis* (CCC148-13), *C. parapsilosis* (ATCC 22019) y *C. krusei* (ATCC 6258) provistas por la *American Type Culture Collection* (ATCC) o de la Colección de Cultivos del Centro de Referencia de Micología (CCC). Estas cepas se hicieron crecer en tubos en pico de flauta de agar Sabouraud-glucosa con cloranfenicol (Difco Laboratories, Detroit, EEUU) a 28 °C por 24-48 h.

El inóculo se preparó de acuerdo con el documento M27 recomendado por el Instituto de estándares Clínicos y de Laboratorio (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) para levaduras, y se ajustó a  $5 \times 10^3$  Unidades formadoras de colonias (UFC)/mL, mediante recuento en cámara de Neubauer. Los inóculos se prepararon suspendiendo cinco colonias distintas en 5 mL de agua destilada estéril y agitando en un mezclador de vórtice durante 15 s [66].

#### **Halo de inhibición**

El ensayo se realizó siguiendo las pautas del método de difusión de disco descrito en el documento CLSI M44-A2 [67]. La prueba se llevó a cabo en placas de agar (150 mm de diámetro) que contenían medio agar Mueller-Hinton, complementadas con 2% de dextrosa (2 g/100 mL) y 0,5 µg/mL de azul de metileno, a una profundidad de 4,0 mm. *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei* se cultivaron en agar suplementado con Sabouraud-glucosa

18-24 h antes de la prueba. La superficie de agar se inoculó sumergiendo hisopos de algodón estériles en una suspensión de inóculo (ajustado a una concentración de aproximadamente  $1-5 \times 10^6$  UFC/mL) y sembrando la superficie de la placa en tres direcciones. Se dejó secar la placa durante 20 min y luego se colocaron porciones de las matrices sobre la superficie del agar. Se empleó al fármaco, adherido a una cinta, como control. Las placas se incubaron al aire a 28 °C y se leyeron a las 24 h. Después de 24 h de incubación, se determinaron los diámetros de la zona de inhibición de crecimiento (utilizando un calibre) producidos por cada una de las matrices y por el fármaco adherido a la cinta. Los diámetros fueron medidos en 6 direcciones y se registró el valor medio [68].

### **Análisis estadístico**

Los resultados se expresan como valores medios  $\pm$  desviación estándar (DE). Se empleó el análisis de varianza y, cuando el efecto de los factores fue significativo, se aplicó la prueba de rangos múltiples de Tukey. Valores de  $p < 0,05$  fueron considerados significativos.

# RESULTADOS Y DISCUSION

## **Espesor, resistencia al plegamiento, resistencia a la tracción y elongación**

Como se observa en la Tabla I, las formulaciones cargadas y no cargadas con NM presentaron valores de espesor en el rango de  $0,21 \pm 0,01$  a  $0,70 \pm 0,20$  mm el cual resulta adecuado para evitar molestias cuando se aplique en el potencial paciente, ya que una matriz de aplicación bucal, en general, debe exhibir un espesor entre 0,05 y 1 mm [69]. En particular, aquellas formulaciones basadas en Q y Q-PC cargadas (1 y 2) y no cargadas con el fármaco (6 y 7) mostraron los valores más altos de espesor. Además, en la formulación Q-PC, se observó un mayor DE en comparación con las otras formulaciones, probablemente debido a diferentes patrones de rugosidad en la superficie de la matriz.

La resistencia al plegamiento es el número de veces que una matriz se puede doblar en el mismo lugar sin romperse ni agrietarse. Su evaluación puede dar una idea de la resistencia y de la flexibilidad de una formulación, la que es indispensable para manejarla fácilmente para una aplicación cómoda y segura. Según lo observado, las formulaciones formadas por 100% de PC (3 y 8) se quebraron antes de ser dobladas 300 veces, por lo tanto no cumplieron el ensayo de resistencia al plegamiento, mientras que todas las demás formulaciones cumplieron con el ensayo. Estos resultados indican que estas matrices poseen una alta resistencia a la manipulación, y buena flexibilidad para una aplicación bucal (Tabla I). Cabe destacar que la flexibilidad de las formulaciones no se vio afectada cuando las mismas se cargaron con el fármaco.

**Tabla I.** Composición de las formulaciones y resultados de los ensayos de espesor, resistencia a la tracción, elongación y plegamiento

Sistema	Componentes					Ensayos			
	Q	PC	HPMC	NM (2 % p/p)	Espesor (mm)	Plegamiento	Resistencia a la Tracción (N)	Elongación (%)	
1	100%			✓	0,60±0,03	✓	0,8±0,1	421±22	
2	50%	50%		✓	0,60±0,20	✓	3,4±0,9	11±4	
3		100%		✓	0,21±0,01	X	-	-	
4	50%		50%	✓	0,43±0,03	✓	2,2±0,5	150±62	
5			100%	✓	0,33±0,05	✓	4,8±0,2	274±84	
6	100%			-	0,59±0,02	✓	0,9±0,2	415±20	
7	50%	50%		-	0,70±0,20	✓	3,8±0,9	10±3	
8		100%		-	0,22±0,01	X	-	-	
9	50%		50%	-	0,35±0,01	✓	2,7±0,8	93±50	
10			100%	-	0,24±0,03	✓	5,3±0,4	245±75	

La resistencia a la tracción es un requisito importante, ya que estas formulaciones deben ser fácilmente manipuladas por los pacientes sin romperse. Como se puede observar en la Tabla I, las interacciones iónicas entre Q y PC pueden generar matrices rígidas (alta resistencia a la tracción y baja elongación), que podrían producir molestias cuando se aplican. Las formulaciones basadas en Q-HPMC mostraron valores de resistencia a la tracción más adecuados (debido a que se prefiere que las matrices exhiban una elevada resistencia a la tracción y a la vez una elongación relativamente alta) [70]. Se observó el valor más bajo de resistencia a la tracción para las matrices sólo basadas en 100% Q, tanto cargadas como no cargadas, demostrando que las interacciones del Q con otros polímeros afectan sus propiedades mecánicas. Como se ve en la Tabla I, la elongación de las formulaciones 1 y 5 (100% de Q y 100% HPMC) fue de  $421 \pm 22\%$  y  $274 \pm 84\%$ , respectivamente, mientras que la formulación que contenía 100% de PC no mostró elongación. La capacidad de elongación se redujo en las formulaciones basadas en combinación de polímeros, la formulación Q-HMPC presentó una elongación de  $150 \pm 62\%$  y se observó un valor muy bajo para la matriz basada en Q-PC, probablemente debido a la formación de una matriz rígida, como resultado de las interacciones entre los polímeros. Los resultados obtenidos de los ensayos de resistencia al plegamiento, resistencia a la tracción y elongación indican que la manipulación y la aplicación de formulaciones basadas únicamente en PC serían extremadamente difíciles de utilizar. Aunque la formulación basada en Q-PC se dobló 300 veces sin romperse, sus propiedades de elongación fueron deficientes. El uso de diferentes concentraciones de plastificantes, o el empleo de plastificantes internos como el sorbitol o glicerol, en lugar de PEG 400 (plastificante externo) probablemente modifique las propiedades mecánicas de estas matrices [71]. Varios trabajos han reportado variaciones en las propiedades mecánicas de la matriz al usar un plastificante en diferentes concentraciones y también cuando se emplean diferentes plastificantes [72, 73]. En este trabajo, se seleccionó el PEG 400 como plastificante, ya que ni el sorbitol ni el glicerol fueron capaces de solubilizar al NM durante la formulación de la matriz.

### Adhesividad *in vitro*

La adhesividad de las diferentes formulaciones se presenta en la Tabla II. Como se puede observar, la adhesividad de las formulaciones basadas solo en Q o en HPMC (cargadas y no cargadas con NM) fue muy similar ( $p > 0,05$ ). Resultados similares fueron encontrados con las matrices basadas en las combinaciones Q-PC y Q-HPMC (Tabla II). Finalmente cuando las matrices estuvieron basadas únicamente en PC su adhesividad fue nula.

**Tabla II.** Composición de las formulaciones y resultados de adhesividad

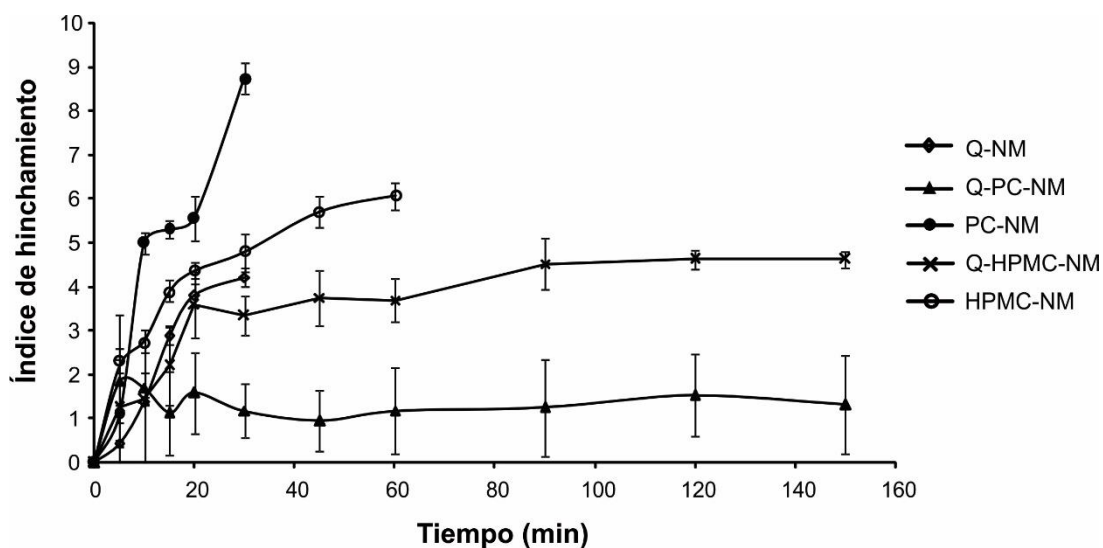
Sistema	Q	PC	HPMC	NM (2% p/p)	Adhesividad (N)
1	100%			√	0,4±0,2
2	50%	50%		√	0,5±0,2
3		100%		√	0
4	50%		50%	√	0,4±0,1
5			100%	√	0,4±0,1
6	100%			-	0,4±0,1
7	50%	50%		-	0,5±0,2
8		100%		-	0
9	50%		50%	-	0,4±0,1
10			100%	-	0,3±0,2

Las propiedades mucoadhesivas son una de las características más importantes de los sistemas de administración de fármacos por vía bucal. La adhesividad se produce por interacciones entre las matrices y la mucina. Éstas pueden ser tanto electrostáticas (a través de grupos amino del Q cargados positivamente y residuos de ácido siálico de la mucina cargados negativamente, y glucoproteínas del mucus) como del tipo hidrofóbicas (a través de los grupos

metilo de residuos acetilados del Q con los grupos metilo de cadenas laterales de mucina) [74]. Ha sido reportado que los polielectrolitos aniónicos, como la PC, forman enlaces mucoadhesivos más fuertes que los polímeros neutros como la HPMC u otros derivados de la celulosa [75]. Sin embargo, la hidratación de los polímeros limita su adhesividad. Por encima de un valor crítico de hidratación, se produce una sobrehidratación del polímero, conduciendo a la formación de un mucílago que carece de propiedades mucoadhesivas [76]. En este trabajo las matrices basadas únicamente en PC, probablemente al tener sus cargas negativas libres, sufren una sobrehidratación al estar en contacto con saliva artificial, dando lugar a matrices que no presentan propiedades mucoadhesivas. Entre las matrices basadas en el polímero neutro (HPMC), el polímero catiónico (Q) y las combinaciones de polímeros, no hemos encontrado diferencias significativas en su adhesividad ( $p > 0,05$ ). Además, las formulaciones cargadas y no cargadas mostraron propiedades mucoadhesivas similares, indicando que el NM no modificó en gran medida la adhesión de dichas formulaciones poliméricas a la encía de cerdo, utilizada como modelo.

### **Índice de hinchamiento**

Como se ve en la Figura 16, las formulaciones analizadas se hincharon en diferentes grados, según el polímero o la combinación de polímeros formadores de la matriz. Las formulaciones basadas en 100% de Q y 100% de PC mostraron un índice de hinchamiento de 4,2 y 8,7 respectivamente, y se desintegraron después de 30 min de ensayo. Alternativamente, la formulación basada en 100% de HPMC presentó un índice de hinchamiento de 6,1, desintegrándose después de 60 min. Finalmente, las formulaciones basadas en las combinaciones Q-PC y Q-HPMC mostraron un índice de hinchamiento de 1,4 y 4,6, respectivamente. En ambos casos, después de 150 min, no se observó la desintegración de las mismas.



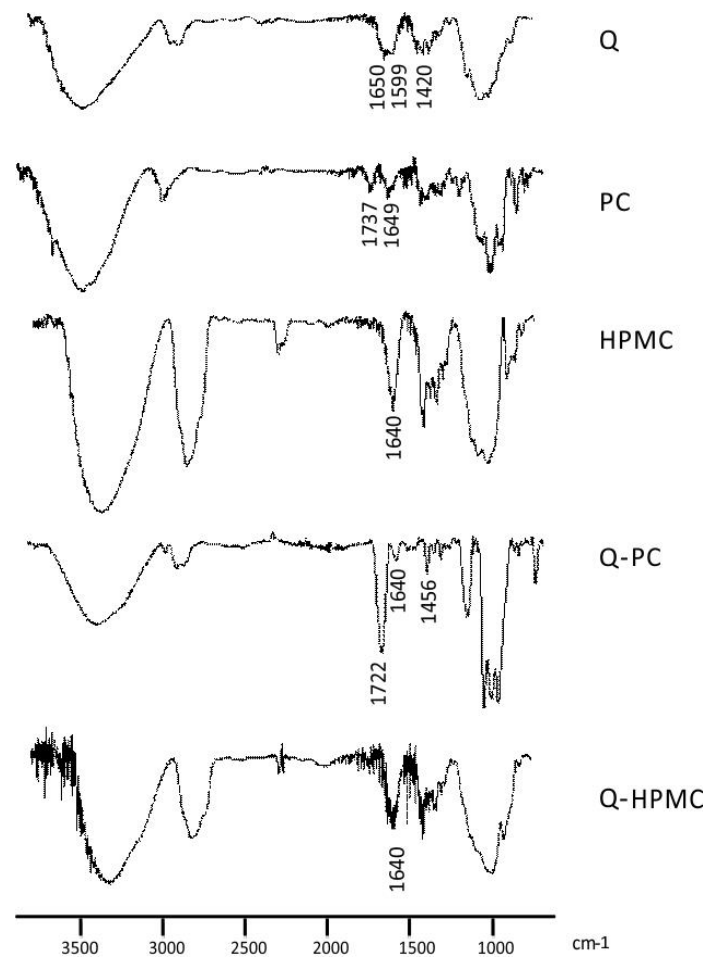
**Figura 16.** Índice de hinchamiento de las matrices en saliva artificial a 37 °C

### Espectroscopía infrarroja

Como se ve en la Figura 17, el espectro del Q mostró bandas a 1650 y 1420  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a los estiramientos asimétricos y simétricos del  $\text{COO}^-$  y a 1599  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento NH [77, 78]. El espectro de la PC mostró bandas típicas en 1737, 1649, 1452  $\text{cm}^{-1}$  asignadas al estiramiento C=O de los grupos carboxilo metilados y a la simetría antisimétrica y simétrica de los estiramientos  $\text{COO}^-$ , respectivamente [79]. Los picos característicos de la HPMC se presentan a 3450  $\text{cm}^{-1}$  atribuidos al estiramiento OH, mientras que la banda entre 1650 y 1600  $\text{cm}^{-1}$  es atribuida a la presencia de vibración del estiramiento C=O para anillos cíclicos de seis miembros, la banda entre 1460 y 1350  $\text{cm}^{-1}$  es atribuida al C-O-C de los anhídridos cíclicos y los picos en 1300–1250  $\text{cm}^{-1}$  son debidos al epóxido cíclico, finalmente el pico a 950–1150  $\text{cm}^{-1}$  es asignado al enlace CO [80, 81].

Los espectros de IR de la formulación basada en Q y PC mostraron cambios significativos en la región correspondiente a la carbonilamida. Los grupos  $\text{NH}_3^+$  (banda del Q a 1599  $\text{cm}^{-1}$ ) y la vibración de estiramiento del  $\text{COO}^-$  asimétrica y simétrica a 1650 y 1420  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente, cambiaron a 1640 y 1456  $\text{cm}^{-1}$ . Además, se detectó un cambio correspondiente al pico C=O de la PC de 1737 a

1722  $\text{cm}^{-1}$ , lo que confirma las interacciones entre Q ( $\text{NH}_3^+$ ) y PC ( $\text{COO}^-$ ) [82, 83]. Por el contrario, en el espectro IR de la matriz basada en Q y HPMC, no se observaron cambios con respecto a los polímeros de partida, indicando interacciones electrostáticas débiles entre estos polímeros.

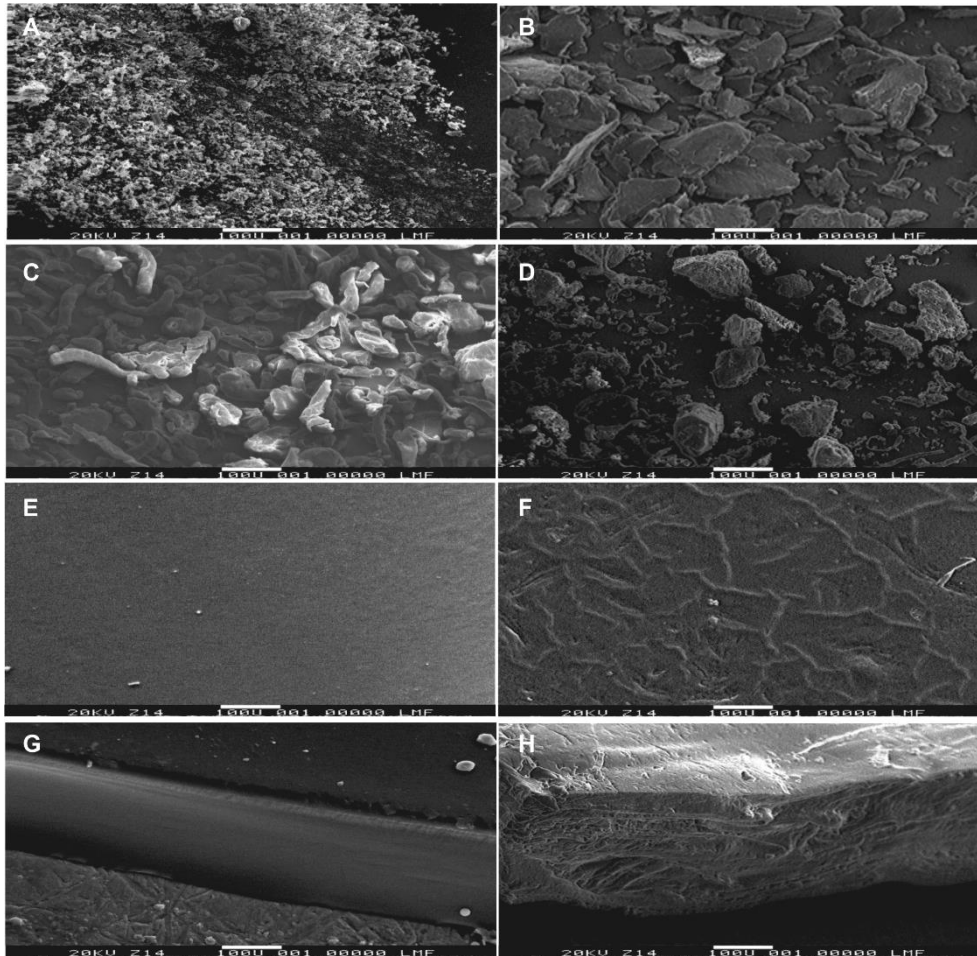


**Figura 17.** Espectros IR de los polímeros y las matrices poliméricas

### Microscopía electrónica de barrido

La morfología de los polímeros formadores de la matriz, el NM y las formulaciones basadas en combinaciones de polímeros fueron analizadas por MEB. El NM (Figura 18A) aparece conformado de pequeños cristales irregulares (10–30  $\mu\text{m}$ ), mientras que el Q (Figura 18B) es una mezcla de partículas irregulares con un

rango de tamaño de 100 a 300  $\mu\text{m}$  y algunas más pequeñas (20–40  $\mu\text{m}$ ). Como se ve en la Figura 18C, la HPMC aparece como una mezcla de partículas planas fibrosas y forma irregular presentando un tamaño de 11 a 200  $\mu\text{m}$ . Finalmente, la PC (Figura 18D) se presentó como bloques rugosos en un rango de 20 a 300  $\mu\text{m}$ .



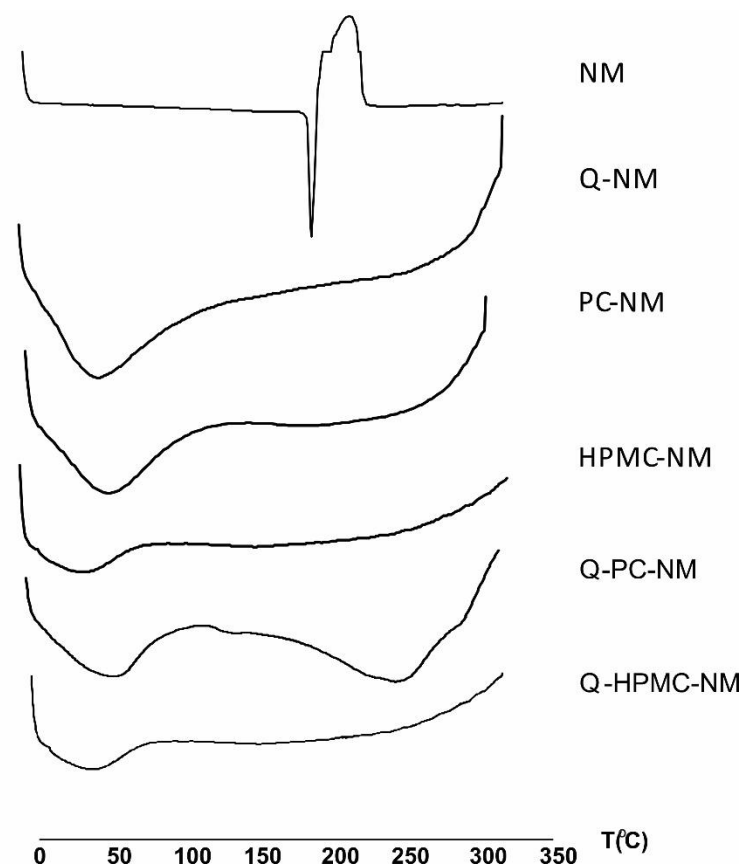
**Figura 18.** Microscopía electrónica de barrido. A) NM, B) Q, C) HPMC, D) PC, E-F) Vista superficial de las matrices E) Q-HPMC, F) Q-PC; G-H) Corte transversal de las matrices G) Q-HPMC, H) Q-PC

La morfología de las formulaciones muestra que todas las matrices fueron casi simétricas y distribuidas uniformemente. El análisis de la formulación basada en Q-PC mostró diferentes patrones y cavidades arrugadas (Figura 18F: vista superficial y 18H: vista transversal), probablemente debido a fuertes interacciones

electrostáticas entre el Q y la PC, como fue descrito por IR (Figura 17). Además, este patrón de rugosidad podría deberse, al menos en parte, a la inmiscibilidad parcial entre dichos polímeros. La formulación de Q-HPMC mostró una superficie lisa (Figura 18E) que podría deberse a interacciones electrostáticas débiles, mientras que los análisis de las secciones transversales de la matriz (Figura 18G) demostraron una miscibilidad total de los polímeros [84].

### **Calorimetría diferencial de barrido**

Los termogramas del NM, los polímeros de partida y las formulaciones se muestran en la Figura 19. El NM presentó un pico endotérmico a 186 °C correspondiente a su punto de fusión [85]. Sin embargo, en las formulaciones cargadas, se observó la ausencia del pico endotérmico característico del NM sugiriendo que el fármaco se encuentra molecularmente disperso en la matriz polimérica o ha pasado del estado cristalino al amorfo [86, 87]. Una razón alternativa para explicar la ausencia del pico del NM puede ser que la concentración de NM en las formulaciones no sea detectada por el análisis de CDB. Se ha informado que este método generalmente es incapaz de detectar cristalinidad por debajo del 2%. Sin embargo, ha sido reportada la detección por este método del NM en una concentración de 0,4 mg empleando esta metodología [64]. Respecto al comportamiento de los polímeros, los termogramas de las formulaciones Q-NM y PC-NM exhibieron eventos endotérmicos alrededor de 50°C como resultado de la pérdida del solvente remanente utilizado para preparar las matrices. El análisis de la formulación HPMC-NM indicó un leve evento endotérmico en el rango entre 40 y 50 °C. Finalmente, la formulación Q-HPMC-NM mostró un pico endotérmico a 45 °C correspondiente a la pérdida del solvente remanente, mientras que la formulación Q-PC-NM exhibió un pico endotérmico amplio a 245 °C [88], probablemente debido a la descomposición de la matriz.

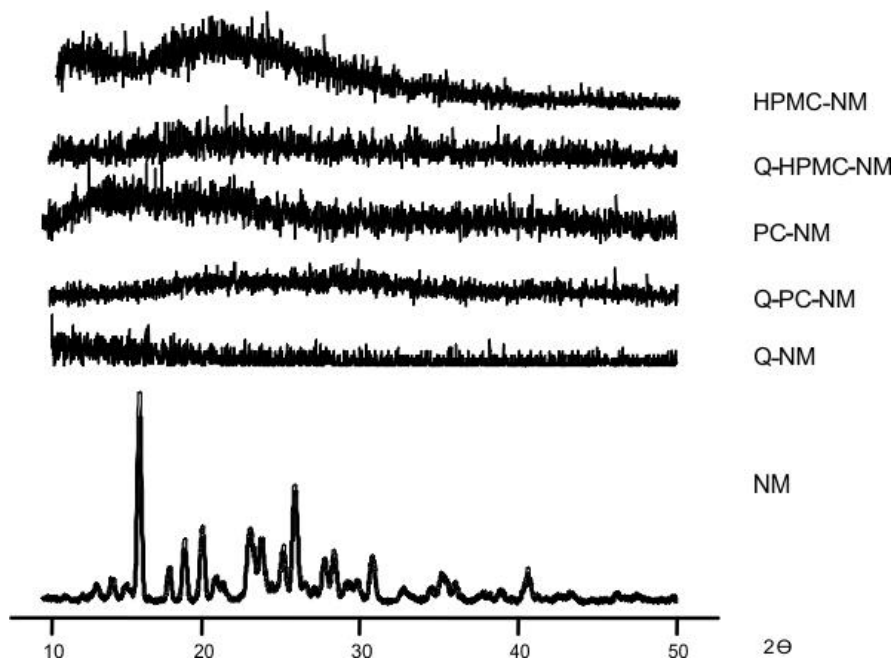


**Figura 19.** Curvas de CDB para el NM y las formulaciones poliméricas

### Difracción de rayos X

El estudio de DRX se realizó para confirmar los resultados de los estudios de CDB. Los difractogramas del NM, Q-NM, PC-NM, HPMC-NM, Q-PC-NM y Q-HPMC-NM se presentan en la Figura 20. El difractograma del NM mostró picos agudos y estrechos en ángulos de difracción ( $2\theta$ ): 13,05°, 14,49°, 15,59°, 16,22°, 18,55°, 20,80°, 21,57°, 22,95°, 25,19°, 26,15°, 27,32°, 29,9°, 31,82°, 33,12°, 36,6° y 40,69°, con un patrón cristalino típico [89, 90]. Por otro lado, los difractogramas de las distintas formulaciones no mostraron picos correspondientes al NM en estado cristalino. Los estudios de rayos X estuvieron en concordancia con el análisis de CDB que muestra que NM se encontraría en un estado amorfo en las formulaciones, o que la concentración de NM en las mismas está por debajo del límite de detección del método [91]. Así, tres posibilidades pueden haber ocurrido:

(a) el NM se encontraría en un estado cristalino, pero su baja concentración no es detectada ni por la técnica de CDB ni por DRX; (b) el NM redujo parcialmente su cristalinidad (por debajo de los límites de detección de los métodos empleados) durante la formulación de la matriz; o (c) el NM se transformó de un estado cristalino a un estado amorfo.

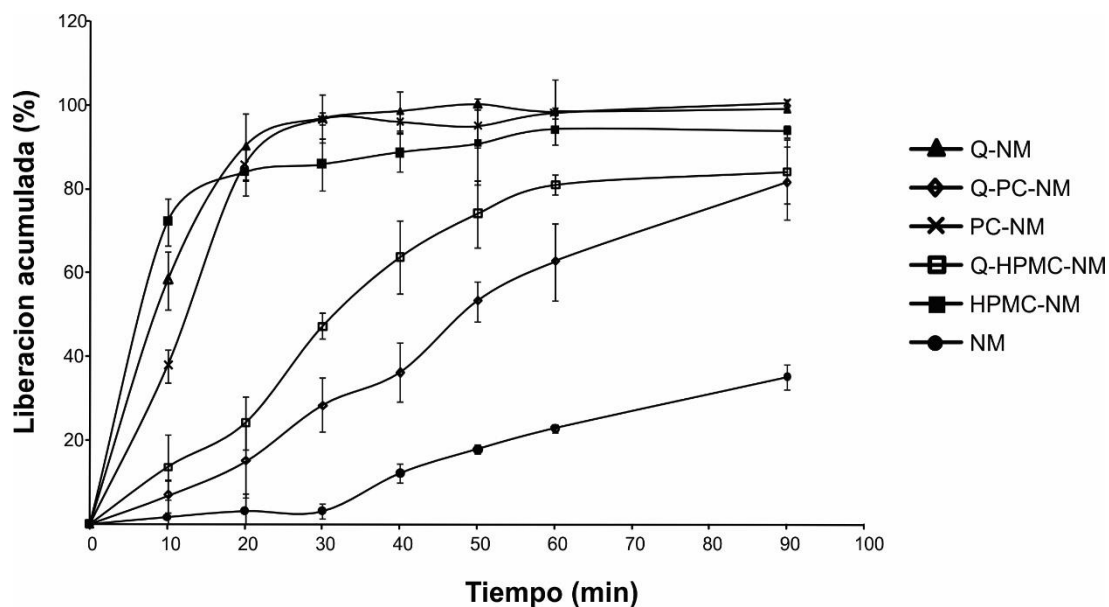


**Figura 20.** Difractogramas del NM y las formulaciones poliméricas

### Estudio de disolución del IFA y liberación desde los sistemas

La Figura 21 muestra los estudios de disolución del NM y las formulaciones conteniendo NM. Como otros derivados imidazólicos, el NM presenta escasa solubilidad acuosa y se clasifica como Clase II según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico. Como consecuencia, después de 30 minutos de ensayo, solo se solubilizó el 1,4% del fármaco ( $Q_{30} = 1,4\%$ ), mientras que todas las formulaciones permitieron un aumento en la disolución del NM a los 30 min: Q-PC ( $Q_{30} = 28,6\%$ ), Q-HMPC ( $Q_{30} = 47,3\%$ ), HPMC ( $Q_{30} = 85,9\%$ ), PC ( $Q_{30} = 96,8\%$ ) y Q ( $Q_{30} = 97,0\%$ ). Finalmente, solo el 35% del fármaco, sin estar incorporado a las formulaciones, se

encontró en solución a los 90 min de ensayo. Por otro lado, se encontró que la cantidad de NM liberada desde las matrices Q-PC, Q-HPMC, 100% HPMC, 100% PC y 100% Q fue del 81,3, 84,9, 94,6, 98,7 y 99,2%, respectivamente.



**Figura 21.** Ensayo de disolución del NM y las formulaciones desarrolladas en 900 mL de agua destilada conteniendo 1% v/v de PEG 400 a 37 °C

El estado amorfo de un fármaco conduce a un estado sólido de alta energía que aumenta su solubilidad y velocidad de disolución. Adicionalmente, ha sido reportado que diferentes fármacos han mejorado su disolución simplemente por el agregado de agentes que aumentan su humectabilidad. Debido a que los polímeros empleados en el desarrollo de las matrices poliméricas poseen propiedades humectantes, se podría postular que si el NM se mantiene en estado cristalino, una mayor humectación del mismo podría reducir la aglomeración de las partículas hidrofóbicas del fármaco, y en consecuencia aumentar su superficie de contacto con el medio incrementando su disolución [92]. La liberación del NM disminuyó cuando la matriz estuvo compuesta por la combinación de Q y PC y en menor medida por la combinación de Q con HPMC. Las interacciones entre los polímeros dentro de la matriz podrían disminuir, como consecuencia, la liberación del fármaco. Finalmente, las formulaciones basadas en un solo polímero (PC, HPMC o

Q) fueron las que produjeron la mayor la velocidad de disolución del NM, probablemente debido al efecto humectante de los polímeros sumado a una ausencia de interacciones fuertes en la matriz que retarden su liberación.

### Actividad *in vitro* - Halo de inhibición

Como se muestra en la Tabla III, después de 24 h de ensayo, las formulaciones basadas en Q-NM, Q-PC-NM y Q-HPMC-NM mostraron una mayor actividad que el NM en polvo ( $p < 0,05$ ), frente a las cinco cepas de *Candida* analizadas. Se encontró que la formulación basada en Q sin NM también poseía actividad antifúngica contra las levaduras, mientras que las formulaciones basadas en PC y HPMC sin NM no generaron ninguna inhibición del crecimiento de tales cepas.

**Tabla III.** Halos de inhibición (en mm) producidos por las distintas formulaciones en cepas de *Candida*

Sistema	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i>
Q-NM	34±1	36±1	38±1	37±2	34±2
Q-PC-NM	37±2	40±3	42±3	36±2	39±3
PC-NM	12±2	20±1	24±1	28±1	26±2
Q-HPMC-NM	23±2	43±2	43±4	37±2	41±3
HPMC-NM	27±1	32±2	40±3	31±2	21±2
Q	10±1	18±2	11±2	14±1	20±1
PC	-	-	-	-	-
HPMC	-	-	-	-	-
NM Control	18±1	31±1	22±1	22±1	34±3

Los halos de inhibición producidos por las matrices basadas en Q, Q-PC y Q-HPMC, cargadas con NM fueron mayores que los producidos por el NM en polvo y por las formulaciones que no poseían al fármaco. La actividad encontrada en la formulación basada en 100% de Q sin fármaco podría ser atribuida a las conocidas propiedades antimicrobianas del polímero. Estos resultados sugieren que formulaciones basadas en 100% PC y 100% HPMC (cargadas con el fármaco) inhibieron el crecimiento de las levaduras como consecuencia de la liberación efectiva de NM. Contrariamente, las formulaciones conteniendo Q fueron capaces de inhibir el crecimiento de las cepas estudiadas por la combinación de dos factores: 1) La liberación del fármaco desde la matriz y 2) la actividad antimicrobiana del Q.

### **Selección de una potencial formulación de aplicación bucal**

Cabe mencionar que las matrices Q-PC cargadas y no cargadas con el fármaco exhibieron valores más altos de espesor y DE, probablemente debido a las fuertes interacciones entre los polímeros con carga opuesta. Además, las interacciones iónicas entre el Q y la PC podrían ser la razón de la rugosidad observada por MEB en la superficie de las matrices [43].

La formulación basada en 100% de PC presentó un índice de hinchamiento significativo, probablemente debido a la presencia de grupos de ácido carboxílico libres que desempeñan un papel importante en términos de captación de agua [93]. Al mismo tiempo, la PC, como muchas otras moléculas relacionadas cargadas negativamente, exhibe características de mucoadhesión notables relacionado con fuertes interacciones entre sus restos de ácido carboxílico y los grupos hidroxilo de la mucina. Sin embargo, ha sido reportado que una gran captación de agua produce una disminución notable de la mucoadhesión como ocurrió con la formulación basada sólo en PC, en donde el exceso de hidratación observado en la formulación produjo la pérdida total de adhesividad. La formulación Q-NM exhibió un gran hinchamiento, lo que llevó a la formación de una estructura muy frágil y fácilmente desintegrable, y como consecuencia, a la pérdida total de sus propiedades

cohesivas [88]. El Q, un polímero catiónico insoluble en agua con importantes propiedades de mucoadhesivas, exhibe un comportamiento de hinchamiento dependiente del pH, generando una mayor retención de agua en condiciones ácidas cuando los grupos amino libres están totalmente protonados [94]. En este caso, ya que el estudio de hinchamiento se realizó a pH fisiológico simulando saliva (pH = 6,8), la formulación basada en 100% de Q exhibió un hinchamiento menor que la formulación basada en 100% de PC. Probablemente, este grado de hidratación moderado permitió que la formulación de Q mostrara un valor adhesivo potencialmente útil (Tabla II) [95], debido a las interacciones entre los grupos amino del Q y las estructuras aniónicas de la mucina. La HPMC, un polímero no iónico, muestra características mucoadhesivas a través de interacciones físicas y/o químicas con los componentes de la mucosa. Además, en contacto con el agua, este polímero se hidrata y se hincha, generando una capa gelatinosa, que puede afectar sus propiedades de adhesión [94]. Cuando se comparó a la formulación basada en 100% de Q, con la formulación basada en 100% de HPMC, esta última mostró un mayor grado de hinchamiento y un comportamiento bioadhesivo similar, lo que indica que la hidratación más alta de HPMC no afectó la adhesión a la mucina. Por lo tanto, en este estudio, se pudo observar que las formulaciones basadas en Q, Q-PC, Q-HPMC y 100% de HPMC mostraron características similares de adhesividad, siendo adecuadas como formulaciones para la cavidad bucal, en comparación con la formulación basada en 100% de PC.

## CONCLUSIONES

En este capítulo se han desarrollado matrices mucoadhesivas cargadas con nitrato de miconazol basadas en quitosano, pectina, hidroxipropil metilcelulosa, quitosano-pectina y quitosano-hidroxipropil metilcelulosa. Según los análisis realizados, la formulación basada en 100% de pectina mostró nulas propiedades de elasticidad, elongación, resistencia a la tracción y adhesividad, al mismo tiempo presentó alto índice de hinchamiento y una rápida desintegración. La formulación basada en 100% de quitosano mostró baja resistencia a la tracción, alto espesor y rápida desintegración. Adicionalmente, la formulación basada en 100% hidroxipropil metilcelulosa presentó buenas propiedades mecánicas pero un alto índice de hinchamiento y menor actividad antifúngica que la formulación basada en quitosano. Respecto a las matrices basadas en mezclas de polímeros, se observó que aquellas basadas en quitosano-pectina presentaron alto espesor y baja elongación, probablemente debido a las fuertes interacciones iónicas entre los polímeros formadores de la matriz, mientras que la formulación basada en quitosano-hidroxipropil metilcelulosa fue la formulación más apropiada en términos de resistencia al plegamiento, propiedades mecánicas, y adhesividad. Fue posible confirmar una correlación directa entre las interacciones poliméricas analizadas por espectroscopía infrarroja y la morfología observada por microscopía electrónica de barrido. La disolución del nitrato de miconazol desde las formulaciones fue más rápida que la del IFA en polvo, probablemente debido a una reducción del estado cristalino del fármaco en las formulaciones y/o a una mejora en la humectabilidad del nitrato de miconazol, que puede conducir a una reducción en la aglomeración de las partículas hidrofóbicas del fármaco con un consiguiente aumento de la velocidad de disolución. También se confirmó que las formulaciones cargadas con el fármaco y basadas en 100% pectina y 100% hidroxipropil metilcelulosa inhibieron el crecimiento de las diferentes especies de *Candida* ensayadas como consecuencia de la liberación efectiva del nitrato de miconazol, mientras que las formulaciones basadas en quitosano fueron capaces de inhibir el crecimiento de las levaduras mediante la combinación de dos factores:

la liberación del nitrato de miconazol y las propiedades antimicrobianas propias del quitosano.

## CAPITULO II

*“Formulación de matrices poliméricas mucoadhesivas basadas en las interacciones de un polímero catiónico y distintos polímeros aniónicos con diferentes densidades de carga”*

# CONSIDERACIONES GENERALES PARA EL PRESENTE CAPITULO

Debido a que en el capítulo anterior hemos encontrado diferencias entre matrices basadas en un polímero catiónico y un polímero aniónico (quitosano y pectina, respectivamente) y aquellas basadas en un polímero catiónico y uno neutro (quitosano e hidroxipropil metilcelulosa), hemos decidido analizar diferentes matrices basadas en polímeros con diferentes densidades de carga. Para ello se ha seleccionado al quitosano como polímero catiónico y a los polímeros aniónicos carbopol, gelatina, goma arábica y alginato. Estos polímeros presentan diferentes densidades de carga, por lo que podrían interactuar con el quitosano en distinto grado, generando matrices con diferentes propiedades.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Desarrollar matrices poliméricas mucoadhesivas basadas en las interacciones entre un polímero catiónico y polímeros aniónicos con diferentes densidades de carga.
- Caracterizar físico-químicamente los sistemas preparados: espesor, índice de hinchamiento, difracción de rayos X, espectroscopía infrarroja, análisis térmico diferencial y microscopía electrónica de barrido.
- Estudiar los sistemas obtenidos en cuanto a su adhesividad (en encías de cerdo), resistencia a la ruptura y elongación.
- Evaluar la liberación del IFA desde las matrices y la actividad de los sistemas mediante ensayos *in vitro* en cultivos de diferentes especies del género *Candida*.

# MATERIALES Y METODOS

## ***Materiales***

Q (230 KDa de peso molecular promedio y 80,6% de N-desacetilación) fue suministrado por Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, EE. UU.), GA (250KDa de peso molecular promedio), GEL (tipo A de piel de cerdo, 125 Bloomvalue) y NM de grado farmacéutico fueron adquiridas por Parafarm (Buenos Aires, Argentina). ALG de sodio suministrado por Sigma-Aldrich Co (Buenos Aires, Argentina), y CB (Carbopol® 971NF) por Lubrizol Advanced Materials, Inc. (Cleveland, OH, EE. UU.). Todos los demás reactivos químicos fueron de grado analítico.

## ***Métodos***

### **Preparación de las matrices**

Se preparó una solución de Q (3% p/v) dispersando el polímero en una solución al 10% v/v de ácido láctico (pH = 2,67) y dejándolo en agitación por 24 h [96]. Se prepararon soluciones acuosas de CB (1,5% p/v), ALG (1,5% p/v), GEL (3% p/v) y GA (3% p/v). Todas las soluciones se obtuvieron a partir de la dispersión del polímero en agua seguida de agitación durante 24 h. Luego, la solución de Q (20 mL) fue goteada sobre cada una de las soluciones poliméricas (20 mL), con agitación magnética a 80 °C para evitar la precipitación. Se solubilizó NM (2% p/p respecto a la masa total de polímeros utilizados) en PEG 400 (30% p/p) empleado como agente solubilizante del fármaco y a la vez como plastificante de las matrices [97] y se añadió a las soluciones poliméricas. Las mezclas se agitaron a 200 rpm durante 2 h. Luego, las soluciones se vertieron en placas de Petri de 9 cm de diámetro y se secaron (72 h, a 40 °C y 58% de HR). Luego del secado las matrices fueron neutralizadas (con una solución buffer fosfato pH = 6,8), lavadas con agua destilada y nuevamente secadas [98]. Finalmente las matrices secas fueron retiradas de las placas de Petri para su caracterización. Adicionalmente, y siguiendo el mismo procedimiento, las mismas matrices fueron

preparadas nuevamente como control pero sin el agregado de NM. La composición de las matrices poliméricas cargadas con NM se detalla en la Tabla IV.

**Tabla IV.** Composición de las formulaciones cargadas con NM (2% p/p)

Sistema	Q	CB	GEL	GA	ALG
1	100%				
2	50%	50%			
3		100%			
4	50%		50%		
5			100%		
6	50%			50%	
7				100%	
8	50%				50%
9					100%

### **Caracterización de los sistemas**

Se llevaron a cabo ensayos de espesor, resistencia al plegamiento, propiedades mecánicas, índice de hinchamiento (hasta 240 minutos), adhesividad *in vitro*, espectroscopía IR, MEB, DRX, estudio de disolución del IFA y liberación desde los sistemas (con toma de muestra a 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 y 120 min) y actividad *in vitro* (Halos de inhibición) tal como se describió en “Materiales y Métodos” del Capítulo I.

### **Análisis térmico diferencial**

El NM y las matrices se investigaron mediante el método de análisis térmico diferencial (ATD), utilizando un equipo Shimadzu DTG60. Las muestras que

consistieron en NM (2 mg) o fragmentos de matrices (100 mg) se calentaron a una velocidad de 10 °C/min en el rango de temperatura entre 50 y 400 °C. Todas las curvas se normalizaron por unidad de la masa.

# RESULTADOS Y DISCUSION

## **Espesor de las formulaciones, resistencia al plegamiento y propiedades mecánicas**

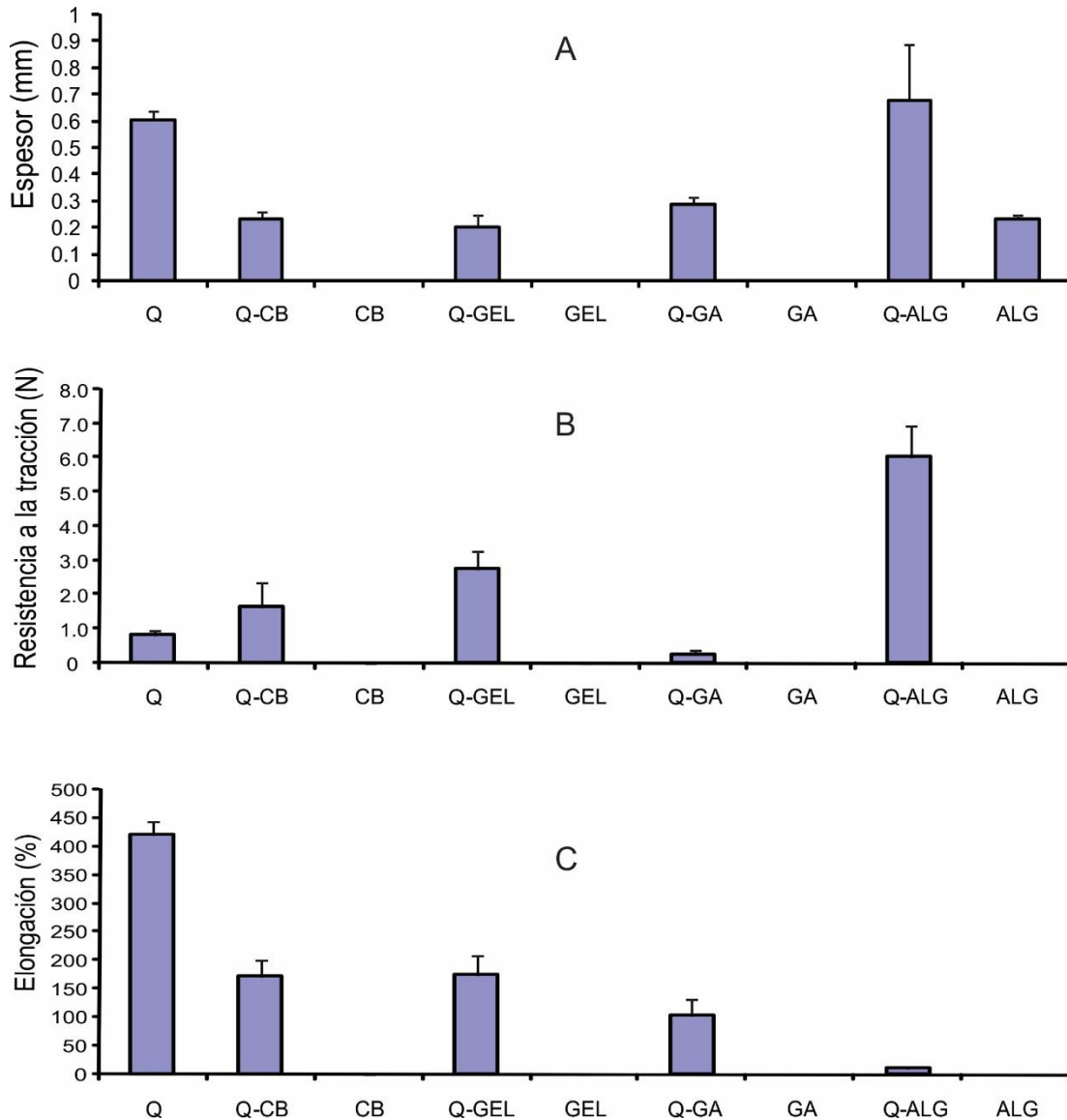
Las formaciones basadas en 100% de CB mostraron una alta adhesividad y flexibilidad, resultando difícil su manipulación. Además, las formulaciones basadas en 100% GEL y 100% GA resultaron extremadamente frágiles. Dado que los polímeros CB, GEL y GA por si mismos no fueron adecuados para formular matrices manipulables, sólo fue posible analizar su hinchamiento, pero no se analizaron las propiedades mecánicas de esas formulaciones.

Como se ha mencionado, las determinaciones de espesor son esenciales para evaluar la incomodidad que pueden llegar a producir estas matrices en un potencial paciente. El valor de espesor de las formulaciones osciló entre 0,20 y 0,70 mm (Figura 22A), el cual es un rango apropiado para matrices de aplicación bucal [69]. Sin embargo, se observó una variación significativa en el espesor de la formulación basada en Q-ALG, la que adicionalmente presentó rugosidad superficial, visualmente detectable. Este hecho podría deberse a las interacciones entre el ALG (polímero cargado negativamente y con alta densidad de carga) y el Q (polímero catiónico) [43].

Las formulaciones basadas en Q-CB, Q-GEL, Q-GA y 100% de ALG mostraron los valores de espesor más bajos ( $p < 0,05$ ). Las formulaciones cargadas y no cargadas con el fármaco exhibieron valores casi idénticos ( $p > 0,05$ ), demostrando que la presencia del NM no modifica el espesor de la matriz.

Como se ha mencionado, la resistencia al plegamiento es el número de veces que una matriz puede doblarse en el mismo lugar sin romperse ni agrietarse. Este ensayo se realizó con el fin de evaluar la flexibilidad de la matriz, de modo que la misma se pueda manipular fácilmente, ser de cómoda aplicación, y evitar su dislocación del sitio de aplicación o la ruptura de la misma durante la aplicación. Las formulaciones basadas en 100% ALG mostraron poca flexibilidad (se doblaron 10 veces antes de romperse), por lo tanto no cumplieron con el ensayo. El resto de

las formulaciones (cargadas o no con NM) se doblaron al menos 300 veces sin romperse, indicando una alta resistencia mecánica [99].



**Figura 22.** Caracterización de las formulaciones: A) Espesor, B) Resistencia a la tracción y C) Elongación

Los valores de resistencia a la tracción de las formulaciones basadas sólo en Q (Figura 22B) mejoraron significativamente cuando se combinó al mismo con CB, GEL y ALG ( $p < 0,05$ ). La interacción entre los polímeros aniónicos y el Q (por enlaces iónicos, electrostáticos y/o puentes de hidrógeno) puede producir la

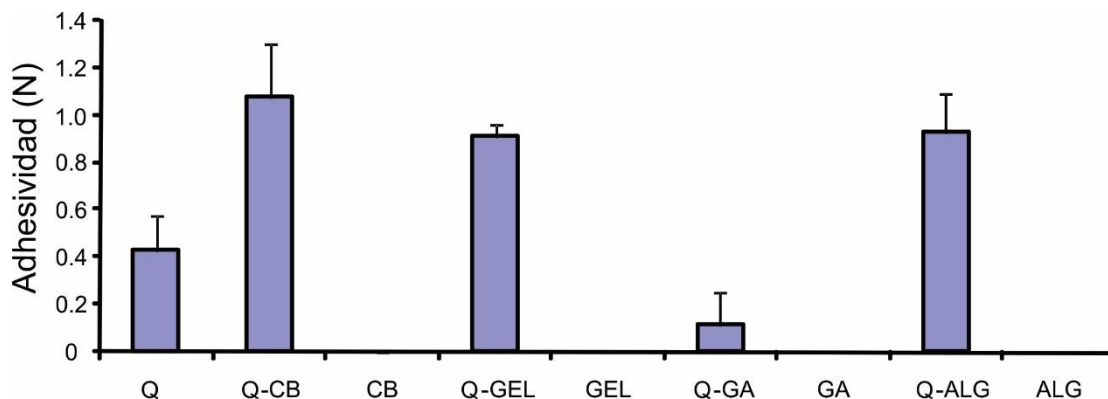
mejora en la resistencia a la tracción [100]. La elongación de las formulaciones basadas únicamente en Q disminuyó significativamente cuando el mismo se combinó con los polímeros aniónicos ( $p < 0,05$ ) (Figura 22C). Dentro de ellas, la combinación Q-ALG mostró el menor valor de elongación. Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos de espesor, resistencia al plegamiento, resistencia a la tracción y elongación, se puede sugerir que las formulaciones basadas en 100% Q, Q-CB y Q-GEL serían las matrices más adecuadas.

### **Adhesividad *in vitro***

Se realizaron pruebas mucoadhesivas *in vitro* para evaluar la capacidad de las matrices de adherirse a la encía. Los valores de adhesividad de las formulaciones se muestran en la Figura 23. Como se puede observar, la adhesividad de la matriz basada únicamente en Q aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) cuando el polímero se combinó con CB, GEL o ALG, mientras que al combinarlo con GA redujo la adhesividad de la formulación. El mayor aumento en la mucoadhesión se observó cuando el Q se combinó con CB. Hurler y colaboradores informaron que las soluciones de CB y Q presentan una bioadhesividad similar entre sí [101]. Sin embargo, en este trabajo, las matrices de CB no fueron analizadas ya que, como se ha mencionado, cuando las soluciones se secaron para obtener las formulaciones, aquellas basadas únicamente en CB mostraron tanto adhesividad a las placas de Petri como flexibilidad extremadamente altas, haciéndolas difíciles de manipular y de analizar. Como se ha mencionado, ha sido reportado que el Q debido a estar cargado positivamente podría interactuar con la mucina (cargada negativamente) por medio de interacciones electrostáticas y también mediante interacciones hidrófobas, siendo responsable de su adhesividad [74]. Adicionalmente, los polímeros aniónicos interactúan con las zonas cargadas positivamente en el mucus [102].

En el caso de las matrices basadas en polímeros de carga opuesta, parte de las cargas de los polímeros formadores de la matriz se encontrarían interactuando entre sí y parte se encontraría disponible para interactuar con la mucosa. Los resultados del análisis de mucoadhesividad de las formulaciones

indican que la presencia de grupos funcionales cargados en las cadenas poliméricas le confieren a estas matrices un marcado efecto adhesivo respecto a la matriz únicamente basada en GA que presenta baja densidad de carga.

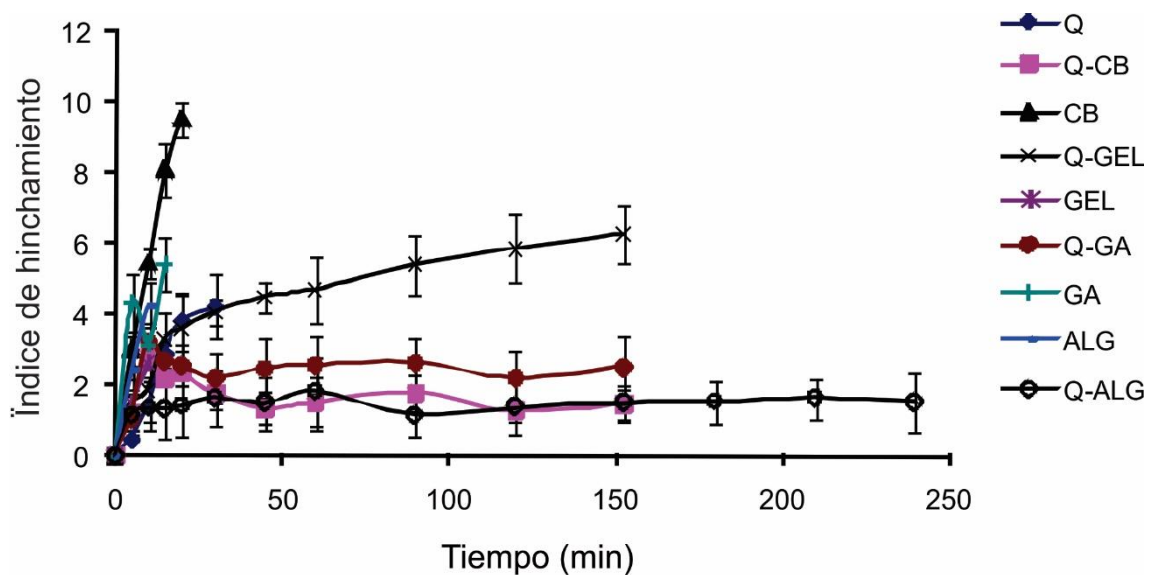


**Figura 23.** Adhesividad in vitro de las diferentes formulaciones

### Índice de hinchamiento

Las matrices se hincharon mostrando diferente comportamiento según el polímero empleado para la preparación, o la combinación de polímeros utilizados en las formulaciones (Figura 24). Las formulaciones basadas en 100% CB (índice de hinchamiento 9,5), ALG (índice de hinchamiento 8,4) o GEL (índice de hinchamiento 6,3), se desintegraron después de 30, 10 y 10 min respectivamente. La formulación basada en 100% Q (índice de hinchamiento 4,2) se desintegró después de 30 min. Las formulaciones basadas en polímeros con mayor densidad de carga opuesta (Q-ALG y Q-CB) mostraron el índice de hinchamiento más bajo: 1,5 y 1,7 respectivamente, y se desintegraron entre 150 y 240 min. Finalmente, las formulaciones basadas en Q-GEL y Q-GA se desintegraron a los 150 min y mostraron un índice de hinchamiento de 6,2 y 2,8 respectivamente. Como se observó, el hinchamiento está fuertemente gobernado por la combinación de los polímeros empleados en el desarrollo de la matriz. La desintegración de las matrices formuladas a partir de un único polímero fue rápida (Figura 24) por lo tanto estos sistemas no son adecuados para la administración controlada de

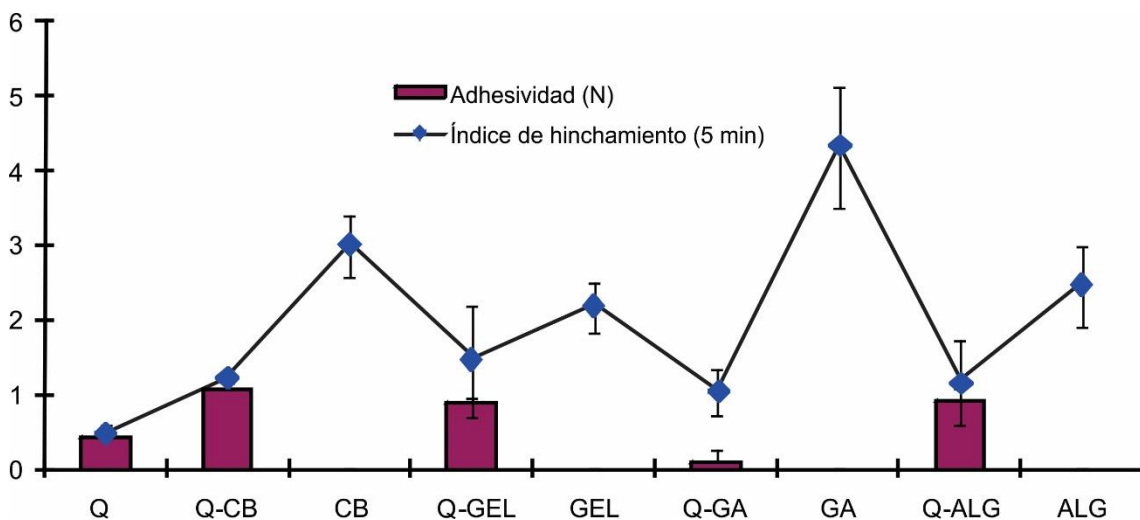
fármacos. Sin embargo, la combinación entre el Q y la GEL retrasa la desintegración más de cinco veces en comparación a las matrices formadas a partir de un único polímero. Las matrices basadas en Q-GA y Q-CB mostraron resultados similares, mientras que las formulaciones basadas en Q-ALG persistieron sin desintegrarse durante los 240 min del ensayo. La combinación de Q con GEL, GA, CB y ALG produjo un menor índice de hinchamiento y un aumento importante en el tiempo de desintegración. Es posible postular que las interacciones iónicas entre las moléculas producen una unión fuerte y no covalente entre los polímeros formadores de la matriz, esto generaría matrices con menor afinidad por los fluidos y por lo tanto presentarían menor capacidad de hinchamiento, lo que sería adecuado para no producir molestias al potencial paciente.



**Figura 24.** Índice de hinchamiento de las diferentes formulaciones

Además, se observó una relación entre los valores de adhesividad y el hinchamiento a los 5 min (Figura 25). Peh y Wong han informado que el hinchamiento del polímero es un factor importante en su comportamiento adhesivo [61]. En las matrices basadas en un único polímero cargado puede ocurrir un efecto de “súper absorción” ya que sus grupos carboxilo y amino libres desempeñan un papel importante en la captación de agua [83]. Por otro lado, en las

formulaciones basadas en combinaciones entre polímeros con carga opuesta, los grupos amino del Q interactúan con los grupos carboxílicos de los polímeros aniónicos. Estas interacciones probablemente reducen el número de grupos amino y carboxilos libres, disminuyendo así la capacidad de retención de agua de estas matrices y aumentando el tiempo de desintegración. En la Figura 25 se puede observar que la adhesividad aumentó con el grado de hidratación de los polímeros a los 5 min de ensayo. Sin embargo, el exceso de hidratación observado en las matrices formuladas sólo con CB, GEL, GA y ALG (índice de hinchamiento mayor a 2) produjo la pérdida completa de adhesividad en estas matrices, probablemente debido al desprendimiento originado en la interfaz “polímero/tejido” por la formación de un gel sin propiedades adhesivas [61, 76].



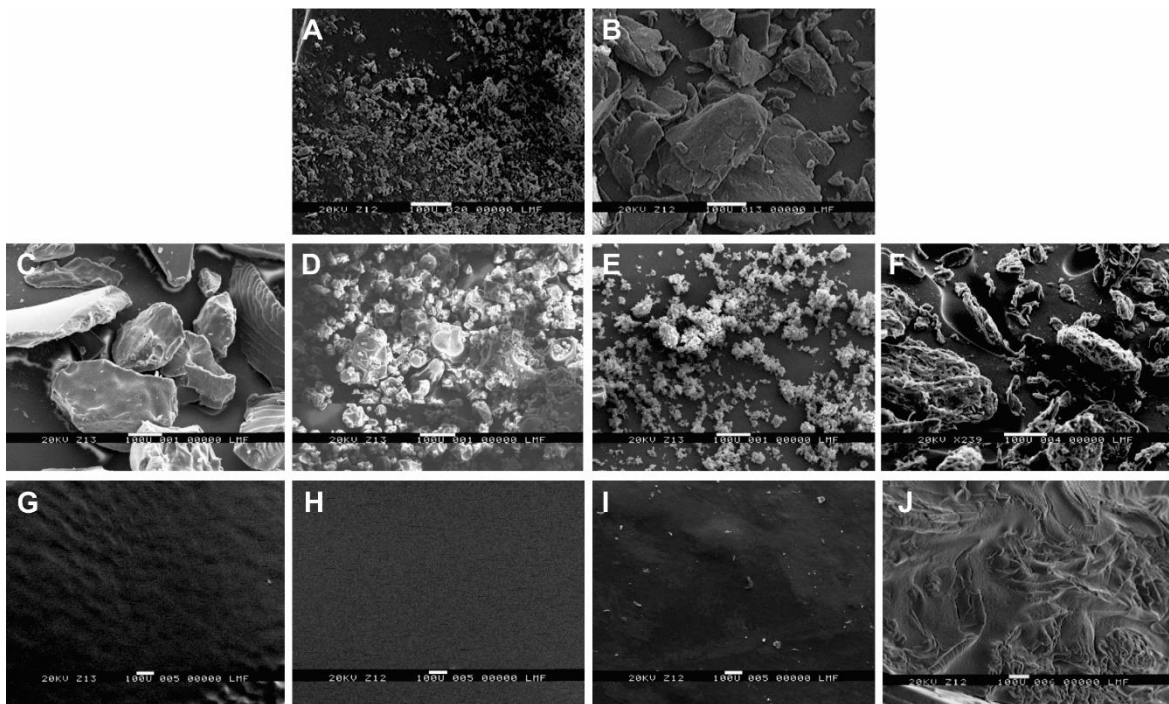
**Figura 25.** Relación entre la adhesividad y el índice de hinchamiento a los 5 min

### Microscopía electrónica de barrido

En la Figura 26 se presentan las imágenes obtenidas por MEB del NM, los polímeros y la vista superficial de las matrices basadas en Q-GEL, Q-GA, Q-CB y Q-ALG. El NM (Figura 26A) se observó cómo pequeños cristales irregulares (10–20  $\mu\text{m}$ ). El Q presentó una morfología de bloques irregulares con tamaños entre 100–300  $\mu\text{m}$  y algunas partículas más pequeñas de 20 a 40  $\mu\text{m}$  (Figura 26B), la GEL

(Figura 26C, 100–500  $\mu\text{m}$ ), la GA (Figura 26D, 20–100  $\mu\text{m}$ ) y el CB (Figura 26E, 5–60  $\mu\text{m}$ ) aparecen como bloques con una superficie lisa, mientras que el ALG (Figura 26F, 50–300  $\mu\text{m}$ ) presenta una superficie rugosa con algunas partículas más pequeñas (20–60  $\mu\text{m}$ ).

La formulación basada en Q y GA mostró una superficie homogénea y lisa (Figura 26H), mientras que las formulaciones basadas en Q y GEL (Figura 26G) y Q y CB (Figura 26I) presentaron algunos signos de rugosidad. Por otro lado, la formulación Q-ALG obtenida por combinación de polímeros con alta densidad de carga opuesta presentan diferentes patrones de rugosidad y cavidades (Figura 26J). Es importante señalar que en las formulaciones Q-GA, Q-GEL y Q-CB, se observa una estructura densa y compacta, sugiriendo una alta integridad estructural y una buena compatibilidad entre los componentes [103].



**Figura 26.** Microscopía electrónica de barrido. A) NM, B) Q, C) GEL, D) GA, E) CB, F) ALG, G) Sección superficial de las matrices G) Q-GEL, H) Q-GA, I) Q-CB y J) Q-ALG

## Espectroscopía infrarroja

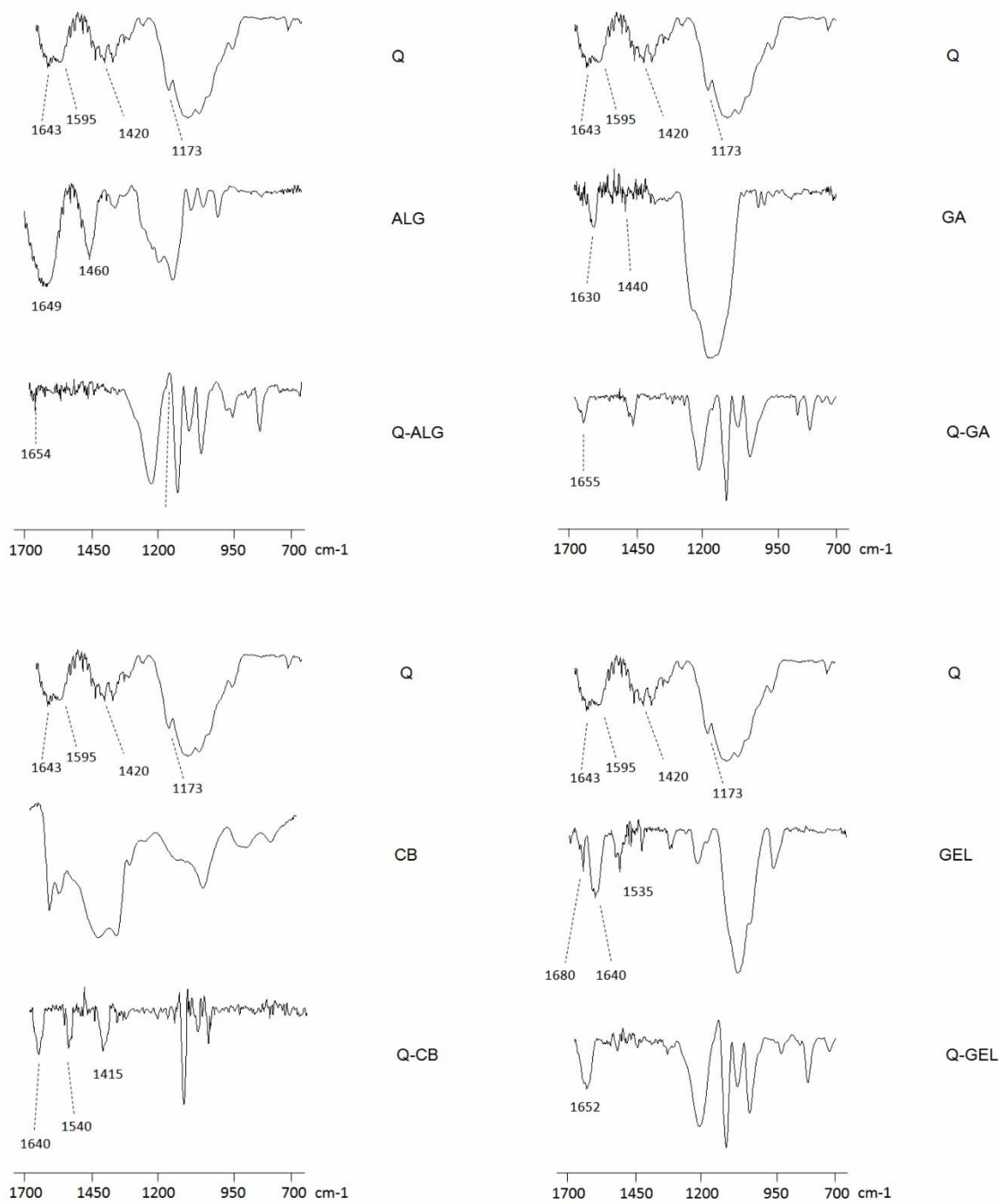
Las interacciones entre los polímeros se observaron a partir de los espectros IR entre 700 y 1700  $\text{cm}^{-1}$ . El espectro de Q mostró una banda ancha con un máximo a 3450  $\text{cm}^{-1}$ , asignada a la vibración de estiramiento de los grupos OH y NH asociados por enlace de hidrógeno intra e intermolecular; una banda de absorción característica a 2925  $\text{cm}^{-1}$  asignada a la vibración de estiramiento del enlace CH; una banda a 1643  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde a la amida I; y dos bandas fuertes a 1595  $\text{cm}^{-1}$  (flexión  $\text{NH}_2$ ) [104] y a 1420  $\text{cm}^{-1}$ , debido a la vibración de estiramiento de la sal de ácido carboxílico  $\text{COO}^-$  [82]; y finalmente una banda a 1173  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde a los grupos amino [105]. El espectro del ALG mostró vibraciones de estiramiento asimétricas y simétricas del carboxilato a 1649 y 1460  $\text{cm}^{-1}$ . La GA mostró dos bandas fuertes a 1630  $\text{cm}^{-1}$  y 1440  $\text{cm}^{-1}$  debido a la vibración de estiramiento asimétrica y simétrica de la sal de ácido carboxílico  $\text{COO}^-$  [82]. El espectro de la GEL mostró los picos de vibración de estiramiento de  $\text{COO}^-$  a 1680  $\text{cm}^{-1}$  y 1640  $\text{cm}^{-1}$  (banda de la amida I), mientras que la banda de amida II (NH vibración de flexión) se observó a 1535  $\text{cm}^{-1}$  [103, 107]. Finalmente, la banda de absorción del CB a 1708  $\text{cm}^{-1}$  se asignó a la vibración de estiramiento de  $\text{COO}^-$  de los grupos carboxílicos.

Todas las formulaciones basadas en la combinación de polímeros mostraron una banda ancha característica a 3348  $\text{cm}^{-1}$  en el espectro IR, correspondiente a los grupos OH de los polímeros, superpuesta a la banda de estiramiento de NH. Esta banda ancha se relaciona al enlace de hidrógeno involucrado en la interacción entre polímeros. La vibración de estiramiento CH se observó a 2926  $\text{cm}^{-1}$ . Los espectros de IR de las formulaciones basadas en polímeros con carga opuesta se modificaron significativamente en la región carbonilamida. En la Figura 27 se presentan los espectros acotados entre 700-1700  $\text{cm}^{-1}$  a fin de apreciar los desplazamientos producidos por las interacciones poliméricas más fácilmente.

Los grupos  $\text{NH}_3^+$  (banda de Q a 1595  $\text{cm}^{-1}$ ) y la vibración de estiramiento del  $\text{COO}^-$  asimétrico y simétrico a 1643  $\text{cm}^{-1}$  y 1420  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente, se desplazaron. Además, los picos de C-O de los polímeros aniónicos se desplazaron:

de 1649  $\text{cm}^{-1}$  a 1722  $\text{cm}^{-1}$  (ALG), de 1680  $\text{cm}^{-1}$  a 1718  $\text{cm}^{-1}$  (GEL), de 1708 a 1726  $\text{cm}^{-1}$  (CB), y de 1630 a 1714  $\text{cm}^{-1}$  (GA), indicando las interacciones entre los grupos  $\text{NH}_3^+$  del Q y los grupos  $\text{COO}^-$  de todos los demás polímeros [82, 103, 108]. Aunque varios trabajos han utilizado este cambio como indicador de la formación de complejos polielectrolíticos entre los polímeros formadores de las matrices, también se ha informado que los picos que aparecen alrededor de 1720, 1458, 1242 y 1121  $\text{cm}^{-1}$  podrían deberse al ácido láctico y/o al lactato residual utilizado para obtener las matrices [108]. Por lo tanto, otros cambios fueron analizados para asegurar que la formación de los complejos polielectrolíticos tuviese lugar.

El espectro Q-ALG (Figura 27) estuvo en concordancia con el obtenido por Li y colaboradores [105]. El pico de amida I se desplazó de 1643 a 1654  $\text{cm}^{-1}$ , y el pico del grupo amino (1173  $\text{cm}^{-1}$ ) se encontró ausente. Estos cambios sugieren la formación del complejo Q-ALG como resultado de la interacción iónica entre los grupos carbonilo cargados negativamente ( $\text{COO}^-$ ) del ALG y los grupos amino cargados positivamente ( $\text{NH}_3^+$ ) del Q [105]. El espectro de la formulación basada en Q-GA mostró que el pico de la amida I se desplazó de 1643 a 1655  $\text{cm}^{-1}$ . Los grupos  $\text{NH}_3^+$  y las vibraciones de estiramiento  $\text{COO}^-$  asimétricas y simétricas a 1595  $\text{cm}^{-1}$  y 1420  $\text{cm}^{-1}$  desaparecieron, indicando una interacción electrostática entre los grupos amino del Q ( $\text{NH}_3^+$ ) y los grupos carboxilo ( $\text{COO}^-$ ) de la GA, esto se encuentra en concordancia con datos reportados previamente [82]. De manera similar, el espectro de la formulación basada en Q-GEL mostró que el pico de amida I se desplazó de 1643 a 1652  $\text{cm}^{-1}$  y la banda de  $\text{NH}_3^+$  y la vibración de estiramiento  $\text{COO}^-$  simétrica y asimétrica a 1600  $\text{cm}^{-1}$  y 1420  $\text{cm}^{-1}$  desaparecieron, indicando una interacción electrostática entre los grupos amino del Q y los grupos carboxilo de la GEL. Finalmente, el espectro IR de la formulación basada en Q-CB mostró que el pico de 1595  $\text{cm}^{-1}$ , asignado a la banda de amina del Q, se desplazó a 1640  $\text{cm}^{-1}$ , indicando que el grupo amina estaba protonado en la matriz. Las bandas a 1540 y 1415  $\text{cm}^{-1}$  se asignaron al estiramiento simétrico y asimétrico del grupo  $\text{COO}^-$ , indicando que el complejo Q-CB se formó por una interacción electrostática entre el grupo  $\text{COO}^-$  del CB y el grupo  $\text{NH}_3^+$  del Q [109].

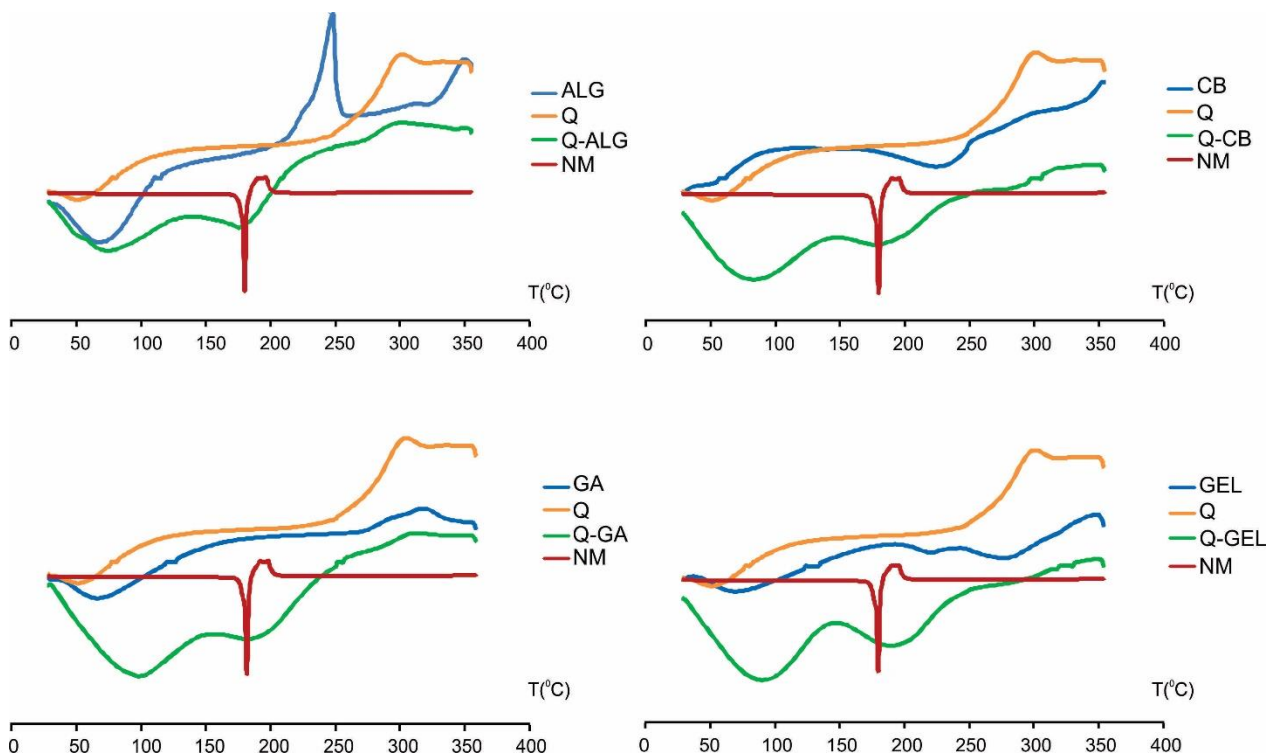


**Figura 27.** Espectros IR de los polímeros de partida y las formulaciones poliméricas

### **Análisis térmico diferencial**

El ATD para el NM, los polímeros y las diferentes formulaciones se muestran en la Figura 28. El NM presenta un pico endotérmico agudo a 186 °C

correspondiente al punto de fusión del fármaco en estado cristalino. El pico endotérmico del NM desapareció en los termogramas de las formulaciones, indicando que la concentración del fármaco se encuentra por debajo del límite de detección, o que el mismo se dispersó molecularmente en la matriz polimérica o que se transformó de un estado cristalino a un estado amorfo [86, 87].



**Figura 28.** Análisis térmico diferencial para el NM, los polímeros y las diferentes formulaciones poliméricas

Todos los polímeros mostraron un comportamiento térmico similar. Las curvas presentaron picos endotérmicos entre 40 y 60 °C, atribuidos a la pérdida de agua, seguidos de un pico exotérmico entre 250 y 300 °C, que corresponde a la degradación del polímero [110]. El contenido de agua en las matrices fue mayor que en los polímeros de partida y que en el fármaco. Durante la formulación de las matrices, se mezclaron soluciones de los diferentes polímeros y luego se secaron. Sin embargo, el proceso de secado no se llevó a cabo hasta el peso constante, ya

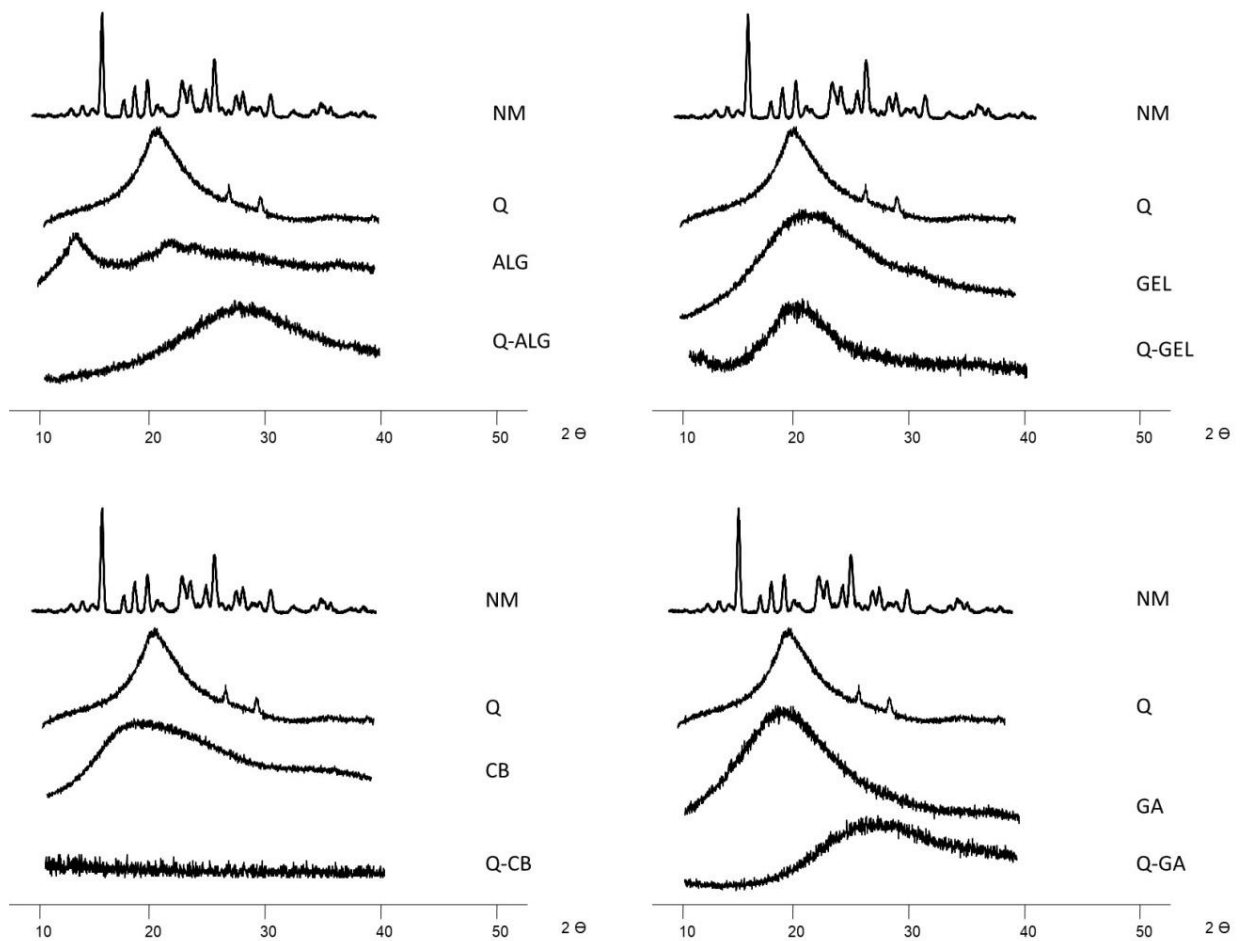
que si se hubiera hecho de esa manera, las propiedades mecánicas de las formulaciones (como la elongación y la flexibilidad, entre otras), se habrían reducido.

Las formulaciones basadas en polímeros de carga opuesta presentaron dos picos endotérmicos (80-100 °C y 150-210 °C), que pueden corresponder a la evaporación del agua unida en las matrices poliméricas. Se ha informado que pueden ocurrir tres tipos diferentes de interacciones entre el agua y los polímeros en los hidrogeles, las que presentan picos endotérmicos diferentes. El primer pico, en la región 40-60 °C, corresponde a la liberación de agua libre; el segundo, en la región 80-120 °C, corresponde a la liberación de agua unida a través de enlaces de hidrógeno; y finalmente, el tercer pico, más de 160 °C, está relacionado con la liberación de agua unida más estrechamente a través de interacciones polares con grupos carboxilato. Como se puede observar en la Figura 28, las formulaciones mostraron tener agua unida tanto a través de enlaces de hidrógeno como a través de interacciones polares con grupos carboxilato. Los análisis térmicos mostraron que todas las matrices fueron estables hasta 100 °C, siendo apropiado para las formulaciones que se aplicarán en la mucosa oral (37 °C). Finalmente, debe mencionarse que el pico a aproximadamente 300 °C, típico del Q puro, no se observó en las formulaciones basadas en polímeros con carga opuesta, indicando interacciones entre los polímeros que conforman las matrices. La desaparición de este pico ha sido considerada como una prueba de la interacción de los polímeros [110].

### **Difracción de rayos X**

El estudio de DRX se realizó para confirmar los resultados de los estudios térmicos y completar la caracterización de las formulaciones. Los patrones de DRX del NM, los polímeros y formulaciones se muestran en la Figura 29. El espectro del NM presentó picos agudos y estrechos en los ángulos de difracción ( $2\theta$ ): 13,05°, 14,49°, 15,59°, 16,22°, 18,55°, 20,80°, 21,57°, 22,95°, 25,19°, 26,15°, 27,32°, 29,9°, 31,82°, 33,12°, 36,6°, y 40,69°, mostrando un típico patrón cristalino [89, 90]. Por

otro lado, los DRX de las formulaciones no mostraron los picos correspondientes al NM cristalino. Esto concuerda con los resultados obtenidos por ATD, y permite postular que el NM estaría en un estado amorfo en las matrices o que la concentración del NM en las formulaciones está por debajo del límite de detección [91]. El Q mostró un pico de alrededor de 20° relacionado con cristales de Q anhidro [111]. El difractograma del ALG consistió en dos picos cristalinos a 13,7° y 23,0°. La GEL solo tuvo un pico cristalino típicamente ancho a 21,8° [112] mientras que la GA mostró un pico a 19,5° [113] y el CB a 18°[114].



**Figura 29.** Difractogramas del NM, los polímeros y formulaciones poliméricas

En los espectros de formulaciones basadas en polímeros con carga opuesta, el pico típico del Q desapareció, sugiriendo que la introducción de polímeros aniónicos interrumpe la estructura cristalina del mismo. Los grupos amino e hidroxilo del Q forman complejos con grupos carboxílicos de polímeros aniónicos, estos complejos pueden romper el enlace de hidrógeno generado entre los grupos amino y los grupos hidroxilo propios del Q, dando como resultado una estructura amorfa [112, 116].

### Estudio de disolución del IFA y liberación desde los sistemas

En la Tabla V se presentan los valores de disolución a los 30, 60, 90 y 120 min ( $Q_{30}$ ,  $Q_{60}$ ,  $Q_{90}$  y  $Q_{120}$ ) obtenidos para el NM y las diferentes formulaciones. Las matrices basadas en Q-GA, Q-GEL, Q-CB y Q-ALG mejoraron la velocidad de disolución del NM. El NM en polvo, sólo mostró un 23% de liberación después de 60 min de ensayo, mientras que las formulaciones cargadas con NM liberaron más del 99% del fármaco al mismo tiempo. La reducción del estado cristalino del NM o su pasaje a un estado amorfo sería la razón principal para la mejora en la liberación del fármaco desde las formulaciones.

**Tabla V.** Valores de liberación del fármaco después de 30, 60, 90 y 120 min

<b>Sistema</b>	<b><math>Q_{30}</math> (%)</b>	<b><math>Q_{60}</math> (%)</b>	<b><math>Q_{90}</math> (%)</b>	<b><math>Q_{120}</math> (%)</b>
NM	2±1	23±2	35±1	46±3
Q-GA-NM	52±2	99±3	99±2	99±3
Q-ALG-NM	69±4	99±1	99±2	100±2
Q-CB-NM	73±6	99±1	100±1	99±2
Q-GEL-NM	64±4	99±2	100±2	100±1

### **Actividad *in vitro* – Halo de inhibición**

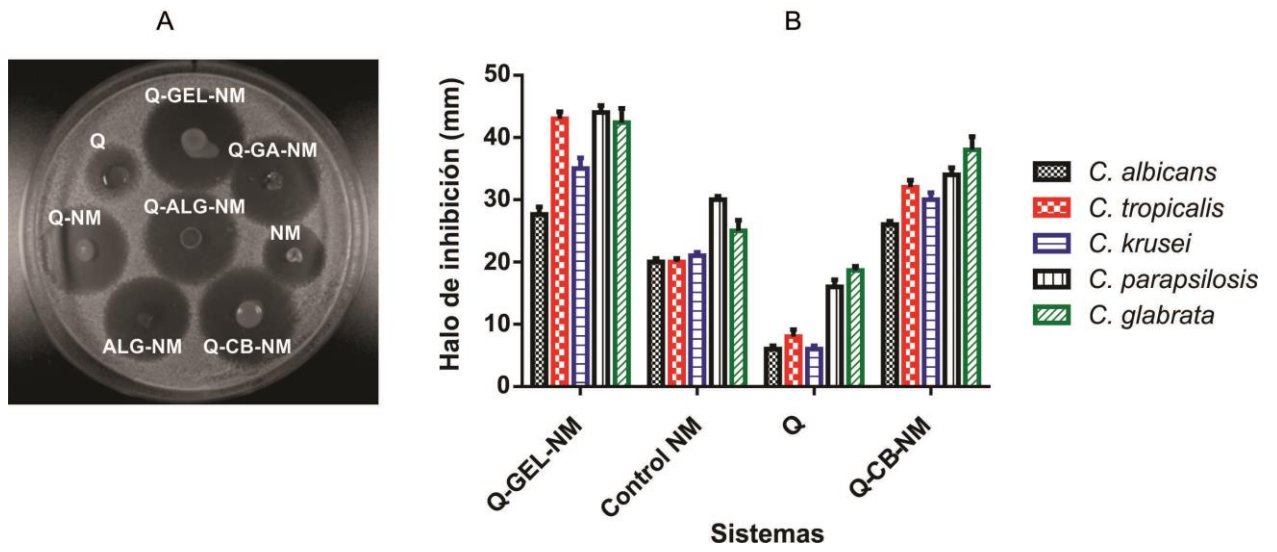
Una formulación basada sólo en Q y sin NM y un disco adhesivo conteniendo NM en polvo se emplearon como controles. La formulación basada en 100% Q mostró una zona de inhibición que podría explicarse por la actividad antimicrobiana previamente informada del polímero (Tabla VI), generando una matriz con propiedades antifúngicas. Ha sido reportado que la unión entre los grupos amino protonados del Q con moléculas de la superficie celular de los microorganismos cargadas negativamente es responsable de la actividad antimicrobiana del polímero [117, 118]. Este postulado está respaldado por los hallazgos de Seyfarth y colaboradores, quienes informaron que un derivado del Q que no presenta grupos amino protonables (la N-acetil-D-Dextrosamina quitosano) no produjo inhibición del crecimiento de *C. albicans* ni de *C. krusei* y que sólo redujo ligeramente el crecimiento de *C. glabrata* [118].

Las formulaciones cargadas con NM mostraron una mayor actividad después de 24 h de ensayo que el NM (fármaco en polvo) ( $p < 0,05$ ). Los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento obtenidos en los cultivos de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei* se presentan en la Tabla VI. Estos resultados muestran que todas las formulaciones permitieron la liberación del NM, y además, que el NM puede actuar en combinación con la actividad antimicrobiana propia del Q. La Figura 30A presenta la inhibición del crecimiento como áreas oscuras alrededor de las matrices para el cultivo de *C. glabrata*, y la Figura 30B muestra la comparación entre las actividades antifúngicas del fármaco puro, la formulación de Q sin NM, y las formulaciones Q-GEL-NM y Q-CB-NM. El análisis de varianza seguido de la prueba de Tukey mostraron diferencias significativas entre la actividad de la formulación Q-GEL-NM y el fármaco puro ( $p < 0,05$ ), y también entre Q-GEL-NM y la matriz basada en Q ( $p < 0,01$ ). La actividad del NM contra todas las levaduras ensayadas fue mayor que la de la matriz de Q ( $p < 0,05$ ). Dado que la matriz de Q sin NM no mostró una buena actividad contra *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* no se esperaron diferencias significativas entre el fármaco puro y las formulaciones Q-GEL-NM y Q-CB-NM. Sorprendentemente, ambas formulaciones (Q-GEL-NM y Q-CB-NM) mejoraron la actividad del NM ( $p < 0,05$ ).

Este hecho probablemente esté relacionado con la mayor disolución del NM cuando está en las formulaciones (Tabla V), pudiendo mejorar su difusión en el medio de agar. Este aumento en la difusión del NM puede explicar la mayor actividad de las formulaciones con respecto al fármaco en estudio. Por lo tanto, sería posible producir una nueva forma farmacéutica basada en una matriz polimérica que contenga Q y NM, que podría cargarse con una baja concentración de fármaco y, sin embargo, producir el mismo efecto terapéutico contra diferentes especies de *Candida*.

**Tabla VI.** Halos de inhibición (en mm) producidos por las distintas formulaciones en cepas de *Candida*

<b>Sistema</b>	<b><i>C. albicans</i></b>	<b><i>C. parapsilosis</i></b>	<b><i>C. tropicalis</i></b>	<b><i>C. krusei</i></b>	<b><i>C. glabrata</i></b>
Q-NM	32±2	35±3	36±2	35±3	33±2
Q-GEL-NM	27±3	44±2	43±2	35±3	43±3
Q-GA-NM	19±2	21±2	30±1	18±2	36±2
Q-ALG-NM	33±1	43±3	46±2	40±3	37±2
Q-CB-NM	26±1	34±2	32±2	30±2	37±2
ALG-NM	23±2	32±2	34±2	30±2	36±2
Control NM	19±1	30±1	20±1	21±1	25±3
Q	6±1	16±2	8±2	6±1	18±2



**Figura 30.** A) Halos de inhibición obtenidos sobre el cultivo de *C. glabrata*  
 B) Comparación entre las actividades antifúngicas del NM, Q sin fármaco, Q-GEL-NM y Q-CB-NM

## CONCLUSIONES

En este capítulo se desarrollaron nueve diferentes formulaciones cargadas con nitrato de miconazol empleando cinco polímeros con diferentes densidades de carga. El carbopol, la gelatina y la goma arábiga por sí mismos no fueron adecuados para formular matrices manipulables. La formulación basada en 100% de alginato mostró poca flexibilidad y se rompió durante el ensayo de plegamiento. La formulación basada en quitosano-alginato fue rígida, pudiendo producir molestias al potencial paciente. Por otro lado, la formulación basada en quitosano-goma arábiga presentó poca resistencia a la tracción y adhesividad, indicando que pueden sufrir una fácil dislocación del sitio de aplicación. Todas las formulaciones analizadas permitieron una disolución del nitrato de miconazol más rápida que la del fármaco puro, probablemente debido al estado amorfo del mismo en las formulaciones, confirmado por análisis térmico diferencial y difracción de rayos X. Se analizó la actividad antifúngica *in vitro* contra los cinco patógenos fúngicos oportunistas más importantes pertenecientes al género *Candida*, mostrando un aumento significativo en la actividad del nitrato de miconazol cuando se lo combinó con quitosano. En base a estos resultados, las formulaciones más apropiadas fueron aquellas basadas en quitosano-gelatina y quitosano-carbopol. Estas formulaciones mostraron buenas propiedades mecánicas y adhesividad, un índice de hinchamiento relativamente bajo, mejoraron la velocidad de liberación del fármaco y también mostraron una mayor actividad *in vitro* contra cultivos de diferentes especies de *Candida* respecto al nitrato de miconazol.

## CAPITULO III

*“Efecto de la incorporación del NM, suspendido  
o previamente solubilizado, en las  
características de las matrices poliméricas”*

# CONSIDERACIONES GENERALES PARA EL PRESENTE CAPITULO

Debido a que hemos encontrado gran cantidad de bibliografía que emplean al IFA de manera suspendida en las matrices poliméricas [120, 121] y otros trabajos que utilizan al IFA solubilizado en las mismas [68, 122, 123], decidimos en este trabajo de Tesis analizar la influencia de la forma de incorporación del fármaco modelo en la formulación de matrices poliméricas. Las matrices mucoadhesivas se basaron en la interacción de un polímero catiónico (Q) y diferentes polímeros aniónicos (C).

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Desarrollar matrices basadas en polímeros con carga opuesta adicionando al IFA previamente solubilizado (como se ha llevado a cabo en los capítulos anteriores) o de manera suspendida.
- Caracterizar físico-químicamente los sistemas preparados en cuanto: espesor, índice de hinchamiento, microscopía óptica, difracción de rayos X, espectroscopía infrarroja, análisis termogravimétricos, calorimetría diferencial de barrido y microscopía electrónica de barrido.
- Estudiar los sistemas obtenidos en cuanto a su adhesividad (en encías de cerdo), resistencia a la ruptura y elongación.
- Evaluar la liberación del IFA desde las matrices y la actividad de los sistemas mediante ensayos *in vitro* en cultivos de *C. albicans*.

# MATERIALES Y METODOS

## *Materiales*

Q (230 KDa de peso molecular promedio y 80,6% de N-deacetilación) fue suministrado por Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, EE. UU.),  $\kappa$ ,  $\iota$  y  $\lambda$ -C de grado alimentario fueron donados por FMC BioPolymer (Filadelfia, PA), y NM de grado farmacéutico (pureza del 99,49%) por Parafarm, (Buenos Aires, Argentina). Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

## *Métodos*

### **Preparación de las matrices**

Se preparó una solución de Q (3% p/v) dispersando el Q en una solución de ácido láctico al 10% v/v (pH = 2,67). Posteriormente, se añadió polisorbato 80 (Tween 80) en una concentración de 0,1% v/v a esta solución, con el fin de obtener una dispersión homogénea al agregar el IFA (en las matrices con el fármaco suspendido). En paralelo, se prepararon soluciones acuosas de  $\kappa$ ,  $\iota$  o  $\lambda$ -C (1% p/v) y se agitaron durante 24 h a fin de asegurar la completa disolución de los polímeros. Cada solución polimérica (10 mL) se goteó sobre la solución de Q (10mL) bajo agitación magnética a 80 °C para evitar la precipitación. Posteriormente, se añadió PEG 400 (30% p/p), empleado como plastificante, y se agitó a 200 rpm durante 2 h. Finalmente, se añadió NM (8% p/p) tamizado (tamiz de abertura de 840  $\mu$ m) a la mezcla y se agitó durante 2 min (formulaciones 8-14, Tabla VII). Las suspensiones resultantes se vertieron en placas de Petri y se secaron en estufa a 40 °C durante 48 h y 58% HR. Finalmente las matrices secas fueron retiradas de las placas de Petri para su caracterización.

**Tabla VII.** Composición de las formulaciones

Número	Formulación	Q	ι-C	κ-C	λ-C	NM (8% p/p)
1	Q	100%	-	-	-	-
2	ι-C	-	100%	-	-	-
3	Q-ι-C	75%	25%	-	-	-
4	κ-C	-	-	100%	-	-
5	Q-κ-C	75%	-	25%	-	-
6	λ-C	-	-	-	100%	-
7	Q-λ-C	75%	-	-	25%	-
8	Q-NM-SUS	100%	-	-	-	Suspendido
9	ι-C-NM-SUS	-	100%	-	-	Suspendido
10	Q-ι-C-NM-SUS	75%	-	25%	-	Suspendido
11	κ-C-NM-SUS	-	-	100%	-	Suspendido
13	Q-κ-C-NM-SUS	75%	-	25%	-	Suspendido
12	λ-C-NM-SUS	-	-	-	100%	Suspendido
14	Q-λ-C-NM-SUS	75%	-	-	25%	Suspendido
15	Q-NM-SOL	100%	-	-	-	Solubilizado
16	ι-C-NM-SOL	-	100%	-	-	Solubilizado
17	Q-ι-C-NM-SOL	75%	25%	-	-	Solubilizado
18	κ-C-NM-SOL	-	-	100%	-	Solubilizado
19	Q-κ-C-NM-SOL	75%	-	25%	-	Solubilizado
20	λ-C-NM-SOL	-	-	-	100%	Solubilizado
21	Q-λ-C-NM-SOL	75%	-	-	25%	Solubilizado

Se realizó un procedimiento similar, pero esta vez se solubilizó previamente el NM en PEG 400 como en los anteriores capítulos (agitación a 200 rpm durante 2 h) y luego se agregó a las soluciones poliméricas. La composición de las matrices

poliméricas empleando esta metodología se detalla en la Tabla VII (formulaciones 15-21).

Adicionalmente fueron preparadas como control las mismas matrices pero sin el agregado de NM (formulaciones 1-7, Tabla VII).

Cabe destacar que la concentración de NM empleada en este capítulo (8% p/p) fue mayor que en los capítulos anteriores y la concentración de polímeros menor (10 mL de Q (3% p/v) y 10 mL de C (1% p/v). Este hecho se debe a que se buscaron condiciones de trabajo que permitan evidenciar si existen diferencias entre las matrices cargadas con el fármaco suspendido o solubilizado.

### **Caracterización de los sistemas**

Se llevaron a cabo mediciones de espesor, resistencia al plegamiento, propiedades mecánicas, adhesividad *in vitro*, índice de hinchamiento (en este capítulo los tiempos predeterminados para retirar y pesar las muestras fueron 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 y 1440 min), DRX, MEB, estudio de disolución del IFA y liberación desde los sistemas (con toma de muestra a 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 180, 240, 300 y 360 min de ensayo) y actividad *in vitro* (Halo de inhibición) tal como se describió en el Capítulo I.

### **Microscopía óptica**

El análisis de la morfología superficial de las diferentes formulaciones se realizó con un microscopio óptico Mikoba S350 (Buenos Aires, Argentina) acoplado a una cámara DCM500 para la obtención de las imágenes digitales. El objetivo utilizado fue de aumento 40x.

## **Análisis térmicos**

El análisis termogravimétrico (ATG) se realizó con un analizador térmico TG HI-Res (TA Instruments) a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min desde temperatura ambiente hasta 650 °C en flujo de aire.

Las pruebas de CDB se realizaron utilizando un equipo Linseis DSC PT1000, de 25 a 250 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min bajo flujo de nitrógeno.

## **Actividad *in vitro* - Tiempo de muerte**

Las curvas de tiempo de muerte se realizan para evaluar el tiempo requerido por las diferentes formulaciones para erradicar un inóculo de *C. albicans* estandarizado. Previo a la realización de este ensayo se evaluó la concentración fungicida mínima (CFM) del NM; con la metodología que se describirá en el Capítulo V. Los organismos de prueba se incubaron con agitación en un medio de caldo de Sabouraud-glucosa que contenía las diferentes formulaciones (discos de 2,5 mm, o un contenido equivalente de NM en polvo como control). Se tomaron alícuotas a 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 min y 24 h, las mismas se diluyeron y se sembraron en una placa de agar Sabouraud-glucosa. Las placas se incubaron durante 24 h y se evaluaron las colonias viables. Las curvas de muerte se construyeron determinando el número de UFC/mL que sobrevivieron en cada tiempo en presencia y ausencia de las matrices o del NM sin tratamiento [124, 125].

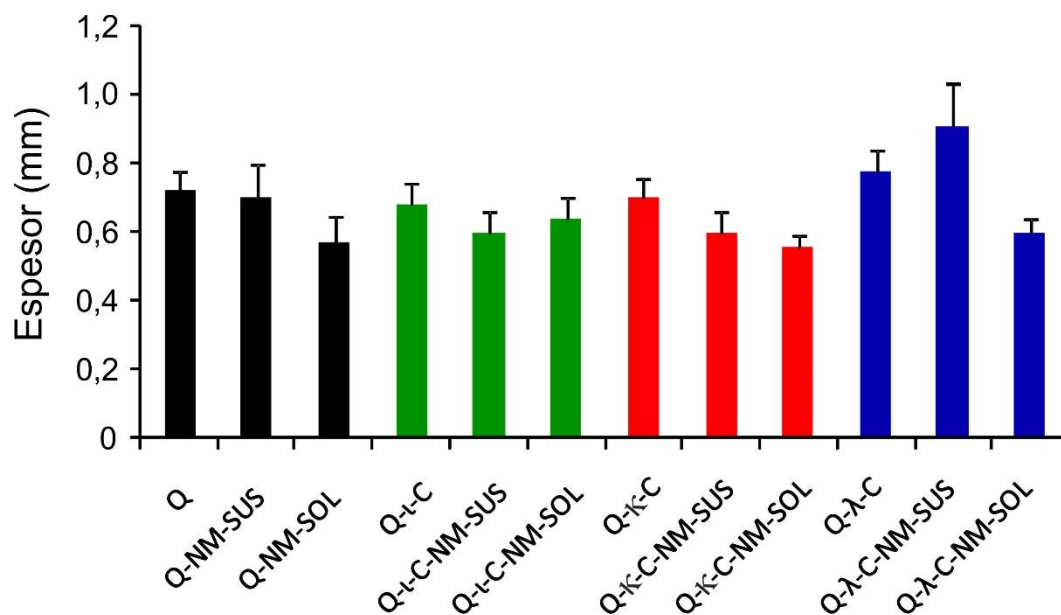
# RESULTADOS Y DISCUSION

## Espesor y resistencia al plegamiento

Las formulaciones basadas solo en  $\iota$ -C,  $\kappa$ -C y  $\lambda$ -C no pudieron ser analizadas. Las matrices basadas en 100% de  $\kappa$ -C fueron demasiado frágiles para ser manipuladas, mientras que las matrices basadas en 100% de  $\iota$ -C o 100% de  $\lambda$ -C fueron extremadamente elásticas y presentaron una muy elevada adhesividad a las placas de Petri, y por lo tanto estas formulaciones fueron descartadas.

Los espesores de las diferentes formulaciones (cargadas con NM y sin agregado de IFA) se presentan en la Figura 31. Como se puede observar, todas las formulaciones oscilaron entre  $0,55 \pm 0,08$  y  $0,93 \pm 0,05$  mm. Como se ha mencionado previamente, estos valores de espesor son adecuados para evitar molestias cuando se aplican en la encía del potencial paciente [69]. No se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre el espesor de las diferentes formulaciones. Por lo tanto, en base a estos resultados, se puede postular que la incorporación del fármaco en la matriz, ya sea como un sólido (formulaciones con fármaco suspendido) o como una solución (formulaciones con el fármaco solubilizado en el PEG 400), no afecta al espesor de la formulación.

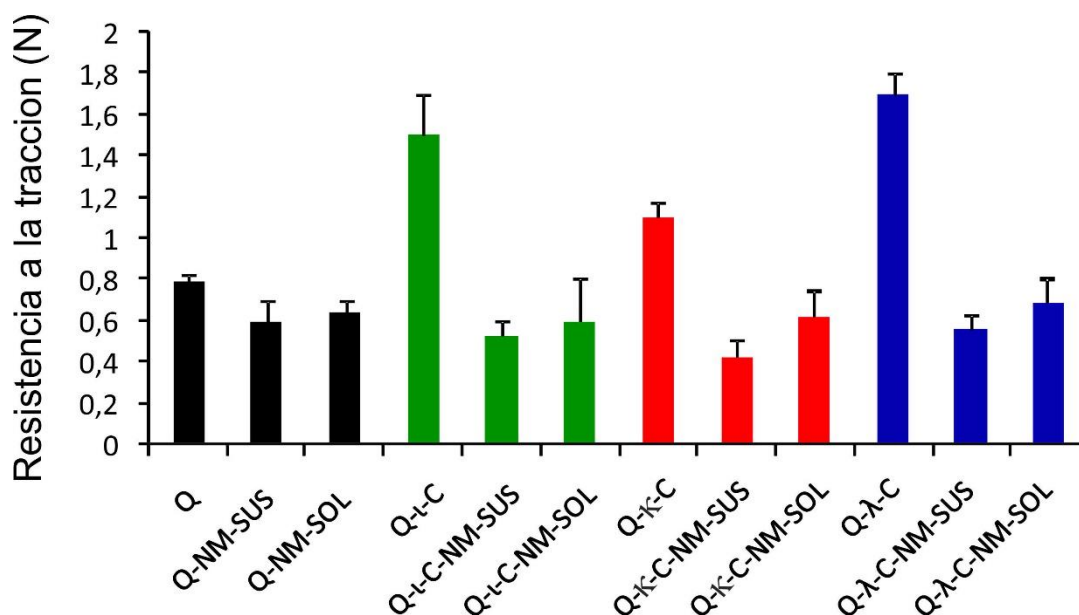
Con respecto a la resistencia al plegamiento, todas las formulaciones cargadas con NM y descargadas, se plegaron al menos 300 veces sin romperse, cumpliendo con los criterios del ensayo. Como se ha mencionado, este estudio se llevó a cabo para evaluar la flexibilidad de la matriz, lo cual es altamente deseable para evitar la dislocación de la misma de la encía o la ruptura de la formulación durante la aplicación, y también para garantizar que la misma se pueda manipular fácilmente para lograr una aplicación segura [99].



**Figura 31.** Espesor de las diferentes formulaciones

### Propiedades mecánicas

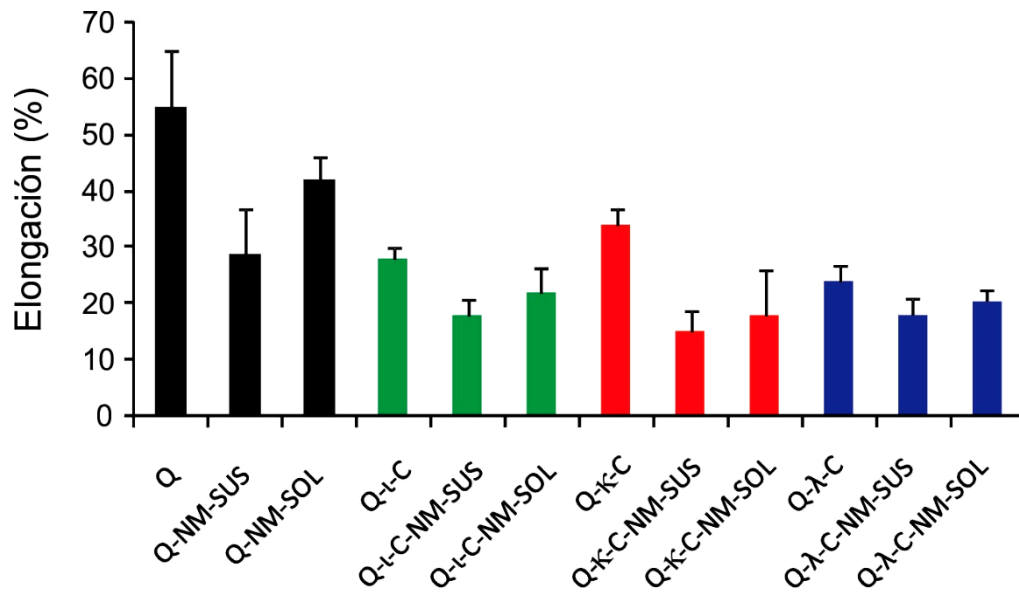
Cuando se analizó la resistencia a la tracción (Figura 32), se encontraron diferencias significativas entre las formulaciones de Q-C cargadas y no cargadas ( $p < 0,001$ ). Los valores de resistencia a la tracción de la formulación de Q sin IFA mejoró significativamente cuando se lo combinó con los Cs ( $p < 0,05$ ). En particular, la resistencia a la tracción de la formulación basada en Q- $\lambda$ -C fue la más alta, esto podría deberse al hecho de que el  $\lambda$ -C presenta tres grupos éster sulfato por unidad de galactosa, mientras que el  $\kappa$ -C presenta solo uno (Figura 9). Por lo tanto, hay más grupos aniónicos disponibles para interactuar con el Q mediante enlaces iónicos, electrostáticos y/o puentes hidrógeno, produciendo el aumento en la resistencia a la tracción. Por otro lado, no se encontraron diferencias entre las formulaciones donde el NM se encontraba suspendido o solubilizado. Sin embargo, se puede apreciar una tendencia que muestra una menor resistencia a la tracción para las formulaciones cargadas con el fármaco suspendido (Figura 32).



**Figura 32.** Resistencia a la tracción de las diferentes formulaciones

Las formulaciones basadas solo en Q fueron aquellas que presentaron mayor elongación aunque menor a las obtenidas cuando se realizaron las formulaciones de Q al doble de concentración (Capítulo II, Tabla I). La elongación de las diferentes formulaciones mostró una tendencia similar (Figura 33). Los valores, en porcentaje, de elongación fueron los más altos para las formulaciones sin fármaco, seguidas de las formulaciones cargadas con NM agregado de manera solubilizada y finalmente aquellas cargadas con el NM de manera suspendida. En los capítulos anteriores no se observaron diferencias entre las matrices cargadas y no cargadas en este ensayo (Tabla I). Las diferencias obtenidas en este caso se deberían al mayor porcentaje de NM y el menor porcentaje de polímeros empleados en la preparación de las matrices.

La elongación de la formulación de Q sin fármaco disminuyó significativamente cuando el Q se combinó con los polímeros aniónicos ( $p < 0,001$ ), dando matrices más rígidas. La elongación entre las formulaciones compuestas fue mayor para la combinación Q-κ-C y disminuyó con el aumento de las cargas negativas por unidades de galactosa en el C. Por lo tanto, cuantas más cargas estén disponibles, más interacciones habrá en la matriz y la elasticidad de la misma se verá disminuida.



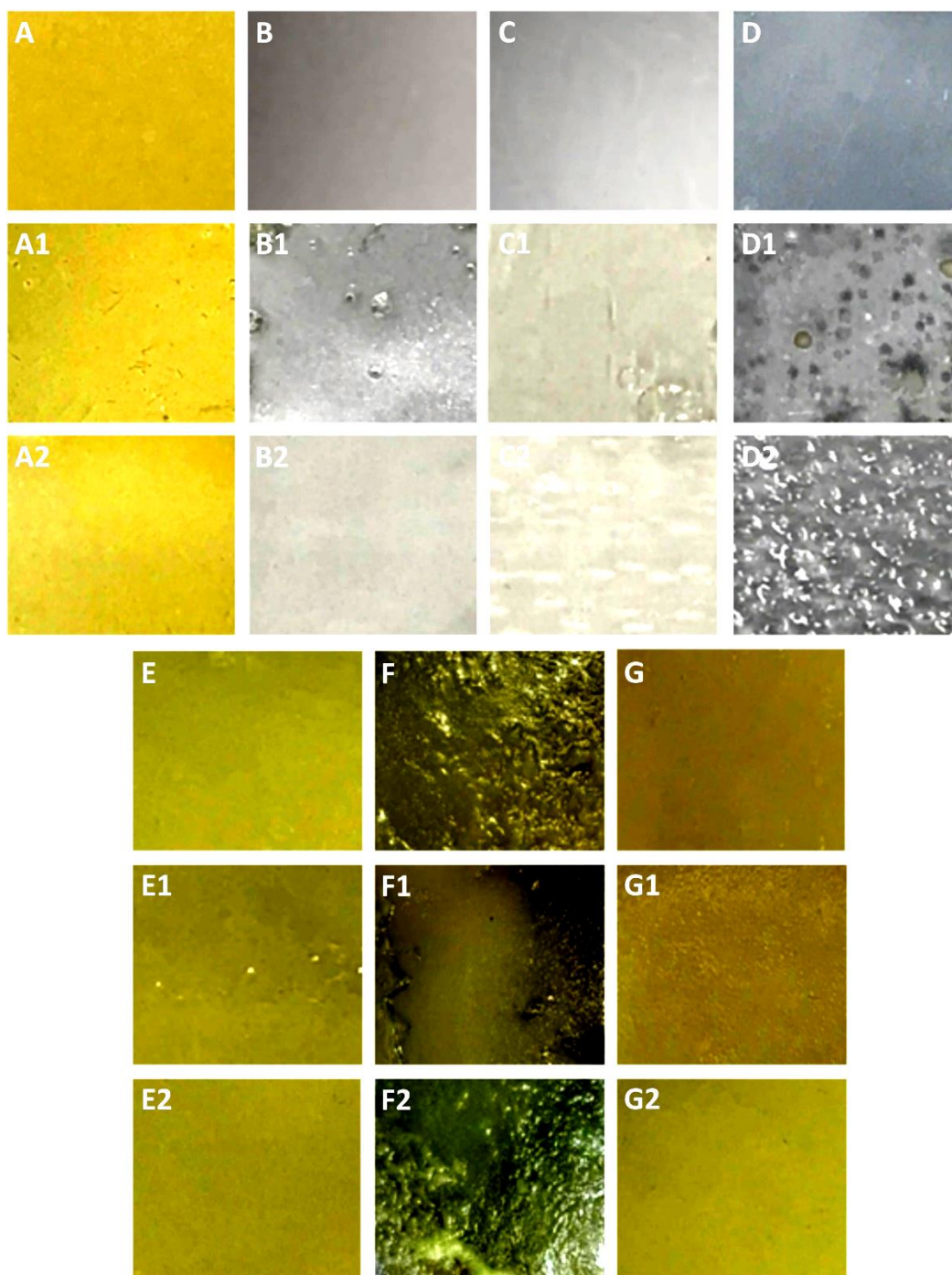
**Figura 33.** Porcentaje de elongación de las diferentes formulaciones

Las propiedades mecánicas deseadas de las matrices bucales variarán según los objetivos de formulación y el procedimiento aplicado. Como se ha mencionado, una matriz bucal ideal debe ser flexible, elástica, y suave pero suficientemente resistente para soportar la manipulación por parte del potencial paciente [125]. Por lo tanto, las matrices que muestren una resistencia a la tracción y una elongación relativamente altas serán las seleccionadas para dicha aplicación [76]. En este trabajo, como se mencionó anteriormente, la elongación se redujo cuando se combinó el Q con los diferentes carragenatos e incluso más cuando se incrementó el número de cargas aniónicas de los carragenatos (Figura 9), sin embargo esta reducción en la elongación probablemente podría resolverse aumentando la concentración del plastificante en las formulaciones. Suyatma y colaboradores analizaron el efecto de la adición de 0, 5, 20 y 40% p/p de PEG 400 como plastificantes a las matrices de Q y encontraron que el uso de PEG a una concentración del 40% p/p produjo la mayor flexibilidad de las matrices [126]. Por otro lado, también se ha informado que las concentraciones de plastificante por encima de un valor crítico pueden exceder el límite de compatibilidad con los biopolímeros y producir una separación de fase y como consecuencia la exclusión del plastificante de la mezcla [71]. Por lo tanto, la concentración de plastificante se

puede aumentar pero solo hasta ciertos límites para ser compatible con los polímeros.

### **Microscopía óptica**

La morfología superficial de las diferentes matrices desarrolladas se observó y analizó por microscopía óptica. Las formulaciones basadas solo en Q mostraron una superficie lisa y homogénea (Figura 34A). Un comportamiento similar se observó en las formulaciones basadas en combinaciones Q- $\kappa$ -C (Figura 34E) y Q- $\lambda$ -C (Figura 34G). Por otro lado, la matriz basada en Q- $\iota$ -C presentó una superficie rugosa, irregular y no uniforme (Figura 34F). Esto se debe probablemente a las fuertes interacciones entre las cargas positivas del Q y las cargas negativas de las estructuras helicoidales del  $\iota$ -C. Tanto  $\kappa$ -C como  $\iota$ -C forman una red de dobles hélices tridimensionales, resultado de la reticulación de las cadenas espirales adyacentes que contienen grupos sulfato orientados hacia su parte externa, y por lo tanto están disponibles para interactuar con el Q [127]. Probablemente, los números de grupos sulfato (dos por disacárido) expuestos, en el caso de  $\iota$ -C, producen interacciones más fuertes con el Q que en el caso del  $\kappa$ -C (uno por disacárido). Por otro lado, en el  $\lambda$ -C, los grupos sulfato están orientados hacia la parte interna, pudiendo evitar las fuertes interacciones con el Q [127]. La formulación basada en Q- $\iota$ -C presentó su superficie irregular y no uniforme, demostrando cierto grado de interacciones no homogéneas entre los polímeros. Esto podría generar resultados irreproducibles, en consecuencia, sólo las formulaciones basadas en 100% Q y las combinaciones con  $\kappa$ -C y con  $\lambda$ -C fueron seleccionada para estudios adicionales.

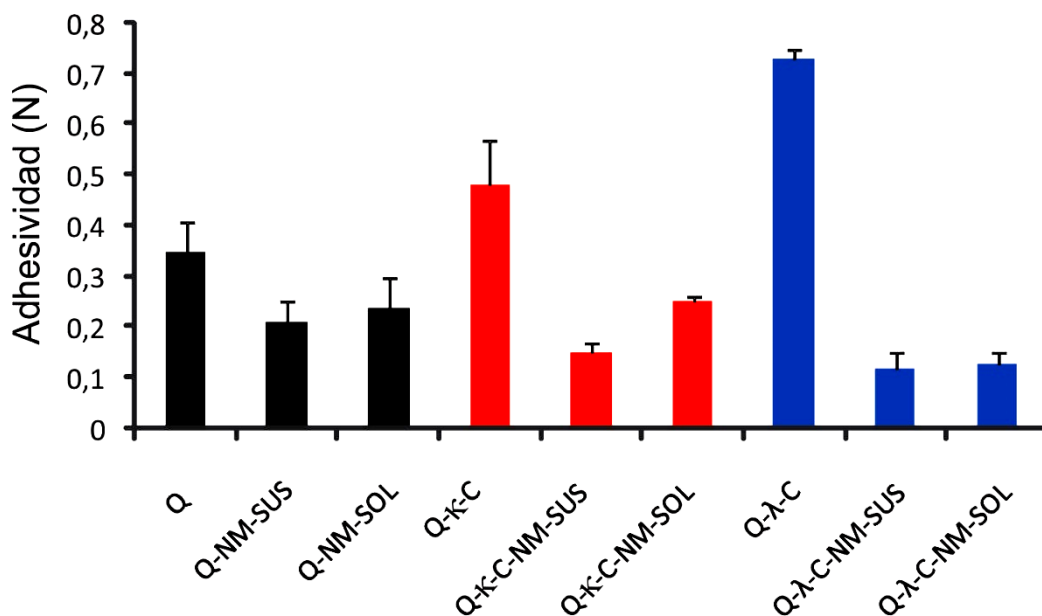


**Figura 34.** Morfología de la superficie de las matrices. A) Q, B)  $\kappa$ -C, C)  $\iota$ -C, D)  $\lambda$ -C, A1) Q-NM-SUS, B1)  $\kappa$ -C-NM-SUS, C1):  $\iota$ -C-NM-SUS, D1)  $\lambda$ -C-NM-SUS, A2) Q-NM-SOL, B2)  $\kappa$ -C-NM-SOL, C2)  $\iota$ -C-NM-SOL, D2)  $\lambda$ -C-NM-SOL, E) Q- $\kappa$ -C, F) Q- $\iota$ -C, G) Q- $\lambda$ -C, E1) Q- $\kappa$ -C-NM-SUS, F1) Q- $\iota$ -C-NM-SUS, G1): Q- $\lambda$ -C-NM-SUS, E2) Q- $\kappa$ -C-NM-SOL, F2) Q- $\iota$ -C-NM-SOL, G2) Q- $\lambda$ -C-NM-SOL

## **Adhesividad *in vitro***

Los valores de adhesividad de las diferentes formulaciones se presentan en la Figura 35. El valor de mucoadhesividad obtenido para el Q descargado fue de 0,35 N similar a los valores publicados previamente [128]. Como se observó, las formulaciones basadas en las combinaciones de polímeros sin IFA en su interior mejoraron la adhesividad del Q ( $p < 0,05$ ). Esto podría deberse al hecho de que hay más grupos presentes en las formulaciones para interactuar con la mucosa, acrecentándose más en el caso de  $\lambda$ -C que en el caso de  $\kappa$ -C. Por lo tanto, la formación de enlaces de hidrógeno fuertes e interacciones iónicas entre los grupos funcionales del polímero y la mucosa tienen un claro efecto sobre la mucoadhesión. Además, se ha informado que el agua interactúa con las cadenas de polímeros relajando la matriz polimérica, lo que mejora la interacción con la mucina [129]. En el caso de Q- $\lambda$ -C, su alta densidad de carga podría ser el paso determinante en su comportamiento mucoadhesivo. Si bien hay interacciones entre el carragenato y el Q, probablemente también hay más cargas libres en estas matrices para interactuar con la mucina. Cuando se cargó NM, la mucoadhesividad de las matrices se redujo significativamente. Naffe y colaboradores informaron resultados similares cuando se cargó NM en parches bucales basados en diferentes polímeros, como carboximetilcelulosa sódica, quitosano, alcohol polivinílico, hidroxietilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa [130]. No se encontraron diferencias entre las matrices cargadas con NM solubilizado y suspendido; sin embargo, se puede observar una tendencia: las matrices cargadas con NM suspendido mostraron una menor adhesividad. Cuando se solubiliza NM en la matriz, las cargas de los polímeros pueden interactuar con el IFA, reduciendo las cargas disponibles para adherirse a la zona gingival. Por otro lado, cuando se suspendió al NM en la matriz, los cristales en la superficie de la misma probablemente redujeron el área superficial con capacidad mucoadhesiva. Como se puede observar en la Figura 35, los valores de fuerza mucoadhesiva de las matrices cargadas oscilaron entre 0,11 N y 0,25 N, demostrando que estas matrices poseen propiedades mucoadhesivas moderadas [76]. Es importante mencionar que la resistencia mucoadhesiva de las matrices poliméricas desarrolladas podría

mejorarse agregando algunos polímeros que presenten altas propiedades mucoadhesivas como goma guar, CB, Polycarbophil, o carboximetilcelulosa sódica a la matriz, para cumplir los requisitos de una película bucal ideal [76].

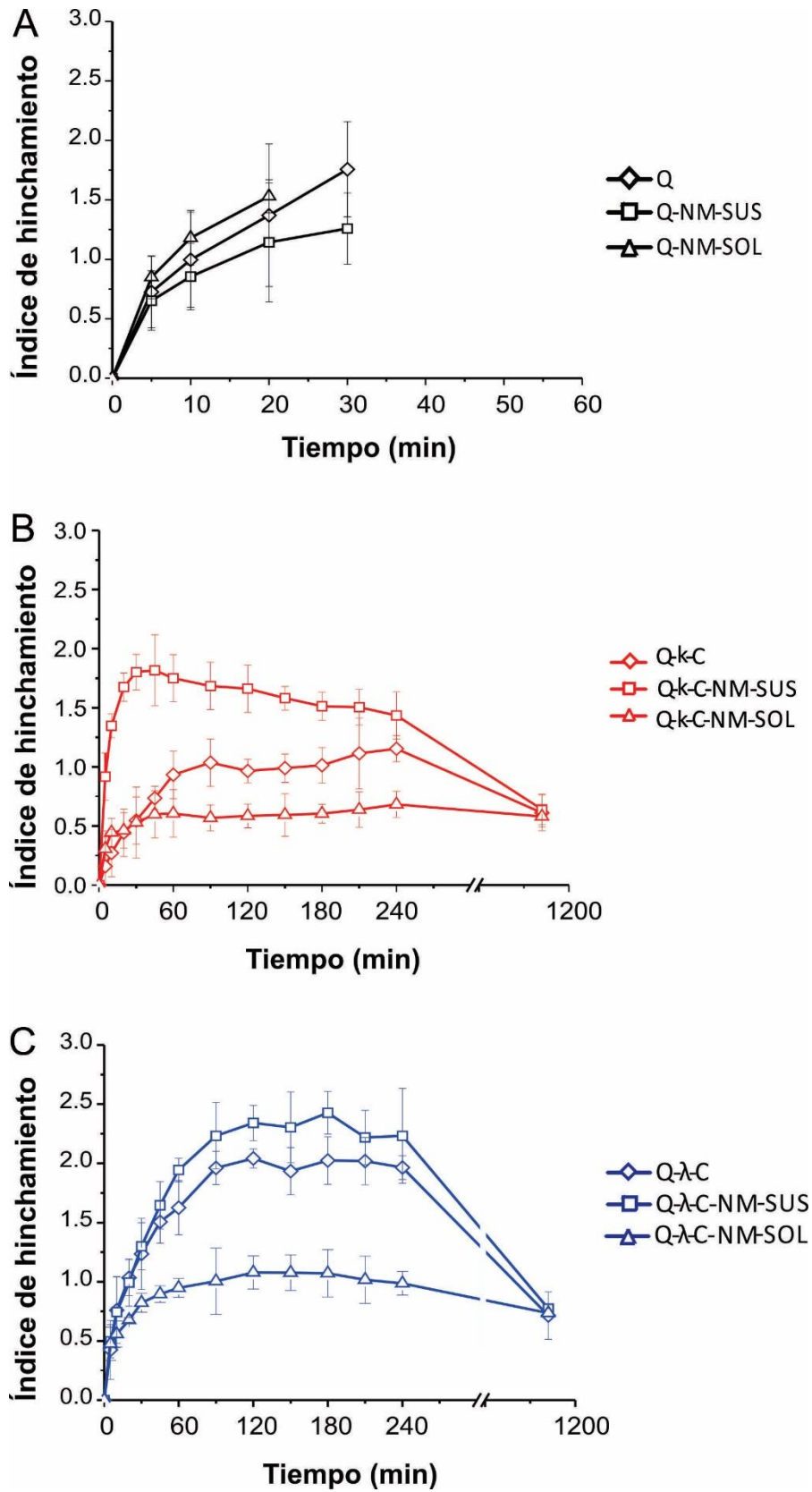


**Figura 35.** Adhesividad de las formulaciones seleccionadas

### Índice de hinchamiento

Las matrices mostraron diferentes índices de hinchamiento, según los polímeros utilizados en las formulaciones y la presencia de NM de manera suspendido o solubilizado (Figura 36). Las formulaciones basadas solo en Q se desintegraron después de 30 min (Figura 36). Por otro lado, en las formulaciones basadas en polímeros con densidades de carga opuesta se observó un bajo índice de hinchamiento y un aumento importante en el tiempo de desintegración. Todas las formulaciones basadas en combinaciones de polímeros se hincharon durante al menos 24 h sin sufrir desintegración. Después de 24 h, los valores del índice de hinchamiento fueron 0,71, 0,77 y 0,73 para Q-λ-C, Q-λ-C-NM-SUS y Q-λ-C-NM-SOL, respectivamente, mientras que para las formulaciones Q-κ-C, Q-κ-C-NM-SUS y Q-κ-C-NM-SOL, los valores obtenidos fueron 0,61, 0,64 y 0,58, respectivamente. A partir de estos resultados se puede postular que las interacciones iónicas entre las

moléculas indujeron una unión no covalente fuerte, lo que lleva a una matriz que es menos hinchable y que presentan una mejor estructura para administrar fármacos en la cavidad bucal. Entre las diferentes formulaciones, se pudo observar que aquellas que contienen  $\lambda$ -C mostraron valores de hinchamiento más altos que las que contienen  $\kappa$ -C. Esto podría explicarse por el hecho de que la conformación estructural de las matrices podría ser diferente. Como se mencionó anteriormente,  $\kappa$ -C forma una red de dobles hélices tridimensionales que resulta de la reticulación de las cadenas espirales adyacentes que contienen grupos sulfato orientados hacia su parte externa, y por lo tanto más disponibles para interactuar con el Q que los grupos sulfato presentes en  $\lambda$ -C (que están orientados hacia la parte interna, evitando así fuertes interacciones). Aunque las interacciones con Q produjeron matrices más rígidas (como se observa en la Figura 32), en el caso de  $\lambda$ -C, más cargas se encuentran libres de interactuar con la saliva artificial, mostrando un mayor grado de hinchamiento. Este resultado es consistente con el obtenido en el ensayo de adhesividad. Las matrices cargadas con NM suspendido mostraron el mayor grado de hinchamiento (incluso más que las formulaciones sin fármaco). Esto se debe probablemente al hecho de que la presencia de un material particulado altera la continuidad de la matriz polimérica, aumentando la superficie de la matriz expuesta al solvente [129]. En contraste, cuando las formulaciones se cargaron con NM previamente solubilizado, algunas de las cargas de las matrices podrían interactuar con el IFA, reduciendo el número de cargas libres disponibles para interactuar con el solvente, dando como resultado los valores de hinchamiento más bajos.

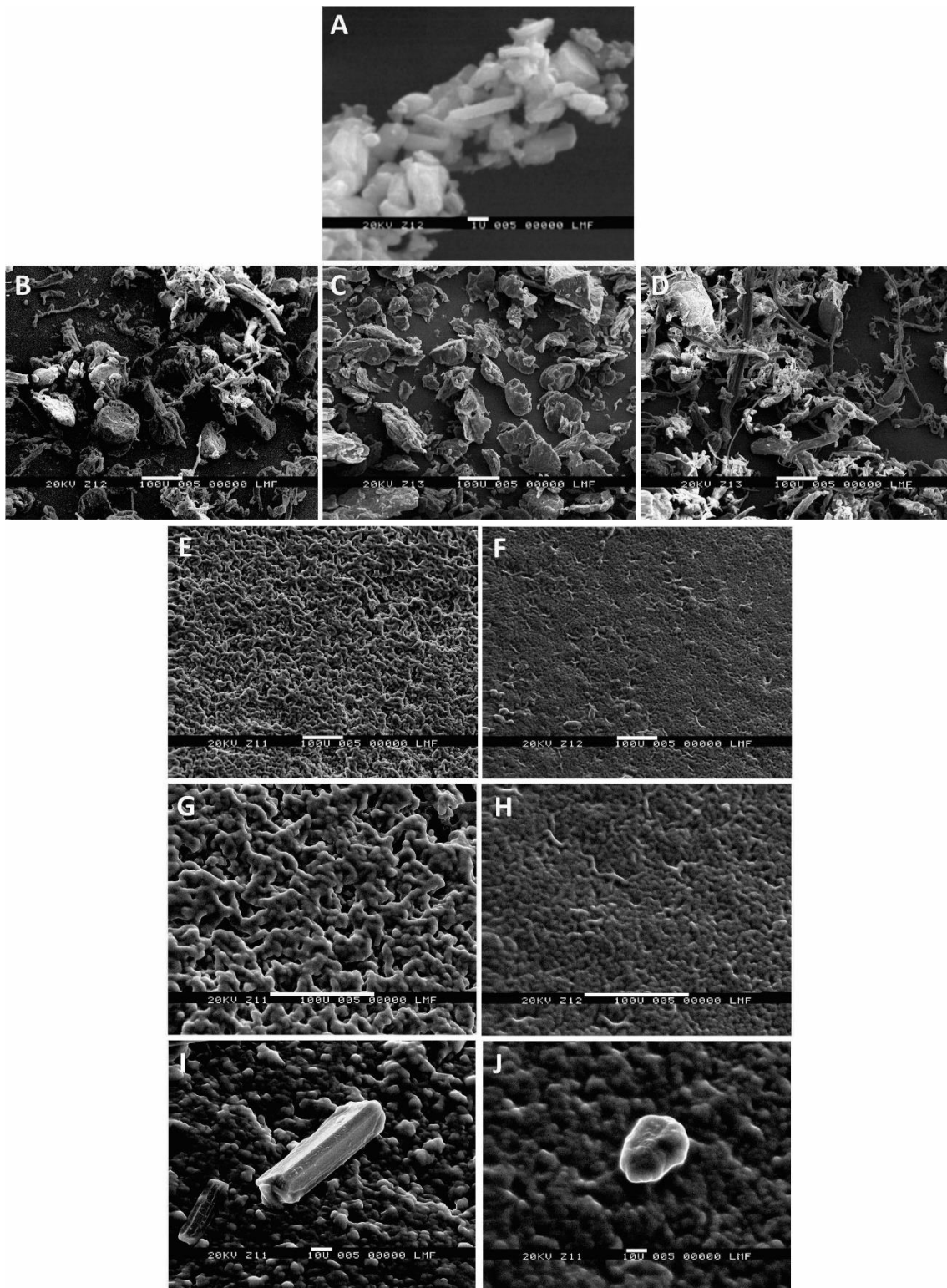


**Figura 36.** Índice de hinchamiento de las formulaciones seleccionadas sin IFA y con NM suspendido y solubilizado. A) Q, B) Q-κ-C y C) Q-λ-C

Como se mencionó anteriormente, las formulaciones basadas en 100% de Q mostraron el mayor grado de hinchamiento y se desintegraron entre 30 y 40 minutos luego de comenzar el ensayo. En el Q los grupos libres desempeñan un papel importante en la captación de agua debido a su naturaleza hidrofílica [102]. Por esta razón, este tipo de matrices no son adecuadas para el objetivo de este trabajo y, por lo tanto, se seleccionaron las combinaciones de Q- $\kappa$ -C y Q- $\lambda$ -C para su posterior análisis.

### **Microscopía electrónica de barrido**

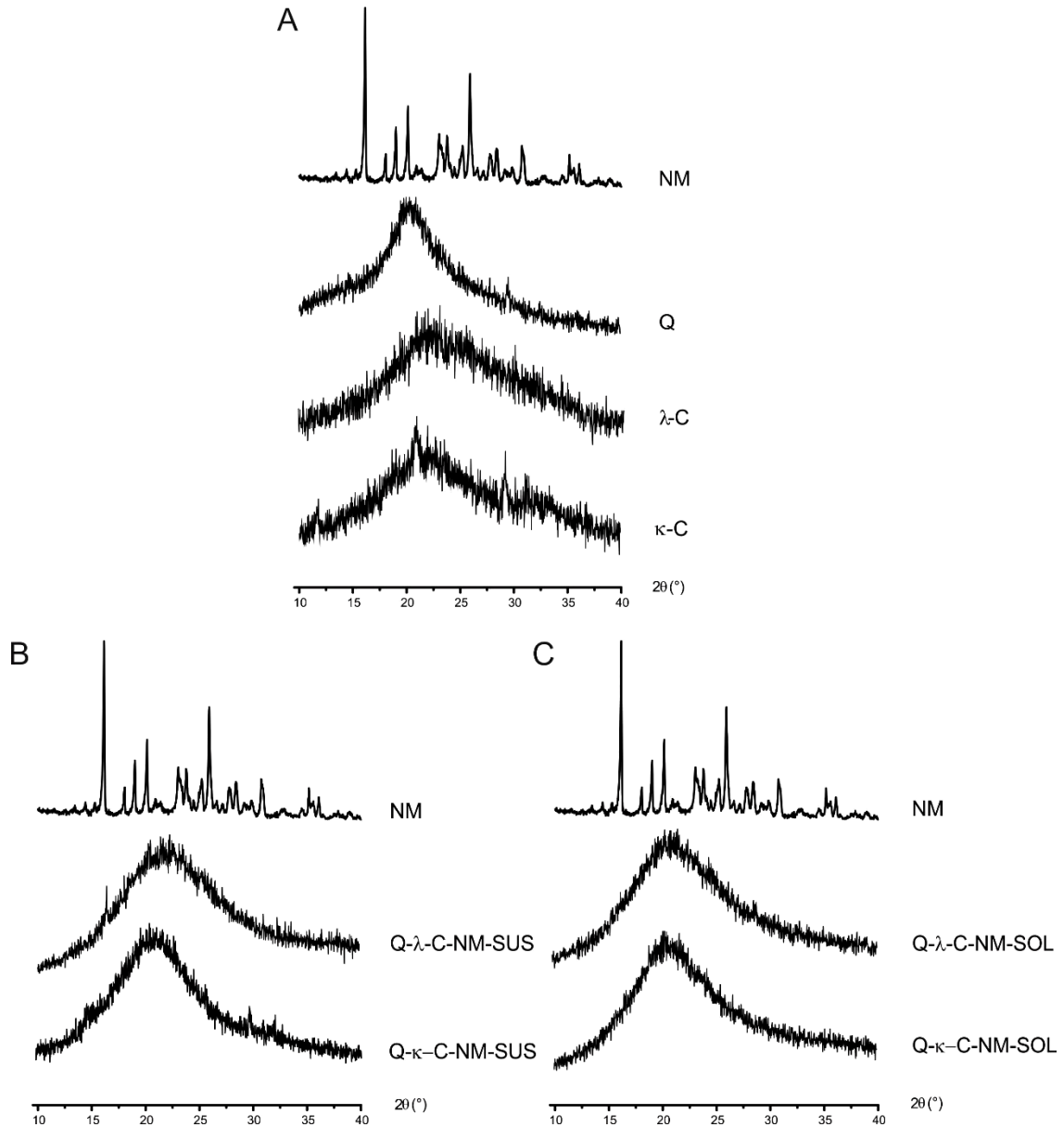
La morfología del NM, los polímeros Q,  $\kappa$ -C,  $\lambda$ -C y la vista superficial de las matrices basadas en combinaciones de polímeros se muestra en la Figura 37. El NM aparece como pequeños cristales irregulares (10–20  $\mu\text{m}$ , Figura 37A) mientras el Q (Figura 37C) son bloques (100–300  $\mu\text{m}$ ) que presentan una superficie lisa con partículas más pequeñas (20–40  $\mu\text{m}$ ). Finalmente,  $\kappa$ -C (Figura 37B) y  $\lambda$ -C (Figura 37D) aparecen como bloques irregulares y fibrosos (50–200  $\mu\text{m}$ ) con una superficie no uniforme. Aquellas formulaciones basadas en Q- $\kappa$ -C y Q- $\lambda$ -C fueron homogéneas, pero mostraron una superficie muy diferente. Mientras que la superficie de la formulación basada en Q- $\lambda$ -C-NM-SOL fue ligeramente rugosa (Figura 37F y 37H), aquella basada en Q- $\kappa$ -C-NM-SOL demostró ser rugosa con una superficie porosa y presentó una microestructura interconectada tridimensionalmente (Figura 37E y 37G). La interconexión entre poros podría asignarse a la formación de la red, probablemente debido a la conformación espacial de  $\kappa$ -C, exponiendo sus grupos sulfato orientados hacia su parte externa, pudiendo permitir una interacción fuerte pero no homogénea con Q. La formulación basada en Q- $\lambda$ -C mostró una estructura densa y compacta, sugiriendo una alta integridad estructural y una alta compatibilidad entre los componentes [103]. Cuando las formulaciones se cargaron con NM suspendido, se identificaron pequeños cristales del fármaco en la superficie de la matriz (Figura 37I y 37J); mientras que en el caso de formulaciones cargadas con NM solubilizado, no se observaron cristales.



**Figura 37.** Microscopía electrónica de barrido: A) NM, B)  $\kappa$ -C, C) Q, D)  $\lambda$ -C, E)-H) secciones superficiales de las formulaciones, E) y G) Q- $\kappa$ -C-NM-SOL, F) y H) Q- $\lambda$ -C-NM-SOL, I) : cristal de NM en Q- $\kappa$ -C-NM-SUS y J) cristal de NM en Q- $\lambda$ -C-NM-SUS

## Difracción de rayos X

El estudio de DRX se realizó para caracterizar el estado sólido del NM en las formulaciones poliméricas. Los difractogramas del NM, los polímeros formadores de matriz y las diferentes formulaciones se muestran en la Figura 38.



**Figura 38.** Difractogramas del NM, los polímeros formadores de matriz y las diferentes formulaciones

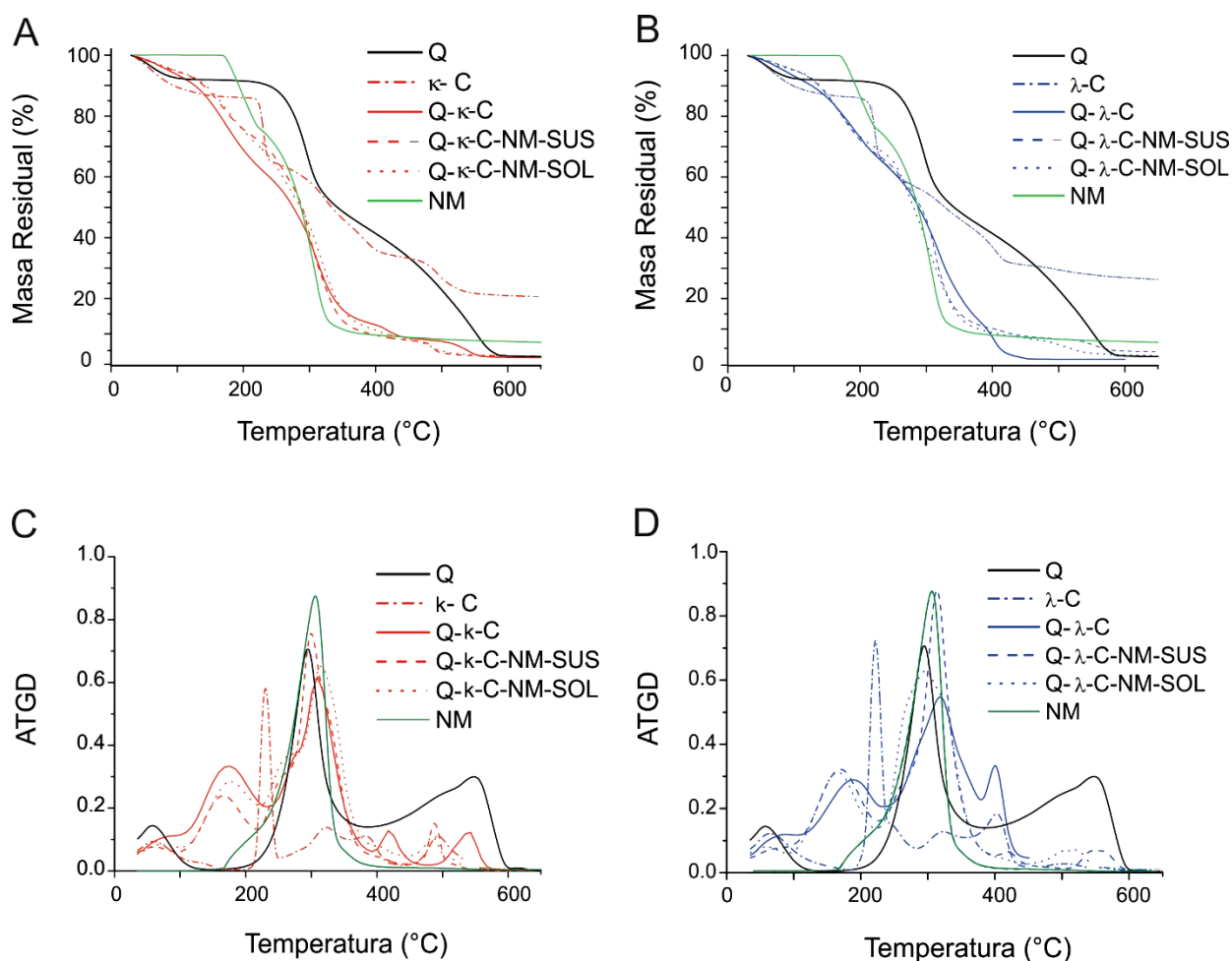
El difractograma del NM mostró un patrón cristalino típico con picos agudos y estrechos como fue descrito previamente. En el espectro del Q se observó un pico a alrededor de  $20^\circ$  relacionado con los cristales anhidros del polímero [111]. El  $\kappa$ -C presentó dos picos cristalinos a  $21^\circ$  y  $29^\circ$ , finalmente, el  $\lambda$ -C mostró una estructura amorfa (Figura 38A). Con excepción de la formulación Q- $\lambda$ -C-NM-SUS, que presentó un pequeño pico a  $16,22^\circ$  (Figura 38B), ninguna de las formulaciones desarrolladas evidenció señales correspondientes al NM en estado cristalino (Figura 38B y 38C).

La ausencia de picos en los difractogramas de las formulaciones puede sugerir que el NM se encontraría en un estado amorfo incluso en las matrices donde el IFA se suspendió, o que NM redujo parcialmente su cristalinidad durante la formulación de la matriz, o que la concentración de NM en las formulaciones es inferior al límite de detección [91]. Basado en el análisis visual (Figura 34) y los estudios de MEB, donde se observaron cristales en las formulaciones Q- $\kappa$ -C-NM-SUS y Q- $\lambda$ -C-NM-SUS (Figura 37I y 37J), la ausencia de picos en el caso de las formulaciones cargadas con NM de manera suspendida puede deberse a que la cristalinidad se haya reducido parcialmente o la concentración del fármaco en la matriz esté por debajo del límite de detección.

Por otro lado, en el caso de formulaciones cargadas con NM solubilizado, el fármaco podría estar en un estado amorfo. En todos los difractogramas de rayos X de las matrices basadas en polímeros de carga opuesta, el pico típico de Q se ensanchó y redujo su intensidad, sugiriendo que la introducción de polímeros aniónicos interrumpió su estructura cristalina. Se ha informado que los grupos amino e hidroxilo del Q forman complejos con polímeros aniónicos, que pueden romper el enlace de hidrógeno entre los grupos amino y los grupos hidroxilo propios del Q, dando como resultado una estructura amorfa [111]. De manera similar, en el caso del  $\kappa$ -C, sus dobles hélices tridimensionales resultantes de la reticulación de las cadenas espirales adyacentes que contienen grupos sulfatos orientados externamente podrían romperse por la presencia del Q, perdiendo su estructura cristalina.

## Análisis térmicos

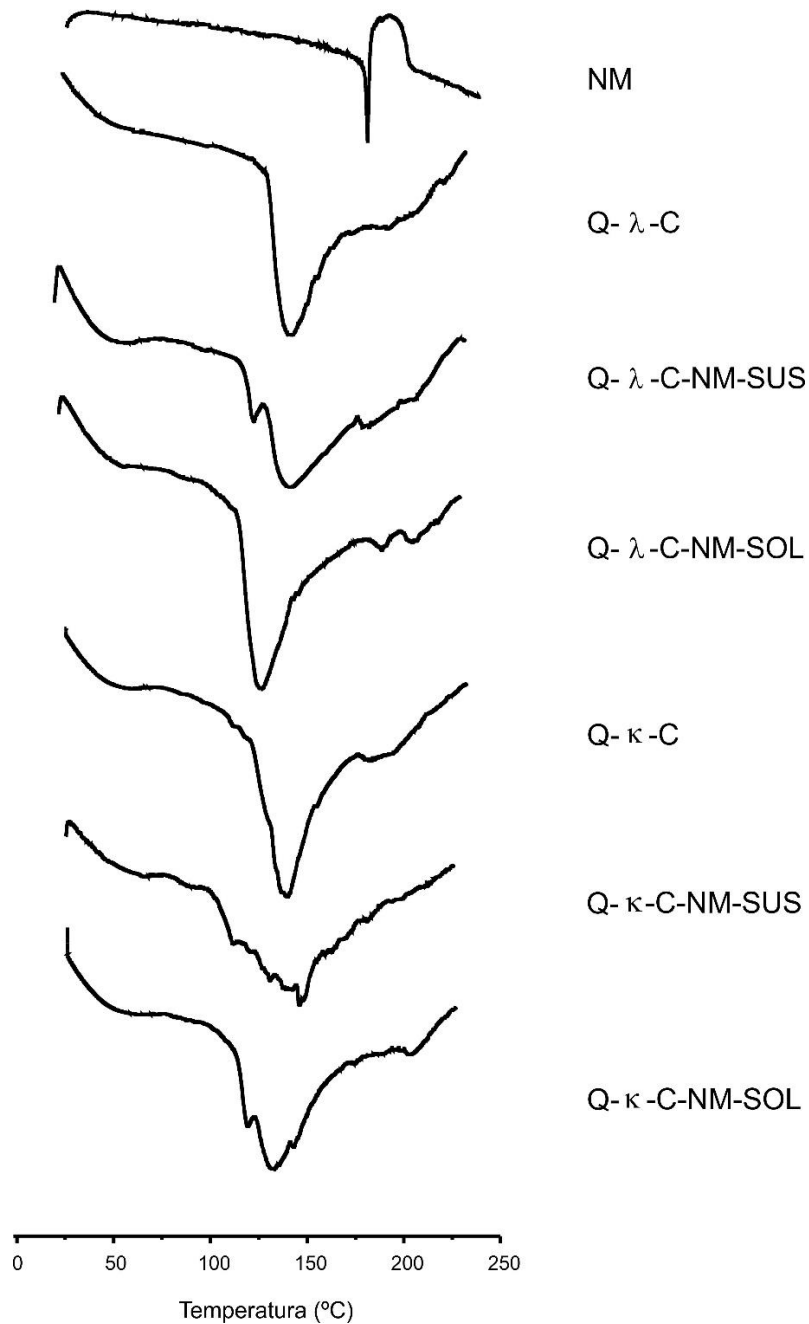
La Figura 39 muestra las curvas ATG y ATGD (derivada de curvas de ATG) del NM, polímeros formadores de matriz y las formulaciones seleccionadas. A partir de las curvas, es posible observar que el Q presenta una degradación en una sola etapa a 297 °C, correspondiendo a su despolimerización [131]. También se pudo observar un pequeño pico entre 40 y 100 °C que estaría relacionado con el agua absorbida y corresponde a la primera caída de masa en la curva del ATG [131].



**Figura 39.** Curvas de ATG (A y B) y ATGD (C y D). A) y C) NM, polímeros formadores de matriz y formulaciones de Q- $\kappa$ -C. B) y D) NM, polímeros formadores de matriz y formulaciones de Q- $\lambda$ -C

Tanto el  $\kappa$ -C como el  $\lambda$ -C mostraron etapas de degradación similares: la primera, centrada a alrededor de 60 °C que puede corresponder a la pérdida de agua libre, la segunda y principal está centrada a alrededor de 230 °C, y finalmente dos etapas más a temperaturas más altas (320–400 °C) [133, 134]. Por otro lado, el fármaco, tiene un pico amplio centrado a 305 °C. En el caso de las formulaciones sin NM, se pueden reconocer cuatro etapas diferentes: 1) a 60 °C (agua), 2) a 185 °C (asociado con el plastificante PEG 400), 3) a 230 °C (asociado con el C) y 4) a 320 °C (descomposición del Q). Los picos a temperaturas superiores a 400 °C podrían estar asociados con la descomposición de los productos de degradación originales. Cuando se incorporó NM a las matrices, la diferencia se relacionó con la temperatura de degradación del fármaco.

La Figura 40 muestra las curvas CDB para el NM y las formaciones basadas en Q- $\lambda$ -C y Q- $\kappa$ -C. En el caso del NM, el primer pico endotérmico está asociado con la fusión del fármaco. Es importante tener en cuenta que, en todos los casos, los polímeros actuaron como un protector térmico del NM, aumentando la temperatura del último pico más allá de 250 °C, mientras que no hay evidencia del punto de fusión del fármaco dentro de las formulaciones siendo concordantes con los resultados obtenidos DRX. En el caso de las formulaciones cargadas con NM de manera suspendida, la ausencia del punto de fusión del fármaco probablemente se deba a que el IFA ha reducido parcialmente su cristalinidad o a que la concentración del mismo incluida dentro de las matrices se encuentra por debajo del límite de detección, mientras que en el caso de las formulaciones cargadas con NM de manera solubilizada, el IFA podría estar en estado amorfo.

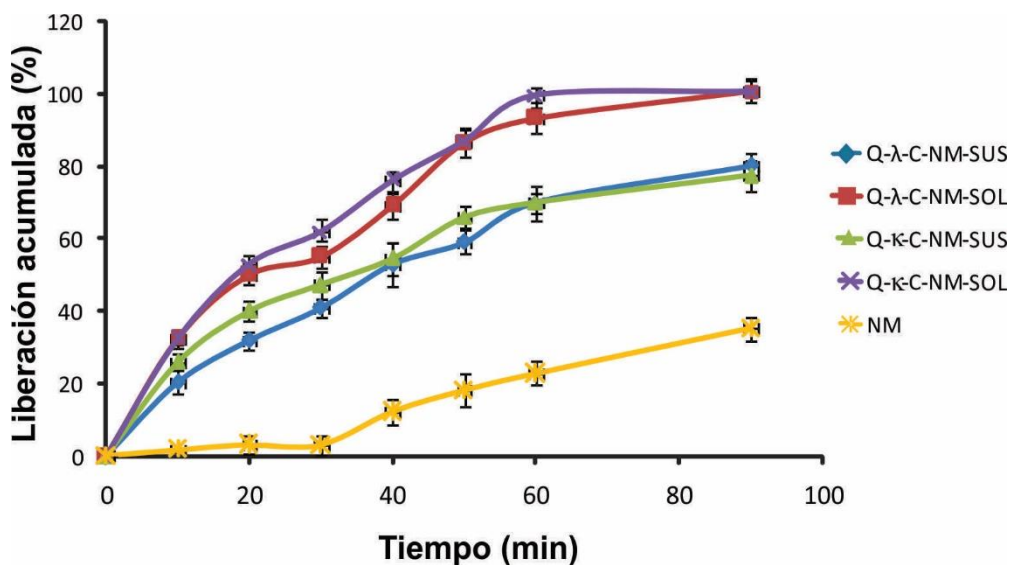


**Figura 40.** Curvas de CDB del NM y las formulaciones poliméricas basadas en Q- $\lambda$ -C y Q- $\kappa$ -C

### Estudio de disolución del IFA y liberación desde los sistemas

Las formulaciones cargadas con NM de manera solubilizada mostraron una velocidad de disolución más rápida que aquellas cargadas con el fármaco de manera suspendida (Figura 41). Después de 60 min de ensayo, estas matrices

permitieron la liberación del 100% del fármaco, mientras que las formulaciones cargadas con NM de manera suspendida liberaron el 70% del mismo, y solo se solubilizó un 20% de NM en polvo en ese intervalo de tiempo. Finalmente, no se encontraron diferencias significativas entre los perfiles de disolución de las matrices basadas en  $\kappa$ -C y  $\lambda$ -C ( $p > 0,05$ ).

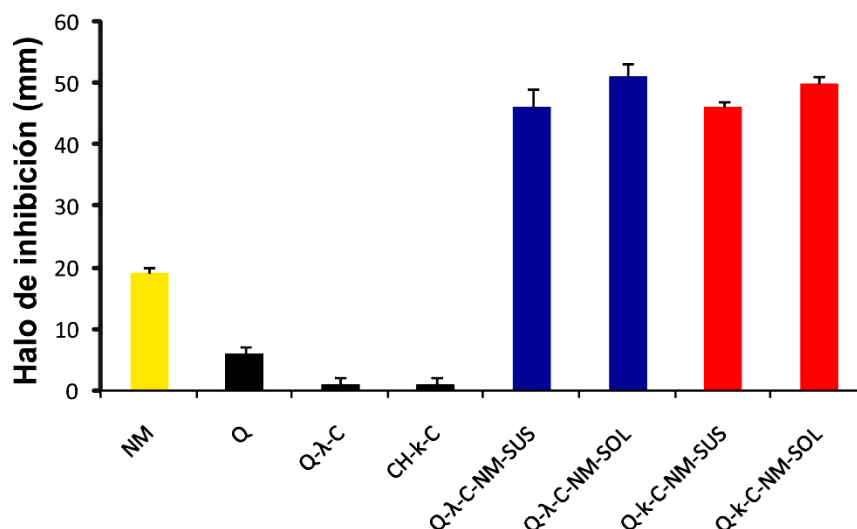


**Figura 41.** Liberación acumulada (%) del NM y las formulaciones seleccionadas

La mejora en la velocidad de disolución del NM cuando se suspendió en las formulaciones probablemente se deba a que las matrices poliméricas mejoraron la humectabilidad del fármaco y también redujeron la aglomeración del mismo, aumentando el área superficial y mejorando así la velocidad de disolución del NM [92]. Por otro lado, las formulaciones cargadas con NM solubilizado podrían mejorar la disolución del fármaco, debido al hecho que el NM se encuentra en un estado amorfo. Como se informó, el estado amorfo de un fármaco conduce a un estado sólido de alta energía que da como resultado un aumento de la solubilidad y la velocidad de disolución [134].

### **Actividad *in vitro* – Halo de inhibición**

Se emplearon como controles un disco de papel conteniendo NM y formulaciones de Q, Q- $\kappa$ -C y Q- $\lambda$ -C sin fármaco incluido. El NM produjo halos de inhibición de alrededor de 18 mm, mientras que las formulaciones descargadas basadas en 100% de Q mostraron un halo de alrededor de 6 mm, lo que concuerda con la actividad antifúngica reportada propia del polímero [116]. Además, las formulaciones Q- $\kappa$ -C y Q- $\lambda$ -C sin IFA produjeron halos de inhibición más pequeños (de 1,5 mm), probablemente debido a la presencia del Q en las matrices (Figura 42). Con respecto a las formulaciones cargadas, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre aquellas cargadas con NM de manera solubilizada o suspendida, ya que todas las formulaciones mostraron halos similares (entre 40 y 50 mm). Sin embargo, en la Figura 42 se puede observar una tendencia, todas las formulaciones cargadas con el IFA de manera solubilizada presentaron, en promedio, zonas de inhibición mayores que las formulaciones donde el fármaco de encontraba incluido de manera suspendida. Por otro lado, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) entre las formulaciones cargadas y el NM en polvo. Por lo tanto, se podría postular que las matrices fueron capaces de inhibir el crecimiento del cultivo de *C. albicans* mediante la combinación de dos factores: por el NM liberado de las formulaciones y las propiedades antimicrobianas del Q. Probablemente, el NM, un fármaco hidrófobo, no se solubilizó en gran medida en el medio de cultivo y, por lo tanto, su disolución/difusión en el agar fue incompleta, produciendo halos de inhibición más pequeños que las matrices.



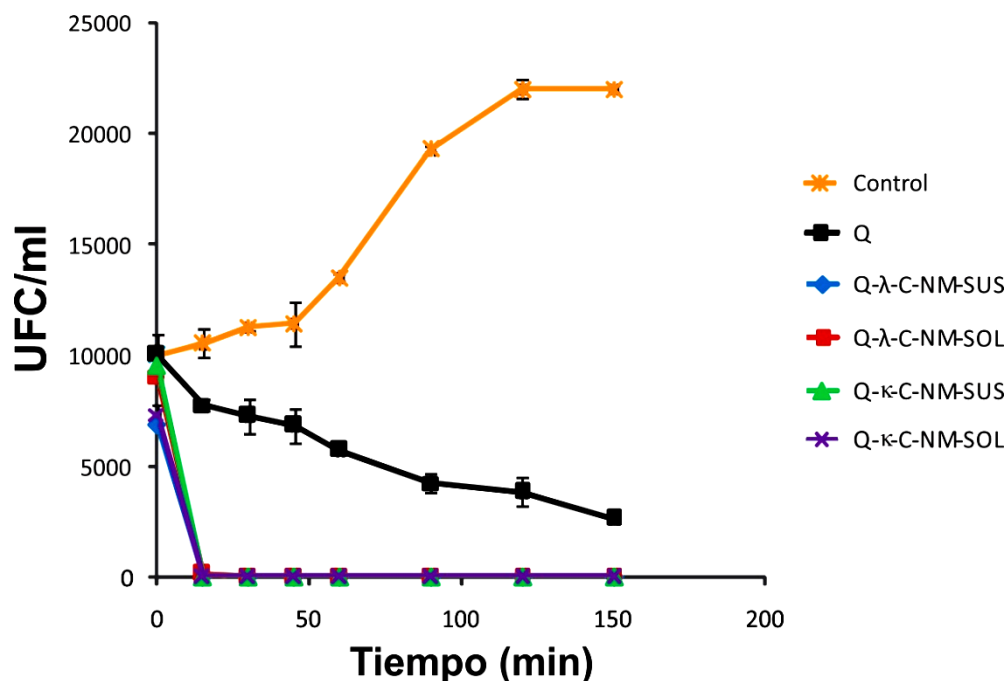
**Figura 42.** Halos de inhibición producidos por las formulaciones seleccionadas en cepas de *C. albicans*

Como se observó en la Figura 41, la disolución de las matrices cargadas con NM solubilizado fue más rápida que la de las matrices cargadas con el fármaco suspendido, por lo tanto, sería esperable que una mayor disolución/difusión en el medio de cultivo genere mayores halos de inhibición. Sin embargo, como se mencionó, los halos de inhibición producidos por las matrices cargadas con NM suspendido o solubilizado no mostraron diferencias significativas. Este hecho probablemente esté relacionado con la metodología empleada, que requiere la colocación de matrices en la superficie del agar seguida de incubación a 28 °C durante 24 h antes de que se lea la zona de inhibición. Se podría postular que durante la incubación, tanto el NM suspendido como el solubilizado, son capaces de difundir produciendo la misma inhibición.

### **Actividad *in vitro* - Tiempo de muerte**

La Figura 43 muestra los perfiles de tiempo de muerte producidos por el Q y las formulaciones seleccionadas cargadas con NM. Se observó que la curva control (cultivo sin formulaciones) mostró un aumento en el número de UFC en comparación con el inóculo inicial. Por otro lado, después de 150 min el Q produjo

una reducción del cultivo de *C. albicans* (de 10000 UFC/mL a 2500 UFC/mL). Se ha informado que a bajas concentraciones el Q produce una serie de alteraciones de la homeostasis iónica y en el metabolismo de la levadura que le confieren actividad fungistática al polímero; mientras que en altas concentraciones el Q puede actuar como agente de permeación en bacterias y hongos actuando como fungicida [135]. Por lo tanto, cuando se emplea Q a concentraciones superiores a 1,0 mg/mL, no solo se observa una actividad fungistática sino también fungicida. En este ensayo, la concentración de Q (al colocar las formulaciones sin fármaco incluido en el medio) fue de 0,6 mg/mL, por lo tanto, el polímero presentó actividad fungistática. Todas las formulaciones que contenían el fármaco permitieron una erradicación completa del cultivo de *C. albicans* al cabo de 15 min de ensayo. Se obtuvieron perfiles superponibles para las matrices Q- $\kappa$ -C y Q- $\lambda$ -C con NM de manera suspendida o solubilizada. Este resultado muestra que la actividad antifúngica de estas formulaciones no se modificó con la forma de incorporación del fármaco dentro de las matrices.



**Figura 43.** Tiempo de muerte producido por el NM, Q y las formulaciones seleccionadas

## CONCLUSIONES

En este capítulo, se desarrollaron y caracterizaron matrices poliméricas mucoadhesivas bucales basadas en quitosano y carragenatos. Las formulaciones basadas en combinaciones de quitosano- $\kappa$ -carragenato y quitosano- $\lambda$ -carragenato mostraron un efecto protector térmico sobre el fármaco, presentaron una superficie homogénea, alta resistencia a la tracción, elongación y adhesividad moderadas, y se hincharon durante 24 horas sin sufrir desintegración. Se observó que la combinación de quitosano y  $\lambda$ -carragenato produjo matrices con los valores más altos de resistencia a la tracción y adhesividad, además de presentar el mayor índice de hinchamiento. Estos hechos probablemente se deben a que algunos de los grupos sulfato del  $\lambda$ -carragenato interactúan con el quitosano, mientras que otros están libres en las matrices; los últimos grupos podrían interaccionar con la mucina y saliva artificial. Con respecto a la incorporación del nitrato de miconazol de manera suspendida o solubilizada se puede concluir a partir de los resultados obtenidos que no se detectaron diferencias significativas en el comportamiento mecánico de las matrices basadas en los polímeros estudiados con la incorporación del nitrato de miconazol suspendido o solubilizado. Sin embargo, se observó una tendencia: las formulaciones con el nitrato de miconazol incorporado de manera solubilizada mostraron una ligeramente superior resistencia a la tracción, elongación y adhesividad que aquellas con el fármaco de manera suspendido. Por otro lado, el hinchamiento aumentó ligeramente cuando se suspendió el fármaco, probablemente porque el material particulado, observado por microscopía electrónica de barrido, interrumpe la continuidad de la matriz polimérica, lo que permite más espacio libre aumentando la superficie de la matriz expuesta al disolvente. Ni el estudio de difracción de rayos X y ni el análisis térmico pudieron detectar el nitrato de miconazol en la mayoría de las formulaciones, probablemente debido al hecho de que en las matrices cargadas con nitrato de miconazol suspendido, el fármaco redujo parcialmente su cristalinidad por debajo del límite de detección, mientras que en las matrices cargadas con nitrato de miconazol solubilizado, el fármaco podría estar en un estado amorfo. La liberación del nitrato de miconazol fue más rápida cuando se solubilizó el mismo en la matriz,

probablemente porque el estado amorfo del fármaco conduce a un estado sólido de alta energía, lo que resulta en una mayor velocidad de disolución. Sin embargo, no se encontraron diferencias con respecto a la actividad antifúngica de las diferentes formulaciones, incluso al analizar las curvas de tiempo de muerte.

## **CAPITULO IV**

### ***“Formulación de discos microparticulados”***

# CONSIDERACIONES GENERALES PARA EL PRESENTE CAPITULO

Otra alternativa para vehiculizar fármacos es la incorporación de los mismos dentro de sistemas microparticulados poliméricos. En este capítulo se han desarrollado micropartículas basadas en quitosano, hidroxipropil metilcelulosa y gelatina. Estos sistemas en general son empleados por vía oral, sin embargo, dado que nuestro objetivo es la administración de nitrato de miconazol por vía bucal, las micropartículas desarrolladas fueron posteriormente comprimidas generando de este modo discos microparticulados adhesivos.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Desarrollar micropartículas basadas en polímeros con y sin carga conteniendo nitrato de miconazol como fármaco modelo.
- Caracterizar físico-químicamente de los sistemas preparados en cuanto a: eficacia de encapsulamiento, estudios de velocidad de disolución, espectroscopía infrarroja, análisis térmicos, difracción de rayos X, microscopía electrónica de barrido y tamaño de partícula.
- Estudiar los sistemas obtenidos en cuanto a su adhesividad (en encías de cerdo).
- Evaluar la liberación del NM desde las micropartículas y la actividad de los sistemas mediante ensayos *in vitro* en cultivos de *C. albicans*.

# MATERIALES Y METODOS

## ***Materiales***

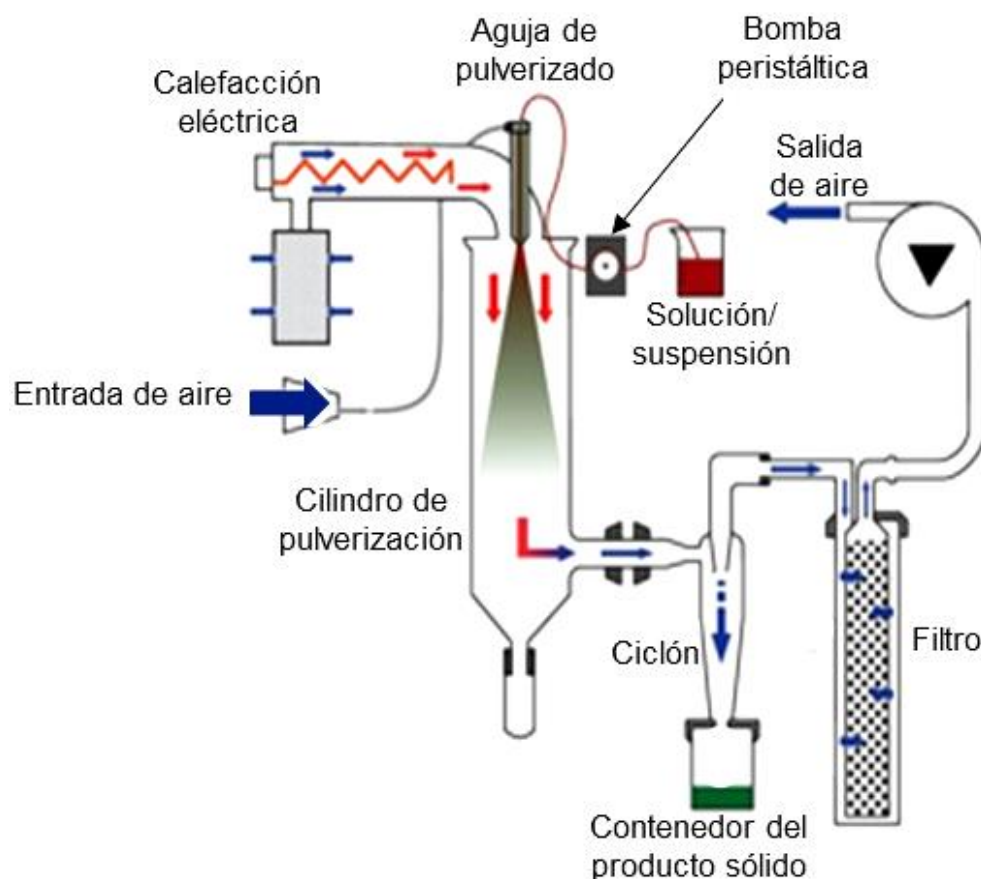
El Q (230 KDa de peso molecular promedio y 80,6% de N-deacetilación) fue suministrado por Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, EE. UU.), HPMC (250 kDa de peso molecular promedio, 19–24% de contenido de metoxilo, y 7–12% de contenido de hidroxipropilo) se adquirió de Eigenmann & Veronelli (Milán, Italia), GEL (tipo A de piel de cerdo, 125 Bloomvalue) y NM de grado farmacéutico fueron adquiridas por Parafarm (Buenos Aires, Argentina). Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

## ***Métodos***

### **Secado por aspersión**

El proceso de obtención de micropartículas (MPs) a través del secado por aspersión, es un proceso que transforma un sistema líquido en uno sólido pulverulento a través de la aspersión de una solución o dispersión en una cámara en la cual circula aire caliente [136].

Es un método muy eficiente debido a la generación de una gran área superficial que permite la transferencia de calor. El tiempo requerido para el secado depende de varios factores: tiempo de residencia de la gota en el cilindro, geometría del cilindro, velocidad de flujo del gas transportador, temperatura y presión [136]. En la Figura 44 se muestra un esquema del equipo y del proceso de secado por aspersión.



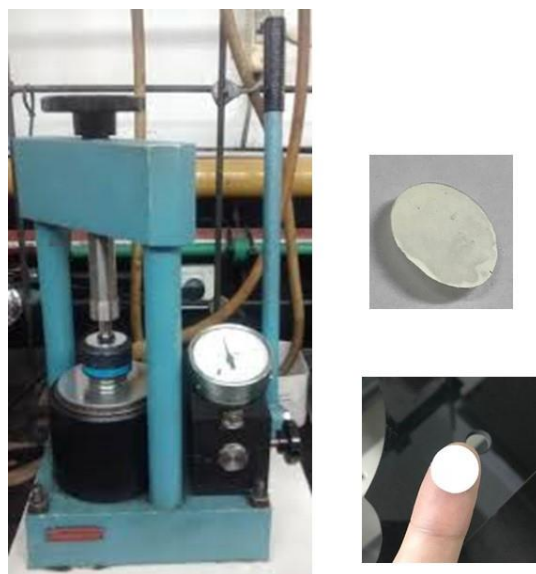
**Figura 44.** Esquema del proceso de secado por aspersión

### **Preparación de micropartículas y discos microparticulados**

La solución de Q (0,1% p/v) se preparó disolviendo al polímero en una solución de ácido acético al 30% v/v (pH = 2,50), mientras que las soluciones de GEL y HPMC (0,1% p/v) se obtuvieron disolviendo a los polímeros en agua destilada y agitando durante 30 min (400 rpm, 40 °C). Luego de esto, se añadió el NM 70% p/p (respecto a la masa total de polímeros empleada) y se procedió a agitar la dispersión durante 10 min (400 rpm, 40 °C). Finalmente, las mezclas se secaron por aspersión en un equipo Mini Büchi Spray Dryer B-290 (Flawil, Suiza). Las condiciones de secado fueron las siguientes: velocidad de flujo de aire: 38 m<sup>3</sup>/h, velocidad de alimentación: 5 mL/min, aspirador: 95%, temperatura de entrada de secado por pulverización: 130 °C y temperatura de salida: 70 °C. Finalizado este proceso, las partículas secas se retiraron del recipiente colector y

se almacenaron a temperatura ambiente. Para la preparación de Mps vacías (sin NM), se empleó el mismo procedimiento sin el agregado del IFA.

Por último, los sistemas se comprimieron utilizando una prensa Beckman (aplicando una fuerza de 8 toneladas durante 10 min) para obtener discos microparticulados (Figura 45).



**Figura 45.** Método de compresión de los sistemas para obtener discos microparticulados

## **Caracterización de las micropartículas**

### **Eficacia de encapsulamiento**

La eficacia de encapsulamiento (EE) se determinó dispersando 30 mg de cada sistema en 90 mL de metanol y se agitó a 400 rpm durante 4 h a temperatura ambiente (a fin de asegurar la completa extracción del NM de las Mps). Luego de este tiempo, las dispersiones fueron filtradas y la cantidad de NM en el metanol se determinó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 272 nm, empleando un espectrofotómetro LKB-Pharmacia Ultrospec II (Cambridge, Reino Unido). El porcentaje de EE se calculó de acuerdo con la Ecuación 2:

$$EE\% = P_{NM} / P_t \times 100\%$$

[Ecuación 2]

Donde  $P_{NM}$  es el contenido real de NM y  $P_t$  es el contenido teórico de NM en las Mps. El ensayo se realizó por triplicado.

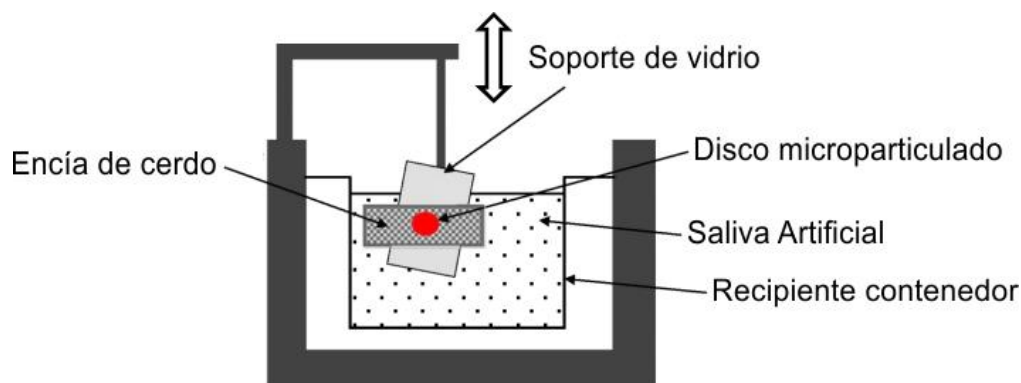
### **Estudio de disolución del IFA y liberación desde los sistemas**

Los estudios de disolución se realizaron a 37 °C en 900 mL de agua destilada conteniendo PEG 400 al 1% v/v, utilizando un aparato USP XXIV 2 (Hanson Research, SR8 8-Flask Bath, Ontario, Canadá) con paletas rotando a 50 rpm [68]. Se dispersaron diferentes masas de los sistemas microparticulados teniendo en cuenta para ello la EE de cada sistema. La masa empleada de cada sistema fue la que contenía 200 mg de NM, los sistemas se dispersaron en el medio de disolución. En diferentes intervalos de tiempo: 0, 10, 20, 30, 40, 50 60, 90, 120, 180, 240 y 300 min se tomaron tres muestras de 5 mL. La cantidad de NM liberado se determinó mediante espectrofotometría UV utilizando la banda de absorción del IFA a 272 nm. Se añadió un volumen igual del medio de disolución después de cada recolección de muestras para mantener un volumen constante.

### **Tiempo de residencia *in vitro***

El tiempo de residencia *in vitro*, es el tiempo en el que los sistemas mucoadhesivos quedan adheridos en el sitio de aplicación (en este caso, encía de cerdo). Este ensayo es una alternativa al ensayo de adhesividad realizado en los capítulos anteriores. El tiempo de residencia se determinó utilizando un aparato de desintegración USP modificado (Figura 46). El medio consistió en 900 mL de saliva artificial mantenida a 37 °C. Un segmento de encía de cerdo (obtenida de frigorífico "Paladini SA", V.G. Galvez, Argentina), de 3 cm de largo, se adhirió a la superficie de un portaobjeto de vidrio, unido verticalmente al aparato. Cada disco

microparticulado se hidrató utilizando 0,1 mL de saliva artificial y luego la superficie hidratada se puso en contacto con la encía. El portaobjetos se fijó verticalmente al aparato y se movió hacia arriba y hacia abajo, sumergiendo al disco completamente en la solución (en el punto más bajo) y manteniéndolo fuera de la misma (en el punto más alto), respectivamente, a una velocidad de 30 ciclos por minuto. Se registró el tiempo necesario para completar la erosión o el desprendimiento de cada disco de la superficie de la encía [138 19]. Los resultados presentados son el promedio de tres determinaciones.



**Figura 46.** Esquema del aparato de desintegración USP modificado

### **Análisis morfológico y determinación de tamaño mediante microscopía electrónica de barrido**

La morfología y el tamaño de partícula del NM y de las Mps se investigaron mediante MEB (AMR 1000, Leitz, Wetzlar, Alemania). Los sistemas microparticulados se montaron en un soporte de aluminio por medio de un adhesivo conductor de doble cara. Las muestras se recubrieron con una fina capa de oro durante 15 min a 70-80 mTorr para hacerlas conductoras antes de obtener las imágenes. Todas las muestras se examinaron utilizando un voltaje de aceleración de 20 kV. Las imágenes obtenidas por MEB se analizaron utilizando el software Image-Pro Plus (IPP) v. 6.0 para determinar el tamaño de partícula. Se realizaron 200 mediciones de diámetros de Feret para el cálculo de distribución de tamaño de partícula [139].

## **Espectroscopía infrarroja**

Los espectros IR del NM, polímeros y Mps cargadas y vacías se obtuvieron mediante un espectrómetro Shimadzu FT-IRPrestige-21 (Tokio, Japón) a temperatura ambiente, realizando pastillas de KBr para el fármaco y los polímeros, y ATR con cristal de diamante para el análisis de los discos microparticulados. El rango de exploración fue de 400-1700  $\text{cm}^{-1}$  con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

## **Análisis Térmicos**

El ATG de las diferentes Mps se realizó con un analizador térmico TG HI-Res (TA Instruments) a una velocidad de calentamiento de 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  desde temperatura ambiente hasta 800  $^{\circ}\text{C}$  con flujo de aire.

Los ensayos de CDB se realizaron en un DSC Q2000 (TA Instruments) desde -25 a 250  $^{\circ}\text{C}$  a una velocidad de calentamiento de 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  bajo flujo de nitrógeno.

## **Difracción de rayos X**

El estudio de DRX para los diferentes sistemas microparticulados, el fármaco y los polímeros se realizó en modo de transmisión en un difractómetro MPD Philips automatizado (Eindhoven, Países Bajos). Los patrones de difracción se registraron usando radiación  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1.540562 \text{ \AA}$ ), voltaje de 40 kV, corriente de 20 mA y paso de 0,02 $^{\circ}$  en el intervalo de 10-50 $^{\circ}$  ( $2\theta$ ). El ensanchamiento y el fondo del pico bajo se aseguraron mediante el uso de una geometría de haz paralelo mediante una lente de rayos X y un monocromador de grafito colocado antes de la ventana del detector. La adquisición y evaluación de los datos se realizaron con el paquete Stoe Visual-Xpow, versión 2.75 (Alemania).

### **Actividad *in vitro* – Halos de inhibición en función del tiempo**

La prueba de la zona de inhibición se realizó como se ha descrito en “Materiales y Métodos” del Capítulo I.

En este caso, se empleó NM en polvo (1000 µg) adherido a una cinta como control y se colocaron los discos microparticulados (conteniendo una masa de NM equivalente a 1000 µg) sobre la superficie del agar. Cada disco se movió a otra zona del cultivo después de 1 h y el procedimiento se repitió durante 7 h. Luego, las placas se incubaron al aire a 28 °C y se leyeron después de 24 h. Los diámetros de los halos generados por cada disco se determinaron utilizando un calibre [121].

# RESULTADOS Y DISCUSION

## Eficacia de encapsulamiento y estudios de disolución

Como se puede observar en la Tabla VIII, la EE fue superior al 80% en casi todos los sistemas, sólo las Mps basadas en 100% HPMC mostraron valores menores de EE (75%). Es probable que estos resultados estén relacionados al hecho de que los polímeros que poseen una alta densidad de carga (Q y GEL) tienen más sitios para interactuar con el NM, antes del proceso de secado por aspersión [140]. En consecuencia, cuando las soluciones se atomizan en el equipo de aspersión, aquellas que tienen más grupos cargados pueden interactuar más fuertemente con el IFA reteniendo al mismo en el interior de los sistemas microparticulados. El porcentaje de EE más alto se obtuvo cuando se empleó un único polímero en la formulación de las Mps (97,8% y 98,5% para el Q y la GEL, respectivamente), mientras que el porcentaje de EE disminuyó cuando los dos polímeros cargados se combinaron (83,2% para Q-GEL). Esta disminución probablemente esté relacionada con las interacciones entre las cargas positivas presentes en el Q y las densidades de carga negativas presentes en la GEL; por lo tanto, en este caso una menor cantidad de densidades de carga se encuentran disponibles para interactuar con el NM y mantenerlo encapsulado en las Mps. Este comportamiento también podría explicar los valores de liberación del NM desde los sistemas. Las Mps basadas en 100% de HPMC mostraron la liberación del fármaco más rápida, alcanzando casi un 100% después de 30 min de ensayo (Tabla VIII). Por el contrario, los sistemas basados en 100% de GEL o 100% de Q liberaron cantidades menores del fármaco: 10,2 y 13,2%, respectivamente, mientras que los sistemas basados en combinaciones de polímeros mostraron liberaciones en el rango entre 35 y 44%, al cabo de 30 min. Entre estos sistemas anteriormente mencionados, la matriz basada en ambos polímeros cargados mostró la liberación más lenta del NM. Sin embargo todos los sistemas mejoraron la velocidad de disolución del NM ( $Q_{30} = 1,4\%$ ). Varios factores podrían ser responsables de este hecho, y entre ellos están la posible reducción de la

cristalinidad del IFA durante el proceso de secado por aspersión y/o el aumento de la humectabilidad debido a la matriz polimérica [92].

### **Tiempo de residencia *in vitro***

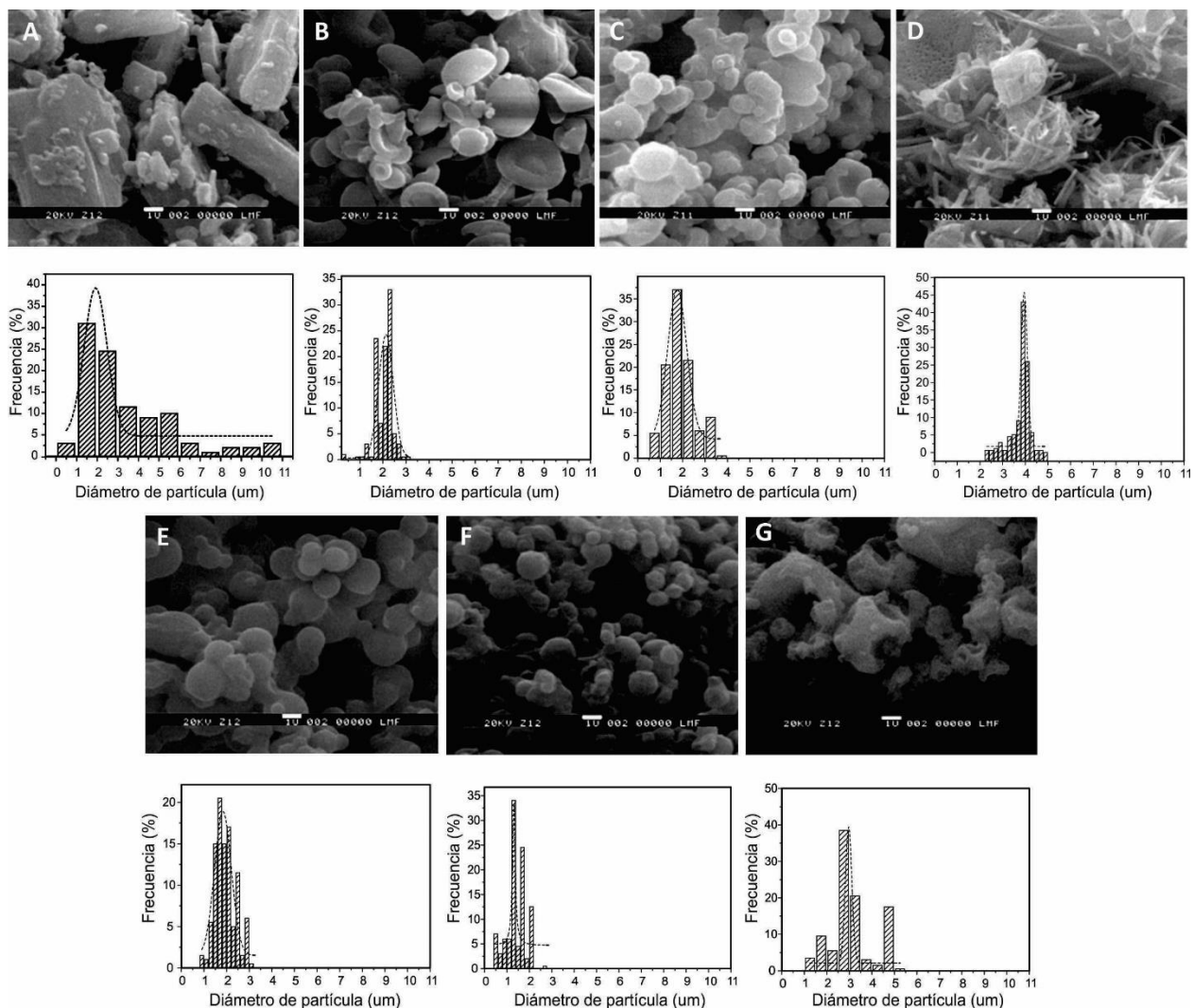
Todos los discos mostraron adhesividad, presentando tiempos de residencia *in vitro* superiores a 1,5 h (Tabla VIII). Los sistemas basados en Q-HPMC y Q-GEL no se desprendieron ni se desintegraron después de 8 h de ensayo. Por otro lado, los discos basados en 100% de Q y 100% de HPMC se desprendieron sin desintegrarse luego de 6 y 5 h, respectivamente; mientras que los discos basados en 100% de GEL y la combinación HPMC-GEL (50%-50%) se desintegraron después de 1,5 y 3 h, respectivamente.

### **Morfología y tamaño de las partículas**

La morfología del fármaco, las Mps y su tamaño, se presentan en la Tabla VIII y en la Figura 47. Se puede observar que el NM aparece como bloques cristalinos regulares, los cuales variaron en tamaño de 0,5 a 11,0  $\mu\text{m}$  y mostraron un tamaño promedio de 3  $\mu\text{m}$  (Figura 47A), mientras que el tamaño de los sistemas microparticulados osciló entre 0,4 y 5,0  $\mu\text{m}$  (Figura 47 B-G). Las Mps basadas en 100% de Q (Figura 47B) presentaron una superficie lisa y contraída (rango de tamaño de 0,2 a 3,2  $\mu\text{m}$ ), similar a las Mps basadas en 100% de GEL (con rango de tamaño de 0,5 a 4,0  $\mu\text{m}$ , Figura 47C), mientras que las Mps que se basaron solo en HPMC (rango de tamaño de 2,2 a 5,0  $\mu\text{m}$ ) fueron irregulares y fibrosas con una superficie no uniforme (Figura 47D). En el caso de Mps formuladas a partir de combinaciones de polímeros, las basadas en HPMC-GEL (Figura 47G) aparecen como bloques irregulares (rango de tamaño de 1,0 a 5,5  $\mu\text{m}$  y exhibieron una superficie contraída no uniforme). Por otro lado, las partículas basadas en Q-GEL (rango de tamaño de 0,8 a 3,2  $\mu\text{m}$ ) y Q-HPMC (rango de tamaño de 0,4 a 2,8  $\mu\text{m}$ ) fueron lisas y esféricas mostrando una superficie uniforme (Figura 47 E-F).

**Tabla VIII.** Propiedades del NM y los sistemas microparticulados estudiados

Sistema	EE (%)	Q <sub>30</sub> (%)	Morfología	Tamaño (µm)	Tiempo de residencia <i>in vitro</i> (min)
NM	-	1,4	Bloques cristalinos	7,0 ± 2,0	-
Q-NM	97,8	13,2	Esférico, partículas retraídas	2,3 ± 0,7	360
HPMC-NM	74,4	99,9	Partículas fibrosas, irregulares	3,9 ± 0,9	300
GEL-NM	98,5	10,2	Partículas esféricas, irregulares, aglomeradas	1,7 ± 0,5	90
Q-HPMC-NM	82,4	44,5	Partículas esféricas	1,2 ± 0,3	> 480
Q-GEL-NM	83,2	35,6	Partículas esféricas	1,7 ± 0,5	> 480
HPMC-GEL-NM	94,9	41,9	Partículas con una superficie no uniforme. Bloques irregulares	3 ± 1	180

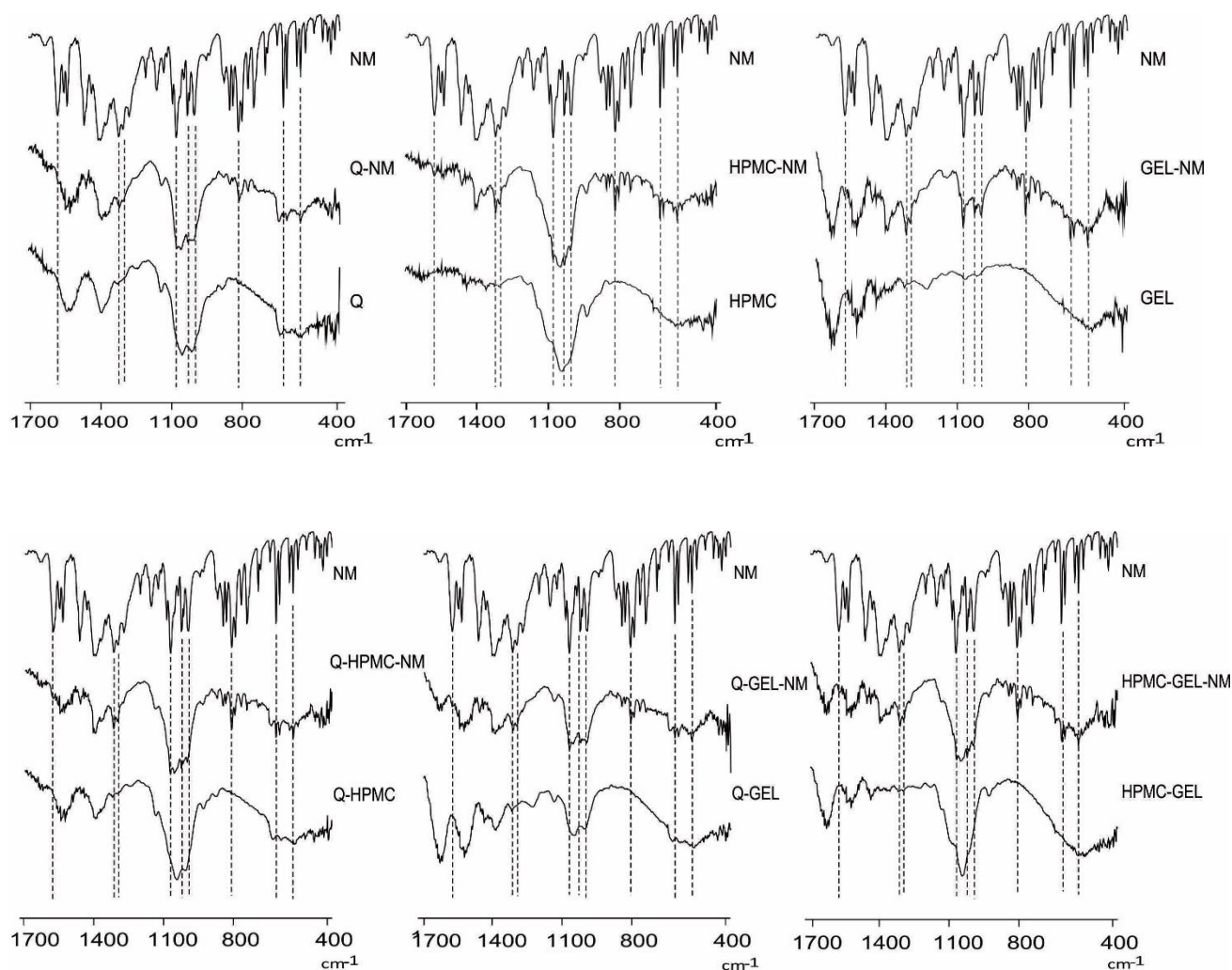


**Figura 47.** Microscopía electrónica de barrido e histograma de tamaño de partículas del: A) NM y B-G) micropartículas cargadas: B) Q, C) GEL, D) HPMC, E) Q-GEL, F) Q-HPMC y G) HPMC-GEL

### Espectroscopía infrarroja

Como se puede observar en la Figura 48, el NM presenta las bandas características descritas en los capítulos anteriores [89, 142].

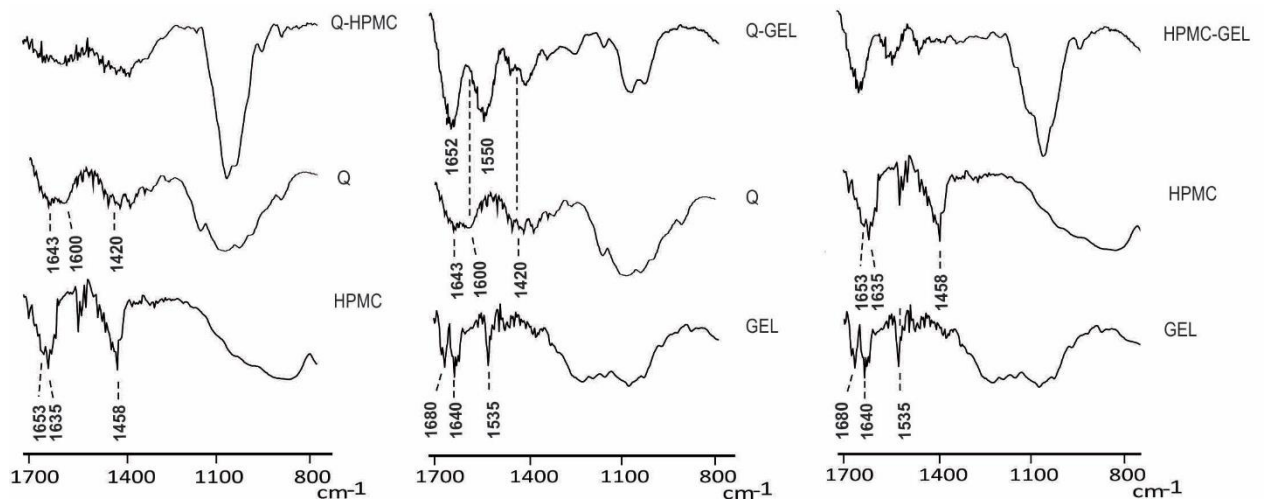
Todos los sistemas microparticulados cargados con NM mostraron los picos característicos del IFA en 1587, 1329, 1310, 1087, 1041, 1010, 824 y 712  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 48). Los espectros de los polímeros (Q, GEL y HPMC) fueron coincidentes a los descritos previamente (páginas 32 y 57).



**Figura 48.** Espectros infrarrojos del NM, polímeros formadores de matriz y micropartículas cargadas y descargadas

Cuando se combinó el Q con la HPMC, los espectros obtenidos fueron la superposición de los espectros de los polímeros formadores, sin encontrarse señales desplazadas ni la aparición de nuevas bandas. Esta superposición indicaría que no hay interacciones fuertes entre ambos polímeros (Figura 48). Se obtuvieron resultados similares cuando se analizó el sistema microparticulado basado en la combinación GEL-HPMC. Por otro lado, se observaron varios cambios y nuevas bandas en el caso del sistema basado en la combinación de Q y GEL. El espectro mostró que el pico de amida I se desplazó de 1640 a 1652  $\text{cm}^{-1}$  y la banda de  $\text{NH}_3^+$  junto a la vibración asimétrica y simétrica del estiramiento de  $\text{COO}^-$  a 1600 y 1420

$\text{cm}^{-1}$  desaparecieron, lo que indicaría una interacción electrostática entre los grupos aminos del Q ( $\text{NH}_3^+$ ) y los grupos carboxilo ( $\text{COO}^-$ ) de la GEL (Figura 49). Por último, se evidenció la aparición de una banda fuerte en  $1550 \text{ cm}^{-1}$  en el espectro del sistema Q-GEL, que podría deberse a interacciones electrostáticas entre el grupo  $\text{COO}^-$  de la GEL y el grupo  $\text{NH}_3^+$  del Q [43, 110].



**Figura 49.** Espectros infrarrojos de Q, HPMC, GEL y micropartículas basadas en combinaciones de polímeros

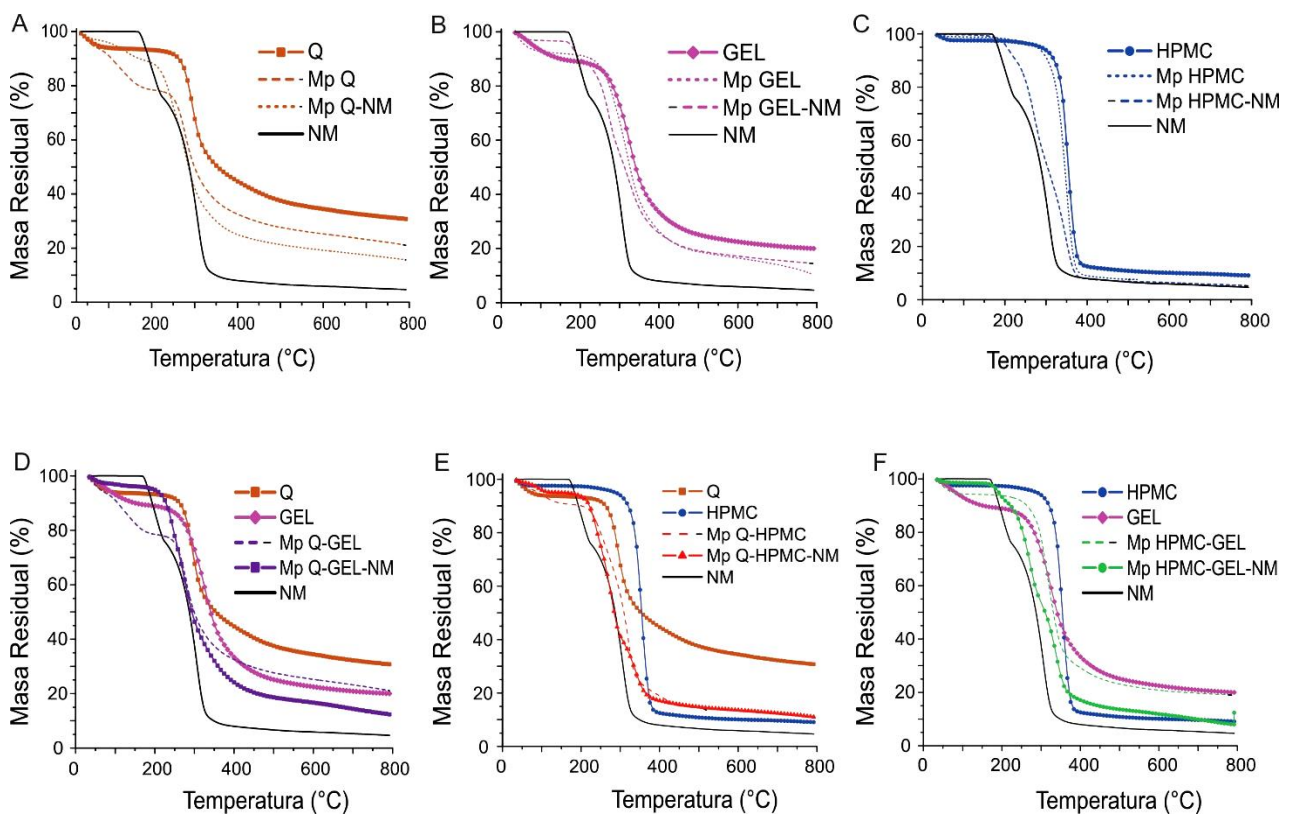
### Análisis térmicos

Las Figuras 50 y 51 muestran las curvas ATG y ATGD de los sistemas estudiados. Ambas curvas indicaron que el Q se degradó en una sola etapa a  $292 \text{ }^\circ\text{C}$ , que corresponde a su despolimerización [131]. También se pudo observar un pequeño pico entre  $40$  y  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  relacionado con el agua absorbida (que corresponde a la primera caída de masa en la curva ATG) [131]. Además, los sistemas microparticulados sin tener NM encapsulado presentaron dos picos de degradación: uno centrado a  $126 \text{ }^\circ\text{C}$  y el otro cercano a  $275 \text{ }^\circ\text{C}$ ; el primero podría asociarse al agua dentro del sistema y el segundo correspondería a la despolimerización del Q. Como se observa comúnmente en sistemas microencapsulados, el proceso de fabricación de Mps produce una reducción en la

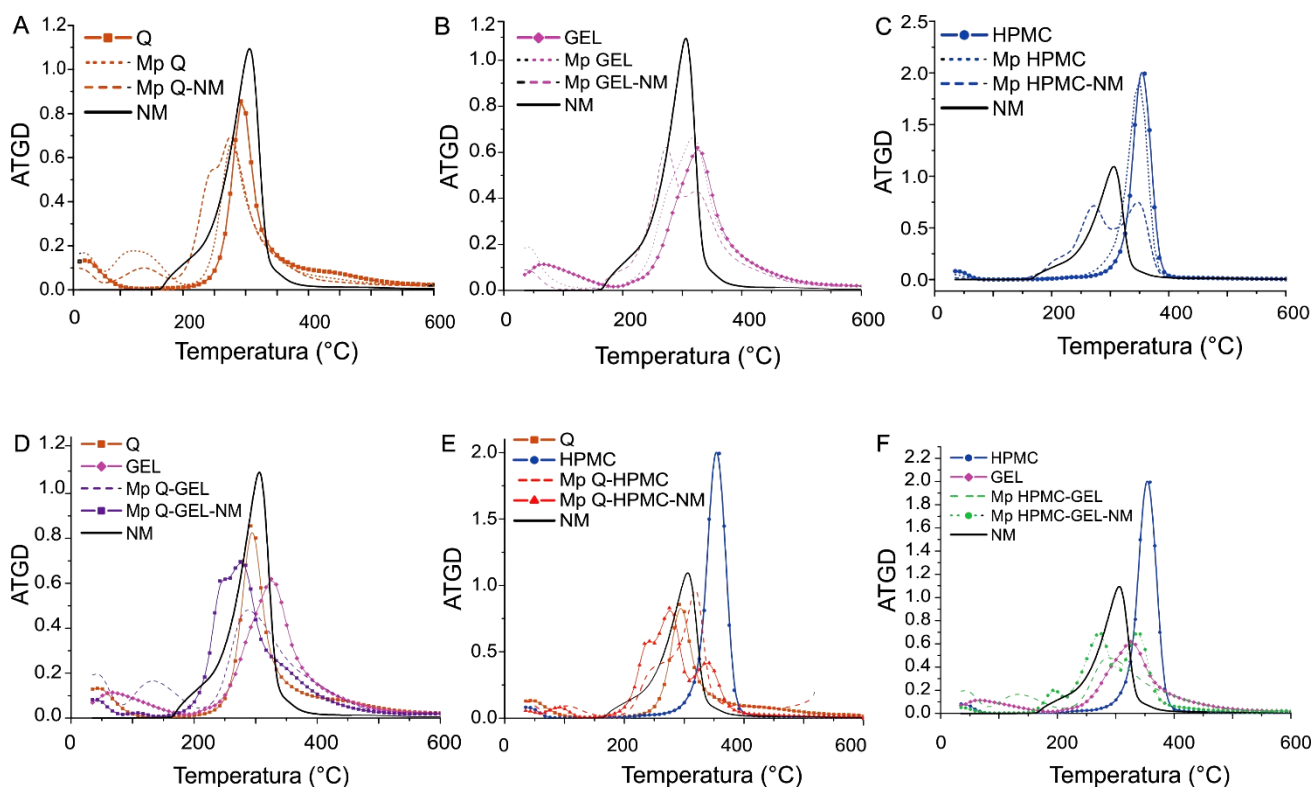
estabilidad térmica con respecto al polímero solo; en este caso, la reducción fue de alrededor de 17 °C [142]. El hecho de que la descomposición térmica de las Mps vacías haya comenzado a una temperatura más baja que la del polímero solo, se puede relacionar con que las Mps por su tamaño micrométrico tengan una mayor área superficial expuesta a la temperatura en comparación con el polímero, y por lo tanto, se degraden más fácilmente [142]. Respecto al NM, el mismo presentó un pico amplio centrado a 309 °C con un hombro alrededor de 200 °C; en el caso de las Mps de Q cargadas con el fármaco, en las curvas ATGD se pudieron detectar tres picos centrados a 134, 250 y 270 °C, respectivamente. El primer pico corresponde al agua asociada con el material [131], el segundo está asociado con el IFA y, finalmente, el tercero es una combinación entre el fármaco y el Q utilizado como formador de matriz.

El sistema basado en 100% HPMC presentó degradación en una sola etapa cuya degradación máxima se centró en 350 °C, la cual se coincide con la bibliografía [143]. También se puede observar que las Mps vacías presentaron un pico de degradación centrado aproximadamente a la misma temperatura que el polímero (350 °C). En el caso de las Mps cargadas basadas en 100% de HPMC, es posible observar dos picos, centrados a 267 y 350 °C, y un hombro, a alrededor de 200 °C, en las curvas ATGD (Figura 51). Tanto el hombro como el primer pico pueden asociarse con el NM, mientras que el último se asocia con la HPMC utilizada como formador de matriz [143]. Por otro lado, la GEL se degradó en una sola etapa ya que exhibió un pico centrado a 325 °C [145, 146]. Además, se observó un pequeño pico cercano a 67 °C que puede estar asociado con la evaporación del agua. En este caso, las Mps sin IFA presentan un pico de degradación centrado a una temperatura más baja que el polímero puro (316 °C), como es común en los sistemas microencapsulados [142]. En el caso de las Mps basadas en 100% GEL con fármaco, se pueden observar dos picos, centrados a 275 y 325 °C, respectivamente, y un hombro, a alrededor de 200 °C, en las curvas ATGD (Figura 51). Una vez más, el hombro y el primer pico pueden asociarse con el NM, mientras que el último puede relacionarse con el polímero utilizado como formador de la matriz [145, 146]. En el caso de las Mps de Q-HPMC cargadas con NM, es posible observar cuatro picos centrados en 92,3, 242,1, 275,4 y 342,1 °C, respectivamente

(Figura 51). El primer pico corresponde al agua asociada con las Mps, el segundo se asocia con una combinación entre el IFA y el Q [131], el tercero es una combinación entre el fármaco y ambos polímeros utilizados como formadores de matriz, y el último se asocia con la HPMC [143]. Se observó el mismo comportamiento con respecto a la degradación de cada polímero, el fármaco y las Mps vacías y cargadas para los sistemas Q-GEL y GEL-HPMC.



**Figura 50.** Curvas de ATG de los sistemas desarrollados: A) Q, B) GEL, C) HPMC, D) Q-GEL, E) Q-HPMC y F) HPMC-GEL



**Figura 51.** Curvas de ATGD de los sistemas desarrollados: A) Q, B) GEL, C) HPMC, D) Q-GEL, E) Q-HPMC y F) HPMC-GEL

Las temperaturas de fusión ( $T_f$ ) para cada sistema microparticulado obtenido por CDB se resumen en la Tabla IX. El pico endotérmico para NM se centró a  $186^\circ\text{C}$ , mientras que para los polímeros, los picos fueron  $189,5^\circ\text{C}$  (Q),  $194,4^\circ\text{C}$  (HPMC) y  $184,9^\circ\text{C}$  (GEL).

En el caso de los polímeros (Q, HPMC y GEL), se observó un primer pico (alrededor de  $130\text{-}150^\circ\text{C}$ ) relacionado con el agua, mientras que en cada sistema, el pico a una temperatura más alta puede asociarse con la fusión de cada polímero [147–149]. En el caso del NM, solo se observó la fusión del fármaco a  $186^\circ$ .

También se puede observar por CDB que todos los sistemas microparticulados, presentan un evento correspondiente a la fusión de los polímeros correspondientes. Además, el proceso de microencapsulación no afectó la estructura del polímero ya que el mismo presentó valores similares de entalpía de relajación. En las curvas de CDB no se detectó ningún pico endotérmico debido a la cristalinidad del NM, por lo tanto, se podría postular que el fármaco

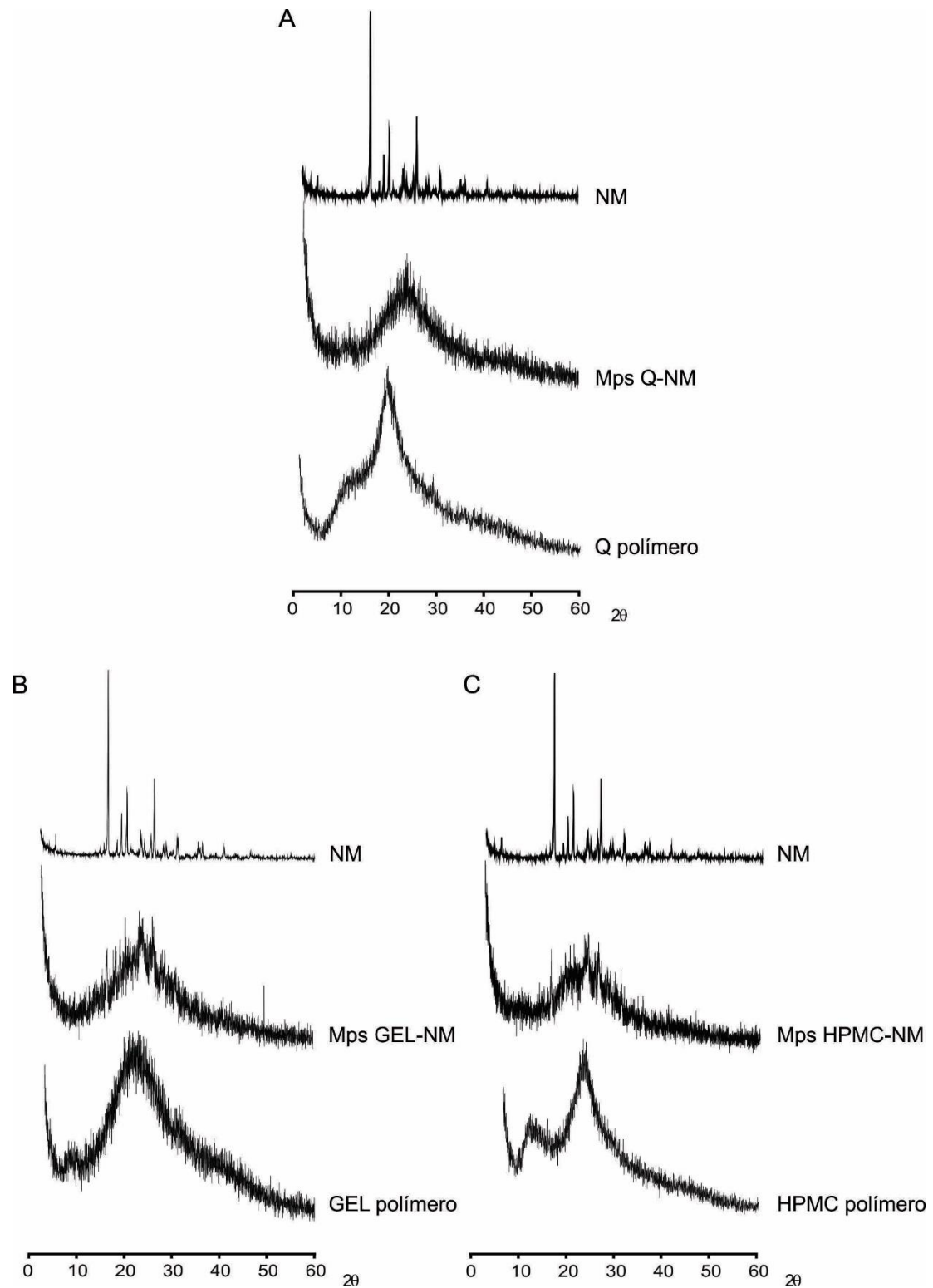
incorporado en las Mps se encontraría en un estado amorfo o desordenado en la matriz polimérica [149]; el estudio por DRX corroborará o no este resultado.

**Tabla IX.** Temperaturas de fusión obtenidos por CDB para el NM y todos los sistemas estudiados

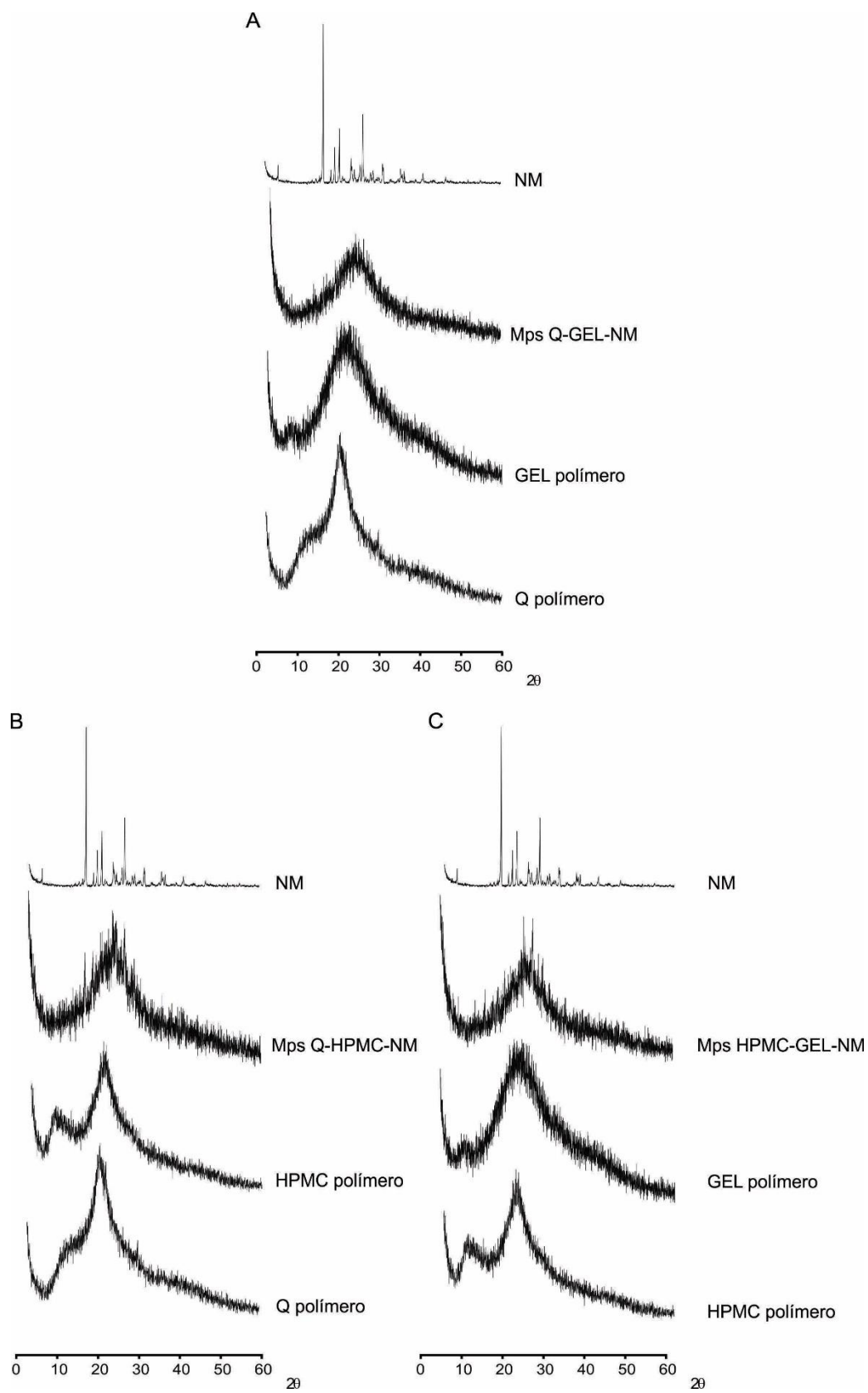
<b>Sistema</b>	<b>Micropartículas cargadas Tf (°C)</b>	<b>Micropartículas vacías Tf (°C)</b>	<b>Solidos Tf (°C)</b>
Q	180,1	177,3	Q: 134,6 – 189,5
HPMC	188,7	187,6	HPMC: 147,3 – 175,5
GEL	188,3	192,6	GEL: 143,5- 184,9 – 189,2 – 207,0
Q-HPMC	176,8	177,3	Q: 134,6 – 189,5 HPMC: 147,3 – 175,5
Q-GEL	186,1	178,2	Q: 134,6 – 189,5 GEL: 143,5- 184,9 – 189,2 – 207,0
HPMC-GEL	191,5	194,7	HPMC: 147,3 – 175,5 GEL: 143,5- 184,9 – 189,2 – 207,0
NM	-	-	186,1

### **Difracción de rayos X**

Los estudios de DRX se realizaron para confirmar los resultados de los estudios térmicos y completar la caracterización de los discos microparticulados. Las Figura 52 y 53 muestran los patrones de rayos X del NM, los polímeros de partida y los diferentes sistemas desarrollados. El difractograma del NM (descrito previamente) mostró un patrón cristalino típico [89]. Los difractogramas de los polímeros de partida estuvieron de acuerdo con los datos reportados previamente (Capítulos I y II, páginas 36 y 60). El Q mostró un pico a 20° relacionado con los cristales de Q anhidro [111], la GEL solo tuvo un pico cristalino típicamente ancho a 21,8° [112], mientras que la HPMC presentó dos picos a 9° y 21°[151, 152].



**Figura 52.** Difractogramas del NM y de los sistemas desarrollados: A) Q, B) GEL, C) HPMC



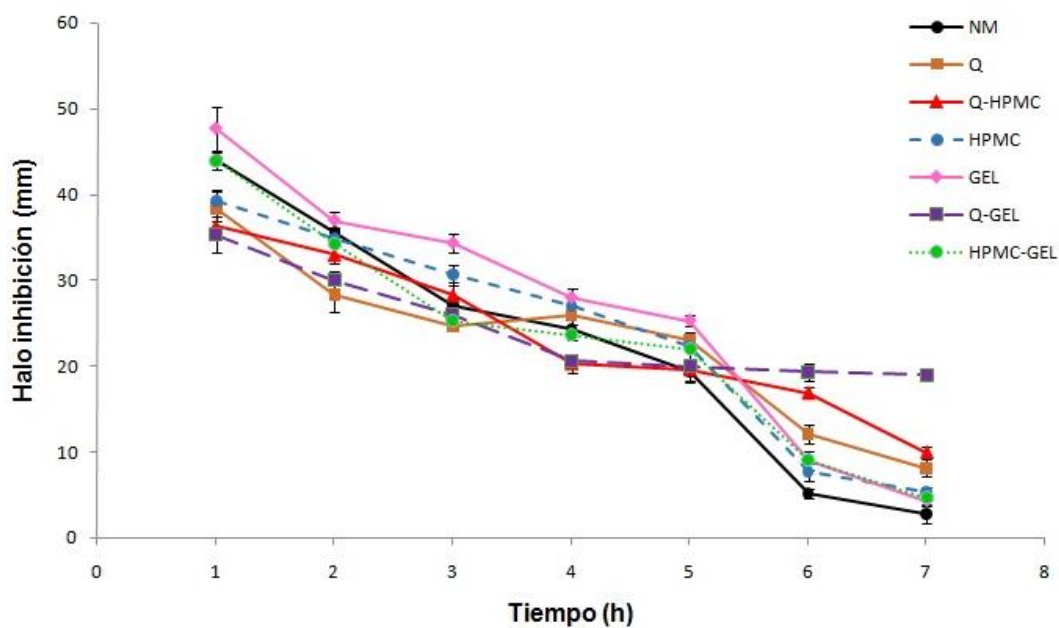
**Figura 53.** Difractogramas del NM y de los sistemas desarrollados: A) Q-GEL, B) Q-HPMC y C) HPMC-GEL

Los difractogramas de los sistemas microparticulados cargados con NM no evidenciaron ningún pico definido correspondiente al fármaco. Aunque algunos picos en los sistemas microparticulados como a  $15,59^\circ$  y  $20,80^\circ$  podrían corresponder al NM, su intensidad está en el rango del ruido instrumental. Este resultado concuerda con lo obtenido por el análisis CDB, e indica que el NM se encontraría en un estado amorfo, o que en las Mps la cristalinidad NM estaría por debajo del límite de detección [91].

### **Actividad *in vitro* - Halos de inhibición en función del tiempo**

Como se observa en la Figura 54, después de 1 h de ensayo, los halos producidos por el NM y los sistemas basados en GEL y HPMC-GEL fueron los más grandes (44-47 mm), mostrando diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con los otros sistemas microparticulados (35-39 mm). En la segunda hora de ensayo, se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los halos de inhibición producidos por los sistemas basados en 100% Q y Q-HPMC (28-30 mm) con respecto a los otros sistemas (33-37 mm).

Después de 5 h de ensayo, los halos producidos por el NM disminuyeron significativamente en comparación con todos los sistemas, seguido de las Mps basadas en 100% GEL, 100% HPMC y la combinación de HPMC-GEL. Los sistemas basados en Q-HPMC y Q-GEL generaron halos de inhibición mayores luego de 6 y 7 h de ensayo. Particularmente, el halo de inhibición producido por el sistema microparticulado basado en Q-GEL se mantuvo desde la cuarta a la séptima hora de ensayo.



**Figura 54.** Halos de inhibición producidos por los diferentes sistemas desarrollados

Estos resultados podrían explicarse por la exposición del NM al medio de cultivo. La GEL es un polímero hidrófilo que se hincha fácilmente en el agua exponiendo el NM cargado al medio de cultivo. Por otro lado, el Q es soluble en soluciones ácidas pero poco soluble a pH neutro, por lo que mantendría su estructura microparticulada. Después de 1 h de ensayo, los sistemas basados en polímeros que se hinchan fácilmente (GEL y HPMC-GEL), expusieron más NM al medio lo que produjo halos más grandes. El sistema microparticulado basado en 100% de Q produjo halos más pequeños al comienzo del ensayo, debido a que la matriz no pudo hincharse en el medio y, por lo tanto, se expuso un contenido menor de NM al medio de cultivo. Se observaron halos de 20 mm luego de 7 h de ensayo producidos por el sistema Q-GEL, mientras que el NM produjo un halo más pequeño, de 3 mm de diámetro. En este tiempo, el halo de inhibición del NM fue muy similar al producido por el sistema microparticulado basado en 100% de GEL.

Estos resultados demostraron que la microencapsulación del NM en el sistema Q-GEL produjo una liberación controlada para este IFA.

## CONCLUSIONES

Se desarrollaron y caracterizaron diferentes sistemas microparticulados basados en combinaciones de polímeros (catiónico, aniónico y no iónico) cargados con nitrato de miconazol. Todos los sistemas mostraron una buena eficiencia de encapsulación; entre ellos, los valores más altos se obtuvieron utilizando un único polímero iónico, probablemente debido a las interacciones entre el fármaco y los polímeros antes del proceso de secado por aspersion. Las interacciones entre los polímeros se observaron mediante espectroscopía infrarroja, mientras que el estado del nitrato de miconazol y los polímeros en los sistemas se estudiaron mediante análisis termogravimétrico y calorimetría diferencial de barrido, lo que demostró que los polímeros producían un efecto protector sobre el fármaco y también que el mismo se encontraría principalmente en un estado amorfo, en concordancia con los resultados obtenidos por difracción de rayos x.

La actividad *in vitro* de los sistemas en el tiempo mostró que las micropartículas basadas en polímeros con carga opuesta presentaron una liberación controlada del fármaco, lo que mantendría su eficacia terapéutica en un tiempo de al menos 7 horas.

## **CAPITULO V**

### **“Formulación de sistemas poliméricos nanoparticulados”**

# CONSIDERACIONES GENERALES PARA EL PRESENTE CAPITULO

Como se mencionó anteriormente, un fármaco modelo frecuentemente utilizado para tratar la candidiasis bucofaríngea es el nitrato de miconazol. Este tipo de infecciones fúngicas tópicas suelen causar dolor, ardor y prurito, y por lo tanto, el uso de fármacos anestésicos como la lidocaína, podría ser útil en las primeras etapas del tratamiento.

La nanoencapsulación empleando biopolímeros podría proteger a los fármacos impidiendo su degradación. Además, estos sistemas podrían producir una liberación sostenida de los fármacos, incrementando la actividad de las formulaciones en el tiempo, reduciendo el número de aplicaciones necesarias para completar el tratamiento.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Desarrollar nanopartículas poliméricas conteniendo nitrato de miconazol y clorhidrato de lidocaína como fármacos modelo.
- Realizar la caracterización físico-química de los sistemas preparados: eficacia de encapsulamiento, tamaño, índice de polidispersidad, y difracción de rayos X.
- Evaluar la liberación de los IFAs desde las nanopartículas y la actividad de los sistemas conteniendo nitrato de miconazol mediante ensayos *in vitro* en cultivos de *C. albicans*.

# MATERIALES Y METODOS

## ***Materiales***

Q (ChitoClear®, 250-300 KDa de peso molecular promedio y >95% de N-deacetilación) fue suministrado por Primex (Noruega), GEL fue adquirida por Fluka 24723-500G-F (Alemania), Pluronic F-127 proporcionado por Sigma-Aldrich (Buenos Aires, Argentina), dimetilsulfóxido (DMSO) adquirido por Anedra (Argentina), NM y clorhidrato de lidocaína (CHLID) de grado farmacéutico fueron suministrados por Parafarm (Buenos Aires, Argentina). Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

## ***Métodos***

### **Preparación de nanopartículas**

La GEL (200 mg) se disolvió en 16 mL de agua destilada a 60 °C. A esta solución se le añadió gota a gota 32 mL de una solución etanólica de Pluronic F-127 (P-127, 2% p/v) agitando a 400 rpm. La relación empleada entre el P-127 y la GEL fue 32:1 [152]. Posteriormente, se adicionó el NM o el CHLID (ambos fármacos al 20% p/p respecto a la masa total de polímeros empleados en cada sistema). Simultáneamente, una solución de Q (200 mg en 133 mL de ácido acético 30% v/v) y se añadió gota a gota a la solución de GEL y P-127 (mantenida a 40 °C) agitando a 400 rpm durante 24 h para reticular las nanopartículas (Nps) [153]. Las dispersiones obtenidas se congelaron y se liofilizaron (Labconco, Kansas City, MO, EE. UU) durante 24 h a -50 °C. La composición de las distintas formulaciones preparadas se presenta en la Tabla X. Adicionalmente, se sintetizaron Nps sin fármacos que fueron empleadas como blancos de los sistemas.

**Tabla X.** Composición de las nanopartículas desarrolladas

Sistema	Proporción de polímeros		Carga de los IFAs [% p/p respecto a los polímeros]	
	Q	GEL	NM (20% p/p)	CHLID (20% p/p)
1	10%	90%	√	-
2	25%	75%	√	-
3	50%	50%	√	-
4	75%	25%	√	-
5	90%	10%	√	-
6	10%	90%	-	√
7	25%	75%	-	√
8	50%	50%	-	√
9	75%	25%	-	√
10	90%	10%	-	√

## Caracterización de las nanopartículas

### Eficacia de encapsulamiento

La eficacia de encapsulamiento se determinó mediante diferentes métodos en función del IFA cargado. En el caso de los sistemas cargados con NM, 30 mg de cada sistema se colocaron en 90 mL de metanol (solvente en el cual el NM es completamente soluble) [155, 156] y la dispersión se agitó a 400 rpm durante 4 h a temperatura ambiente (a fin de asegurar la completa extracción del NM de las Nps). La concentración de NM en la solución se determinó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 232 nm por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), empleando un cromatógrafo de la serie 1200 de Agilent Technologies (Santa Clara, EE. UU.). La determinación se llevó a cabo a 40

°C utilizando una columna SiliaChrom C18 (150 × 4,6 mm, 5 µm) y usando como fase móvil una mezcla acetato de amonio (50 mM, pH = 4) : acetonitrilo (35:65) bombeada a un caudal de 1,5 mL/min [156]. El porcentaje de EE se calculó de acuerdo con la Ecuación 2 (Capítulo IV). Este procedimiento fue realizado por triplicado.

Para el caso de los sistemas cargados con CHLID, cada muestra de nanopartículas (75 mg) se agitó en 30 mL de buffer fosfato (solvente en el cual el CHLID es completamente soluble) durante 1 h, a temperatura ambiente bajo agitación magnética (400 rpm) para extraer completamente el fármaco. El porcentaje de EE se determinó por espectrofotometría UV a 265 nm (espectrofotómetro UV Shimadzu UV-1800 Kyoto, Japón) [157] de acuerdo con la Ecuación 2 (Capítulo IV). El ensayo se realizó por triplicado.

### **Potencial Zeta, determinación de tamaño e índice de polidispersidad**

Los ensayos se llevaron a cabo utilizando un instrumento de dispersión dinámica de luz (DDL) (Horiba, Nano Particle Analyzer SZ-100, Kyoto, Japón). Los parámetros medidos fueron el tamaño de las Nps, el índice de polidispersidad (IP) y el potencial zeta (Pz). Los tamaños de los nanosistemas (diámetro hidrodinámico) se midieron teniendo en cuenta una distribución de tamaño de partícula. Todas las mediciones se realizaron por triplicado con un ángulo de 173° a 25 °C.

### **Difracción de rayos X**

Los estudios de difracción de rayos X del NM, CHLID, los polímeros de partida y las diferentes Nps fueron realizados como se ha descrito en los capítulos anteriores.

## **Estudio de disolución del IFAs y liberación desde los sistemas**

Los estudios de disolución se realizaron a 37 °C en 900 mL de saliva artificial, o con el agregado de un 1% de lauril sulfato de sodio (LSS) al medio, utilizando un aparato USP XXIV 2 (Hanson Research, SR8 8-Flask Bath, Ontario, Canadá) con paletas rotando a 50 rpm [65]. Se utilizaron diferentes masas de los sistemas nanoparticulados teniendo en cuenta para ello la EE de cada sistema. La masa empleada de cada sistema fue la que contenía 200 mg de NM o 600 mg de CHLID. Los sistemas se dispersaron en el medio de disolución y a diferentes intervalos de tiempo: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 180, 240, 300 y 360 min se tomaron tres muestras de 5 mL.

La cantidad de fármaco liberado se determinó mediante espectrofotometría UV utilizando la banda de absorción del IFA a 265 nm (CHLID) o a 272 nm (NM). Se añadió un volumen igual del medio de disolución después de cada recolección de muestra para mantener un volumen constante.

## **Actividad antifúngica *in vitro* mediante el método de microdilución en caldo**

### **Preparación de soluciones madre**

Se prepararon soluciones madre de los diferentes sistemas a una concentración de 800 µg/mL en DMSO. Las soluciones se conservaron a -20 °C. Se utilizó NM como estándar a partir de una solución madre preparada a una concentración de 800 µg/mL en DMSO, y se conservó a 4 °C [158].

### **Evaluación de la concentración inhibitoria mínima**

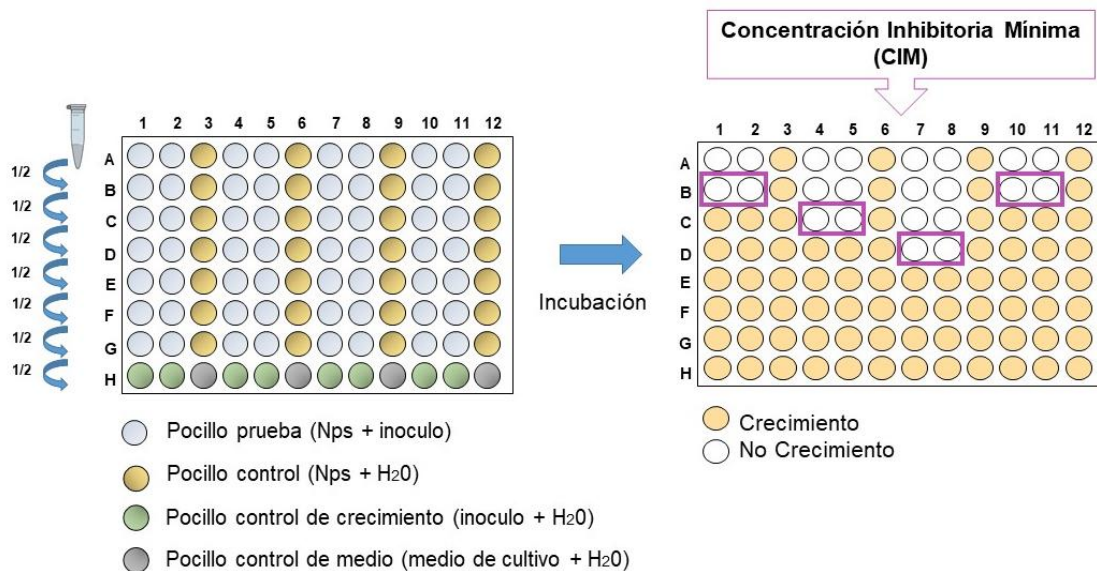
La Concentración inhibitoria mínima (CIM) del fármaco y los sistemas se determinó mediante el método de microdilución en caldo recomendado por CLSI para levaduras, en microplacas de 96 pocillos, con la modificación de que el medio utilizado fue Sabouraud-glucosa [159].

Para el ensayo, soluciones de trabajo (preparadas a partir de las soluciones madre) de las muestras a analizar, se diluyeron al medio en forma seriada

obteniéndose un rango de concentraciones entre 16 y 0,002 µg/mL. Un volumen de 100 µL de cada solución, se colocó en los diferentes pocillos de las microplacas. La concentración de DMSO fue ≤ 1% [160]. A continuación, se agregaron 100 µL de suspensión de inóculo o 100 µL de agua destilada estéril en los pocillos correspondientes. Cada ensayo se realizó por duplicado. Las placas se incubaron en oscuridad durante 24 h a 28 °C utilizando cámara húmeda. Luego del tiempo de incubación, se obtuvieron los valores de absorbancia de los pocillos a 405 nm con un lector de microplacas (Figura 55). A partir de estos valores, se calcularon los porcentajes de inhibición del crecimiento fúngico a las diferentes concentraciones ensayadas empleando la Ecuación 3, y se construyeron las curvas dosis-respuesta.

$$\text{Porcentaje de inhibición} = 100 - ((Abs_{SCM} - Abs_{SBM}) / (Abs_{SCC} - Abs_{SCE})) \times 100 \quad [\text{Ecuación 3}]$$

Donde  $Abs_{SCM}$  es la absorbancia promedio a una dada concentración de la muestra,  $Abs_{SBM}$  es la absorbancia del blanco de las muestras,  $Abs_{SCC}$  es la absorbancia promedio de los controles de crecimiento y  $Abs_{SCE}$  es la absorbancia promedio de los controles de esterilidad.



**Figura 55.** Preparación de las microplacas de 96 pocillos para la determinación de la CIM del fármaco y de los sistemas siguiendo los lineamientos del CLSI

### **Actividad *in vitro* – Determinación de la concentración fungicida mínima**

La concentración fungicida mínima (CFM) es la estimación más común de la actividad fungicida de un compuesto y representa la menor concentración del agente antifúngico necesaria para matar el 99,99% del inóculo inicial luego de 24 h de incubación bajo condiciones estandarizadas. Este ensayo se realizó de la siguiente manera: de la microplaca en la que se determinó la CIM de cada muestra, se tomaron 10  $\mu$ L de los pocillos que contenían la muestra a la CIM y de los pocillos por encima de la misma (concentraciones mayores), y se sembraron en placas de Petri conteniendo agar Sabouraud-glucosa. Luego de la incubación en oscuridad durante 24-48 h a 28 °C, se observó el crecimiento de las levaduras [161, 162].

### **Actividad *in vitro* – Halos de inhibición en función del tiempo**

La prueba de la zona de inhibición en función del tiempo fue realizada como se ha descrito en los capítulos anteriores. En este caso se empleó una masa de NM en polvo de 8 mg adherido a una cinta como control y se colocaron las Nps (conteniendo una masa de NM equivalente a 8 mg) sobre la superficie del agar. Cada sistema se movió a otra zona del cultivo después de 1 h y el procedimiento se repitió durante 24 h. Luego, las placas se incubaron al aire a 28 °C y se leyeron después de 24 h. Los diámetros de los halos generados por cada disco se determinaron utilizando un calibre [121].

# RESULTADOS Y DISCUSION

## **Eficacia de encapsulamiento, potencial zeta, determinación de tamaño e índice de polidispersidad**

Como se puede observar en la Tabla XI, se obtuvieron porcentajes de EE que variaron entre 34,50 y 96,46% para el CHLID y entre 65,14 y 96,76% para el NM. Los valores más bajos de EE para los fármacos se obtuvieron cuando las concentraciones empleadas de Q fueron bajas (10 y 25%). Este hecho fue más evidente para el caso del CHLID y podría deberse a que el fármaco es totalmente soluble en medio acuoso, por lo que se necesita un mayor número de interacciones con el Q (polímero que se encuentra cargado positivamente al pH en que se desarrollaron los sistemas) para contener al fármaco en el interior de la nanopartícula. El rango de los tamaños de las Nps, estuvo entre 118,7 y 319,5 nm, lo cual es aceptable para este tipo de sistemas [163]. En la caracterización de nanosistemas, el parámetro IP es el grado de dispersión del sistema, el mismo se debe encontrar entre 0 y 1, siendo 0 una distribución de tamaño sin dispersión (monodispersa), y 1 una distribución de tamaño muy amplia, o polidispersa [165–167]. En este caso los nanosistemas presentaron un IP que varió entre 0,120 y 0,596, mostrando una dispersión moderada y adecuada [167]. El Pz, otro de los parámetros estudiados, es la carga eléctrica efectiva en la superficie de las Nps. Este parámetro varió entre 20,11 y 37,12 mV, y en todos los casos fueron valores positivos, indicando una carga superficial positiva. Este hecho podría deberse a que el pH del medio se encontró por debajo de 6,3, debido al ácido acético utilizado en la preparación de la solución de Q. Como se ha mencionado, el Q, a un pH < 6,3, posee sus grupos aminos protonados y la GEL en este medio, sus grupos carboxilos protonados (pero sin carga neta).

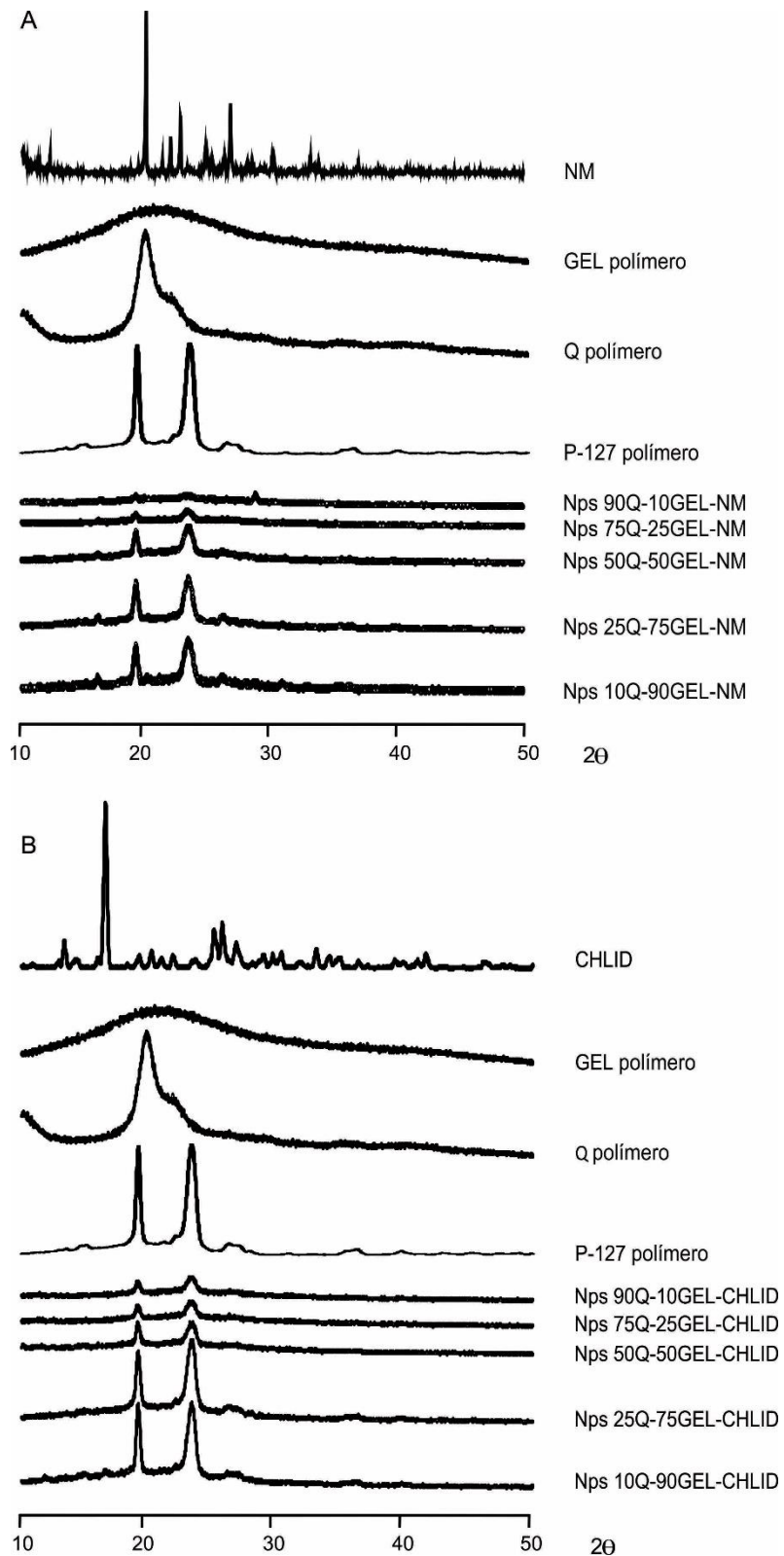
**Tabla XI.** Propiedades de los sistemas nanoparticulados estudiados

Sistema	EE (%)	Tamaño (nm)	IP	Pz (mV)
10Q-90GEL	-	218,4 ± 1,5	0,422 ± 0,019	34,30 ± 1,1
10Q-90GEL-NM	65,14	131,1 ± 2,1	0,278 ± 0,024	23,20 ± 1,5
10Q-90GEL-CHLID	34,50	199,3 ± 0,9	0,596 ± 0,051	33,11 ± 1,8
25Q-75GEL	-	132,2 ± 1,3	0,551 ± 0,112	26,15 ± 2,6
25Q-75GEL-NM	81,17	139,3 ± 1,7	0,381 ± 0,047	27,30 ± 1,0
25Q-75GEL-CHLID	57,13	153,9 ± 2,6	0,288 ± 0,033	27,12 ± 2,8
50Q-50GEL	-	164,4 ± 3,4	0,380 ± 0,027	34,63 ± 1,1
50Q-50GEL-NM	77,68	187,4 ± 4,5	0,120 ± 0,045	29,60 ± 2,1
50Q-50GEL-CHLID	67,29	174,8 ± 2,3	0,149 ± 0,065	30,07 ± 2,3
75Q-25GEL	-	198,8 ± 0,8	0,525 ± 0,083	27,05 ± 1,4
75Q-25GEL-NM	95,25	118,7 ± 0,9	0,326 ± 0,074	20,30 ± 2,6
75Q-25GEL-CHLID	77,80	178,9 ± 1,6	0,415 ± 0,091	20,11 ± 3,7
90Q-10GEL	-	267,6 ± 2,8	0,534 ± 0,026	37,12 ± 1,4
90Q-10GEL-NM	96,76	319,5 ± 3,1	0,216 ± 0,047	23,14 ± 1,7
90Q-10GEL-CHLID	96,46	149,9 ± 2,6	0,410 ± 0,063	21,14 ± 1,6

### Difracción de rayos X

Los difractogramas del NM, los polímeros de partida y las Nps cargadas con este IFA se presentan en la Figura 56A. El difractograma del NM estuvo de acuerdo con los datos reportados en los capítulos precedentes. El difractograma del Q empleado para desarrollar las Nps, mostró un pico en  $19,87^\circ$  relacionado con los cristales de Q anhidro [111]. La GEL reveló una estructura esencialmente amorfa con una banda ancha y poco prominente alrededor  $20^\circ$  [83]. Finalmente, el difractograma del P-127 mostró los 2 picos característicos en  $19,2^\circ$  y  $23,4^\circ$

coincidentes con lo reportado en la bibliografía [168]. En los difractogramas de los nanosistemas, se pueden observar 2 picos en  $19^\circ$  y  $23^\circ$  debido a la presencia del P-127 en las Nps, las señales correspondientes a estos picos disminuye a medida que la relación de Q con respecto a la GEL aumenta (como se detalló en la sección “Materiales y Métodos” la relación P-127:GEL se mantiene fija (32:1)). En consecuencia una disminución de la GEL en la formulación, se relaciona con una disminución de la cantidad de P-127. Respecto a las señales características del fármaco, en ninguno de los difractogramas de los nanosistemas se evidencia algún pico característico del NM. Esto podría deberse a que el IFA en el proceso de preparación perdió parcial o totalmente su cristalinidad, encontrándose de manera parcialmente cristalina (por debajo del límite de detección) o en un estado amorfo en los sistemas. En la Figura 56B, se observan los difractogramas del CHLID, los polímeros de partida y las diferentes Nps cargadas con este fármaco. El difractograma del CHLID presentó picos característicos de cristalinidad [169, 170] y el estudio de los polímeros de partida se analizó anteriormente, por lo que no se volverá a detallar. Con respecto a los difractogramas de los nanosistemas cargados con CHLID, los mismos fueron similares a los difractogramas cargados con NM. En este caso, tampoco se pudo evidenciar algún pico característico del CHLID, posiblemente debido una reducción parcial de su cristalinidad o al paso al estado amorfo durante el proceso de obtención de las Nps.



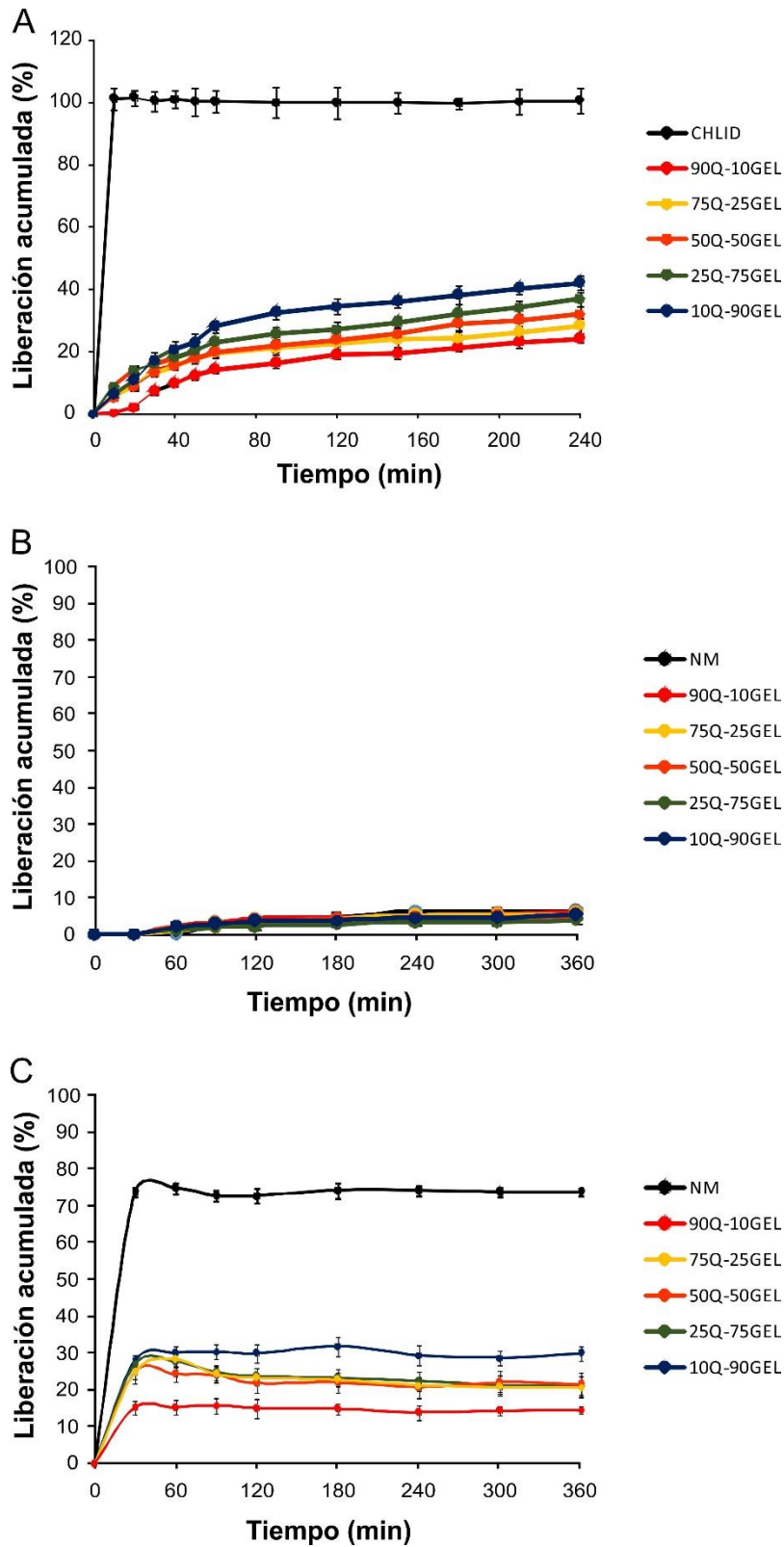
**Figura 56.** Difractogramas de: A) NM, polímeros de partida y las nanopartículas cargadas con este IFA y B) CHLID y los sistemas, polímeros de partida y las nanopartículas cargadas con este IFA

## **Estudio de disolución de los IFAs y liberación desde los sistemas**

Los perfiles de disolución del NM, el CHLID y los diferentes nanosistemas en saliva artificial se muestran en la Figura 57A y 57B. El CHLID, al ser un fármaco muy soluble en agua, presentó una rápida velocidad de disolución, y alcanzó el 100% solubilizado después de 10 min de ensayo. En los sistemas nanoparticulados cargados con CHLID, se observó una velocidad de disolución controlada durante todo el ensayo (entre 24,0 y 42,1%), a pesar que el CHLID redujo su cristalinidad por debajo del límite de detección o se encuentra en estado amorfo en los nanosistemas (Figura 57A).

La disolución del NM y la liberación desde las Nps cargadas con este IFA en saliva artificial fue similar, generando perfiles de disolución casi superponibles. Ningún sistema, ni tampoco el fármaco sin nanoencapsular, permitieron superar el 6,3% de fármaco disuelto al final del ensayo (Figura 57B). Por lo tanto, empleando este medio de disolución no se ha podido obtener ninguna información para analizar el comportamiento de las Nps. Por este motivo, se decidió llevar a cabo nuevamente el ensayo de disolución del NM y los nanosistemas (cargados con este IFA) en un medio que contenía LSS al 1% p/v. Como se observa en la Figura 57C, la velocidad disolución del NM fue de casi el 80% a los 40 min de ensayo en este medio, mientras que todos los sistemas nanoparticulados tuvieron una liberación más controlada del IFA.

En base a lo observado en las Figuras 57A y 57C, los sistemas nanoparticulados presentaron valores de liberación menores que los IFAs en estudio. Tanto en la Figura 57A como 57C se observó además una tendencia: cuando la proporción de Q fue mayor, la liberación del fármaco desde las nanopartículas fue menor. Este hecho podría deberse a que en un medio acuoso neutro (saliva artificial), el Q, al ser prácticamente insoluble en este medio, retiene la liberación del fármaco.



**Figura 57.** Ensayo de velocidad disolución de: A) CHLID y nanosistemas cargados con CHLID en saliva artificial, B) NM y nanosistemas cargados con NM en saliva artificial, C) NM y nanosistemas cargados con NM en LSS 1% p/v

Si bien en los capítulos anteriores nos hemos focalizado en aumentar la velocidad de disolución del fármaco poco soluble, en este capítulo se intenta controlar la liberación del mismo desde las Nps. El fármaco en el interior de los nanosistemas probablemente se encuentre en un estado amorfo o ha disminuido su cristalinidad (según lo observado en los estudios de DRX); por lo tanto la proporción de fármaco que se vaya liberando en el tiempo desde las nanopartículas podría ejercer rápidamente su efecto terapéutico. Por lo tanto, el control de la liberación desde los nanosistemas permitiría mantener el efecto terapéutico de las formulaciones en el tiempo.

### **Actividad *in vitro* – Determinación de la CIM y CFM**

En la Tabla XII se presentan las CIM<sub>100</sub>, CIM<sub>50</sub> y los valores de CFM de los sistemas nanoparticulados y del NM. La CIM<sub>100</sub> se define como la concentración mínima que causó la inhibición completa del 100% de la levadura y la CIM<sub>50</sub> representa la concentración que inhibe el 50% del crecimiento fúngico [171]. Los sistemas nanoparticulados sin fármaco cargado no mostraron actividad contra *C. albicans*. Por el contrario, tanto el NM como las Nps cargadas con este IFA inhibieron el crecimiento de *C. albicans* con CIM<sub>100</sub> entre 0,015 y 2,000 µg/mL y CIM<sub>50</sub> entre 0,004 y 0,250 µg/mL. Además de la CIM, se determinó la capacidad fungicida de los sistemas activos, a través de la determinación de la CFM. La CFM obtenida para NM fue 4 µg/mL indicando que es fungistático comparando este valor con su CIM<sub>50</sub> que fue de 0,004 µg/mL. Un compuesto es fungicida cuando el valor de CIM es similar a la CFM, para este caso la CIM << CFM [172].

Los sistemas nanoparticulados mostraron valores de CFM >16 µg/mL, evidenciando que ninguno de los sistemas tiene efecto fungicida, sino fungistático.

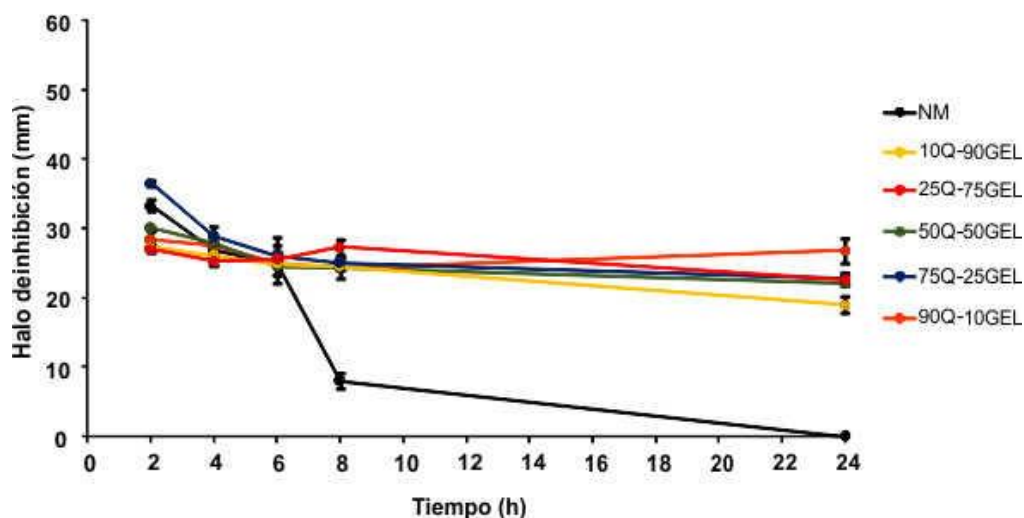
**Tabla XII.** Valores de CIM<sub>100</sub>, CIM<sub>50</sub> y CFM de los sistemas nanoparticulados y el NM

<b>Sistema</b>	<b>CIM<sub>100</sub></b>	<b>CIM<sub>50</sub></b>	<b>CFM</b>
NM	0,015	0,004	4
10Q-90GEL	>16	>16	>16
10Q-90GEL-NM	0,03	0,015	>16
25Q-75GEL	>16	>16	>16
25Q-75GEL-NM	0,25	0,015	>16
50Q-50GEL	>16	>16	>16
50Q-50GEL-NM	16	0,015	>16
75Q-25GEL	>16	>16	>16
75Q-25GEL-NM	0,5	0,250	>16
90Q-10GEL	>16	>16	>16
90Q-10GEL-NM	2	0,250	>16

Contrariamente a lo obtenido en los capítulos anteriores, las Nps con alto contenido de Q no mostraron mayor actividad respecto de aquellas con bajo contenido de este polímero.

### **Actividad *in vitro* – Halos de inhibición en función del tiempo**

En la Figura 58 se muestran los diámetros de los halos de inhibición producidos por el NM y los nanosistemas cargados con este IFA. Se observó que durante la segunda hora de ensayo, los halos de inhibición del NM y los diferentes sistemas fueron entre 27,0 y 36,5 mm de diámetro. Todos los halos de inhibición disminuyeron lentamente hasta la sexta hora de ensayo (25-26 mm). A partir de ese tiempo el NM disminuyó considerablemente su actividad en el cultivo de *Candida* evaluado (8 mm). No fue así con los diferentes sistemas nanoparticulados que mantuvieron su actividad en ese tiempo.



**Figura 58.** Halos de inhibición producidos por los diferentes sistemas desarrollados

Luego de 24 h de ensayo, el NM no produjo halo de inhibición. Contrariamente los nanosistemas mantuvieron su actividad, mostrando halos de inhibición de entre 19 y 26,8 mm al final del ensayo. Este hecho podría explicarse relacionándolo con el estudio de disolución (Figura 57C). Estos sistemas retardan la velocidad de disolución del NM, provocando una lenta liberación del fármaco, en consecuencia una liberación sostenida en el tiempo. Esto se condice con lo postulado en los sistemas microparticulados basados en la combinación Q-GEL (Capítulo IV, página 117). Sin embargo, los sistemas nanoparticulados fueron notablemente más eficientes que los microparticulados en controlar la liberación del NM.

## CONCLUSIONES

Se desarrollaron y caracterizaron diferentes sistemas nanoparticulados basados en combinaciones de polímeros cargados con nitrato de miconazol y clorhidrato de lidocaína por separado. Todos los sistemas mostraron poder encapsular a los fármacos. Ambos habrían disminuido su carácter cristalino o se encontrarían en un estado amorfo dentro de los sistemas.

La actividad *in vitro* en el tiempo de los nanosistemas, cargados con nitrato de miconazol se mantuvo por 24 h, demostrando una liberación controlada del fármaco, condiciéndose con los estudios de velocidad de disolución.

Estos sistemas nanoparticulados fueron capaces de controlar la liberación de los IFAs, y en consecuencia, podrían ser utilizados incorporándolos dentro de una matriz polimérica adhesiva para mantener la eficacia terapéutica durante un tiempo prolongado.

# CONCLUSIONES FINALES Y PROYECCIONES A FUTURO

1. En este trabajo de Tesis se desarrollaron y caracterizaron matrices poliméricas mucoadhesivas empleando combinaciones de polímeros catiónicos, aniónicos y no iónicos cargadas con nitrato de miconazol, observándose que si bien todas las formulaciones presentaron buena actividad antifúngica, aquella basada en la combinación de quitosano e hidroxipropil metilcelulosa fue la formulación más apropiada en términos de propiedades mecánicas y adhesividad.
2. Se desarrollaron diferentes matrices poliméricas empleando cinco polímeros con diferentes densidades de carga conteniendo nitrato de miconazol. Las formulaciones más apropiadas fueron aquellas basadas en las combinaciones de quitosano-gelatina, y quitosano-carbopol, las cuales mostraron buenas propiedades mecánicas y de adhesividad, índice de hinchamiento bajo y una mayor actividad antifúngica respecto al nitrato de miconazol.
3. Respecto al modo de incorporación del fármaco en las matrices, no se detectaron diferencias significativas en el comportamiento mecánico entre la incorporación del nitrato de miconazol suspendido y solubilizado a las concentraciones analizadas.
4. Con el fin de mantener la actividad del fármaco en el tiempo, se desarrollaron y caracterizaron diferentes sistemas microparticulados basados en combinaciones de polímeros naturales catiónicos, aniónicos y no iónicos cargados con nitrato de miconazol. Todos los sistemas mostraron una buena capacidad de encapsulamiento del fármaco. La actividad *in vitro* de los sistemas en el tiempo mostró que las micropartículas basadas en

polímeros con carga opuesta presentaron una liberación controlada del nitrato de miconazol durante 7 horas.

5. Finalmente se desarrollaron y caracterizaron diferentes sistemas nanoparticulados basados en combinaciones de polímeros catiónicos y aniónicos cargados con nitrato de miconazol y clorhidrato de lidocaína. Todos los sistemas lograron encapsular a los fármacos y mantener la actividad *in vitro* del nitrato de miconazol en el tiempo por 24 horas.

En base a los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis, se plantea como trabajo a futuro el desarrollo de matrices poliméricas mucoadhesivas cargadas con clorhidrato de lidocaína que permitan una rápida velocidad de liberación de este fármaco y simultáneamente con nanopartículas conteniendo nitrato de miconazol. De este modo se lograría un rápido efecto anestésico, y a la vez una actividad antifúngica prolongada. Así sería posible reducir el número de aplicaciones respecto a los tratamientos convencionales (buches y geles) sin disminuir la eficacia terapéutica, haciendo más simple el cumplimiento de la farmacoterapia por parte del potencial paciente.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] C. Spampinato and D. Leonardi, "Candida infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents," *Biomed Res. Int.*, vol. 2013, pp. 1–13, 2013.
- [2] J. D. Sobel *et al.*, "Vulvovaginal candidiasis: Epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 178, no. 2, pp. 203–211, 1998.
- [3] J. L. Puerto, P. García-Martos, A. Márquez, L. García-Agudo, and J. Mira, "Candidiasis orofaríngea," *Rev. Diagnóstico Biológico*, vol. 50, no. 4, pp. 177–181, 2001.
- [4] J. Duyck, K. Vandamme, P. Muller, and W. Teughels, "Overnight storage of removable dentures in alkaline peroxide-based tablets affects biofilm mass and composition," *J. Dent.*, vol. 41, no. 12, pp. 1281–1289, 2013.
- [5] W. D. James, T. G. Berger, D. M. Elston, and R. B. Odom, *Andrews' Diseases of the skin: clinical dermatology*, 10th Ed. Saunders Elsevier, 2006.
- [6] J. M. Llabot, R. H. Manzo, and D. A. Allemandi, "Novel mucoadhesive extended release tablets for treatment of oral Candidosis: 'in vivo' evaluation of the biopharmaceutical performance," *J. Pharm. Sci.*, vol. 98, no. 5, pp. 1871–1876, 2009.
- [7] B. Uygun-Can, T. Kadir, and B. Gumru, "Effect of oral antiseptic agents on phospholipase and proteinase enzymes of *Candida albicans*," *Arch. Oral Biol.*, vol. 62, pp. 20–27, 2016.
- [8] L. P. Samaranayake, W. Keung Leung, and L. Jin, "Oral mucosal fungal infections," *Periodontol. 2000*, vol. 49, no. 1, pp. 39–59, 2009.
- [9] V. K. Rai *et al.*, "Development of cellulosic polymer based gel of novel ternary mixture of miconazole nitrate for buccal delivery," *Carbohydr. Polym.*, vol. 103, pp. 126–133, 2014.
- [10] A. N. B. Ellepola and L. P. Samaranayake, "Antimycotic Agents in Oral Candidosis: An Overview: 2. Treatment of Oral Candidosis," *Dent. Update*, vol. 27, no. 4, pp. 165–174, 2000.
- [11] V. García-Patos Briones and G. A. Español, "Terapéutica sistémica - Protocolos de

- Dermatología,” Asociación Española de Pedriatría, 2017.
- [12] A. Barasch and A. V. Griffin, “Miconazole revisited: new evidence of antifungal efficacy from laboratory and clinical trials,” *Future Microbiol.*, vol. 3, no. 3, pp. 265–269, 2008.
- [13] D. Kobayashi *et al.*, “Endogenous reactive oxygen species is an important mediator of miconazole antifungal effect,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 46, no. 10, pp. 3113–3117, 2002.
- [14] “Farmacopea Argentina Volumen I,” 7ma Ed., 2013.
- [15] B. C. Brunton, Laurence L., Chabner, Bruce A. and Knollmann, *Goodman & Gilman: Las Bases Farmacológicas De La Terapéutic*, 13th Ed. McGraw-Hill, 2019.
- [16] M. E. Aulton, “Farmacia: La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas,” 2nd Ed., Elsevier, 2004.
- [17] C. Ishizawa and J. Nakamatsu, “Matrices poliméricas para liberación controlada de sustancias activas,” *Rev. Química*, vol. 16, no. 1–2, pp. 13–23, 2002.
- [18] Marcos Luciano Bruschi, “Drug delivery systems,” in *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*, 2015, pp. 87–194.
- [19] S. Merino, C. Martín, K. Kostarelos, M. Prato, and E. Vázquez, “Nanocomposite Hydrogels: 3D Polymer–Nanoparticle Synergies for On-Demand Drug Delivery,” *ACS Nano*, vol. 9, no. 5, pp. 4686–4697, 2015.
- [20] G. P. Andrews, T. P. Lavery, and D. S. Jones, “Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 71, no. 3, pp. 505–518, 2009.
- [21] S. Lankalapalli and V. R. M. Kolapalli, “Polyelectrolyte complexes: A review of their applicability in drug delivery technology,” *Indian J. Pharm. Sci.*, vol. 71, no. 5, pp. 481–487, 2009.
- [22] E. A. Kharenko, N. I. Larionova, and N. B. Demina, “Mucoadhesive drug delivery systems (Review),” *Pharm. Chem. J.*, vol. 43, no. 4, pp. 200–208, 2009.
- [23] M. Rinaudo, “Chitin and chitosan: Properties and applications,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 31, no. 7, pp. 603–632, 2006.

- [24] V. K. Thakur and M. K. Thakur, "Handbook of polymers for pharmaceutical technologies: Structure and chemistry. Vol I," Ed. Wiley, 2015.
- [25] B. Krajewska, "Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 35, no. 2–3, pp. 126–139, 2004.
- [26] M. K. Singh, S. K. Prajapati, A. Mahor, N. Rajput, and R. Singh, "Chitosan: a novel excipient in pharmaceutical formulation : A Review," *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, vol. 2, no. 9, pp. 2266–2277, 2011.
- [27] F. Munarin, M. C. Tanzi, and P. Petrini, "Advances in biomedical applications of pectin gels," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 51, no. 4, pp. 681–689, 2012.
- [28] S. Galus and A. Lenart, "Development and characterization of composite edible films based on sodium alginate and pectin," *J. Food Eng.*, vol. 115, no. 4, pp. 459–465, 2013.
- [29] S. Tripathi, G. K. Mehrotra, and P. K. Dutta, "Preparation and physicochemical evaluation of chitosan/poly(vinyl alcohol)/pectin ternary film for food-packaging applications," *Carbohydr. Polym.*, vol. 79, no. 3, pp. 711–716, 2010.
- [30] T. Vandamme, A. Lenourry, C. Charrueau, and J.-C. Chaumeil, "The use of polysaccharides to target drugs to the colon," *Carbohydr. Polym.*, vol. 48, no. 3, pp. 219–231, 2002.
- [31] N. Perone, E. Torrieri, M. A. Nicolai, S. Cavella, F. Addeo, and P. Masi, "Structure and properties of hydroxypropyl methyl cellulose—Sodium caseinate film cross-linked by TGase," *Food Packag. Shelf Life*, vol. 1, no. 2, pp. 113–122, 2014.
- [32] K. Deshmukh, M. Basheer Ahamed, R. R. Deshmukh, S. K. Khadheer Pasha, P. R. Bhagat, and K. Chidambaram, *Biopolymer composites with high dielectric performance: interface engineering*. Elsevier, 2017.
- [33] G. Kaur, J. Grewal, K. Jyoti, U. K. Jain, R. Chandra, and J. Madan, "Oral controlled and sustained drug delivery systems," in *Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems*, Elsevier, 2018, pp. 567–626.
- [34] J. Siepmann and N. . Peppas, "Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC)," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 48, no. 2–3,

pp. 139–157, 2001.

- [35] M. A. Montenegro, M. L. Boiero, L. Valle, and C. D. Borsarelli, “*Gum arabic: more than an edible emulsifier.*” InTech, 2012.
- [36] Y. Luo and Q. Wang, “Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 64, pp. 353–367, 2014.
- [37] S. Patel and A. Goyal, “Applications of natural polymer gum arabic: a review,” *Int. J. Food Prop.*, vol. 18, no. 5, pp. 986–998, 2015.
- [38] Y. Luo and Q. Hu, “Food-derived biopolymers for nutrient delivery,” in *Nutrient Delivery*, Academic Press, 2017, pp. 251–291.
- [39] M. R. Avadi *et al.*, “Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and arabic gum with ionic gelation method,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 6, no. 1, pp. 58–63, 2010.
- [40] E. Shahram *et al.*, “Evaluation of chitosan–gelatin films for use as postoperative adhesion barrier in rat cecum model,” *Int. J. Surg.*, vol. 11, no. 10, pp. 1097–1102, 2013.
- [41] I. Arvanitoyannis, A. Nakayama, and S. Aiba, “Edible films made from hydroxypropyl starch and gelatin and plasticized by polyols and water,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 36, no. 2–3, pp. 105–119, 1998.
- [42] R. Barreiro-Iglesias, C. Alvarez-Lorenzo, and A. Concheiro, “Incorporation of small quantities of surfactants as a way to improve the rheological and diffusional behavior of carbopol gels,” *J. Control. Release*, vol. 77, no. 1–2, pp. 59–75, 2001.
- [43] D. A. Real *et al.*, “Design, Characterization, and In Vitro Evaluation of Antifungal Polymeric Films,” *AAPS PharmSciTech*, vol. 14, no. 1, pp. 64–73, 2013.
- [44] Y. Liang *et al.*, “Algal biorefineries,” *Industrial Biorefineries and White Biotechnology*. Elsevier, 2015.
- [45] Ź. Król, M. Malik, K. Marycz, and A. Jarmoluk, “Characteristic of gelatine, carrageenan and sodium alginate hydrosols treated by direct electric current,” *Polymers (Basel)*, vol. 8, no. 8, pp. 1–19, 2016.

- [46] B. D. Ulery, L. S. Nair, and C. T. Laurencin, "Biomedical Applications of Biodegradable Polymers," *J. Polym. Sci. B. Polym. Phys.*, vol. 49, no. 12, pp. 832–864, 2011.
- [47] L. S. Nair and C. T. Laurencin, "Biodegradable polymers as biomaterials," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 32, no. 8–9, pp. 762–798, 2007.
- [48] R. Pandey and Z. Ahmad, "Nanomedicine and experimental tuberculosis: facts, flaws, and future," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 7, no. 3, pp. 259–272, 2011.
- [49] L. Pereira, "Population studies and carrageenan properties in eight gigartinales (rhodophyta) from western coast of Portugal," *Sci. World J.*, vol. 2013, pp. 1–25, 2013.
- [50] D. Su Cha, J. H. Choi, M. S. Chinnan, and H. J. Park, "Antimicrobial films based on nalginate and  $\kappa$ -carrageenan," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 35, no. 8, pp. 715–719, 2002.
- [51] A. Kalsoom Khan *et al.*, "Carrageenan based bionanocomposites as drug delivery Tool with special emphasis on the influence of ferromagnetic nanoparticles," *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2017, pp. 1–13, 2017.
- [52] S. Y. Park, B. I. Lee, S. T. Jung, and H. J. Park, "Biopolymer composite films based on  $\kappa$ -carrageenan and chitosan," *Mater. Res. Bull.*, vol. 36, no. 3–4, pp. 511–519, 2001.
- [53] L. Li, R. Ni, Y. Shao, and S. Mao, "Carrageenan and its applications in drug delivery," *Carbohydr. Polym.*, vol. 103, no. 1, pp. 1–11, 2014.
- [54] X. Zhong, G. Dou, and D. Wang, "Polyethylene glycol (PEG-400): an efficient and recyclable reaction medium for the synthesis of pyrazolo[3,4-b]pyridin-6(7H)-one derivatives," *Molecules*, vol. 18, no. 11, pp. 13139–13147, 2013.
- [55] Z. Kanzaki, "Handbook of Pharmaceutical Excipients," 6th Ed., Pharmaceutical Press, 2009.
- [56] M. M. G. Fouda, M. R. El-Aassar, G. F. El Fawal, E. E. Hafez, S. H. D. Masry, and A. Abdel-Megeed, " $\kappa$ -Carrageenan/poly vinyl pyrrolidone/polyethylene glycol/silver nanoparticles film for biomedical application," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 74, no. 3, pp. 179–184, 2015.

- [57] N. Cao, X. Yang, and Y. Fu, "Effects of various plasticizers on mechanical and water vapor barrier properties of gelatin films," *Food Hydrocoll.*, vol. 23, no. 3, pp. 729–735, 2009.
- [58] A. Abruzzo, F. Bigucci, T. Cerchiara, F. Cruciani, B. Vitali, and B. Luppi, "Mucoadhesive chitosan/gelatin films for buccal delivery of propranolol hydrochloride," *Carbohydr. Polym.*, vol. 87, no. 1, pp. 581–588, 2012.
- [59] G. Fetih and M. Ibrahim, "Design and characterization of transdermal films containing ketorolac tromethamine," *Int. J. PharmTech Res.*, vol. 3, no. 1, pp. 449–458, 2011.
- [60] H. TVL, H. B. TVL, M. Vidyavathi, K. K, T. Sastry, and S. kumar RV, "Preparation and evaluation of ciprofloxacin loaded chitosan-gelatin composite films for wound healing activity," *Int. J. Drug Deliv.*, vol. 2, no. 2, 2011.
- [61] K. K. Peh and C. F. Wong, "Polymeric films as vehicle for buccal delivery: swelling, mechanical, and bioadhesive properties.," *J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 2, no. 2, pp. 53–61, 1999.
- [62] C. Eouani, P. Piccerelle, P. Prinderre, E. Bourret, and J. Joachim, "In-vitro comparative study of buccal mucoadhesive performance of different polymeric films.," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 52, no. 1, pp. 45–55, 2001.
- [63] C. Giovino, I. Ayensu, J. Tetteh, and J. S. Boateng, "An integrated buccal delivery system combining chitosan films impregnated with peptide loaded PEG-b-PLA nanoparticles," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 112, pp. 9–15, 2013.
- [64] V. K. Rai, H. Dwivedi, N. P. Yadav, C. S. Chanotiya, and S. A. Saraf, "Solubility enhancement of miconazole nitrate: binary and ternary mixture approach," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 40, no. 8, pp. 1021–1029, 2014.
- [65] D. McDonnell *et al.*, "An analysis of drug dissolution rates in the USP 24 type 2 apparatus," *Proc. Appl. Math. Mech.*, vol. 9, no. 1, pp. 691–692, 2009.
- [66] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), *M27. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts*, 4th Ed. 2017.
- [67] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), *M44-A2. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts. Approved guideline*, 2nd Ed. 2009.

- [68] G. Tejada *et al.*, "Development and evaluation of buccal films based on chitosan for the potential treatment of oral candidiasis," *AAPS PharmSciTech*, vol. 18, no. 4, pp. 936–946, 2017.
- [69] A. B. Nair, R. Kumria, S. Harsha, M. Attimarad, B. E. Al-Dhubiab, and I. A. Alhaider, "In vitro techniques to evaluate buccal films," *J. Control. Release*, vol. 166, no. 1, pp. 10–21, 2013.
- [70] J. O. Morales, R. Su, and J. T. McConville, "The influence of recrystallized caffeine on water-swallowable polymethacrylate mucoadhesive buccal films," *AAPS PharmSciTech*, vol. 14, no. 2, pp. 475–484, 2013.
- [71] M. G. A. Vieira, M. A. Da Silva, L. O. Dos Santos, and M. M. Beppu, "Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review," *Eur. Polym. J.*, vol. 47, no. 3, pp. 254–263, 2011.
- [72] P. R. Vuddanda, M. Montenegro-Nicolini, J. O. Morales, and S. Velaga, "Effect of plasticizers on the physico-mechanical properties of pullulan based pharmaceutical oral films," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 96, pp. 290–298, 2017.
- [73] M. L. Sanyang, S. M. Sapuan, M. Jawaid, M. R. Ishak, and J. Sahari, "Effect of plasticizer type and concentration on tensile, thermal and barrier properties of biodegradable films based on sugar palm (*Arenga pinnata*) starch," *Polymers (Basel)*, vol. 7, no. 6, pp. 1106–1124, 2015.
- [74] T. Gratieri, G. M. Gelfuso, E. M. Rocha, V. H. Sarmento, O. de Freitas, and R. F. V. Lopez, "A poloxamer/chitosan in situ forming gel with prolonged retention time for ocular delivery," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 75, no. 2, pp. 186–193, 2010.
- [75] E. Tasdighi, Z. Jafari Azar, and S. A. Mortazavi, "Development and in-vitro evaluation of a contraceptive vagino-adhesive propranolol hydrochloride gel," *Iran. J. Pharm. Res. IJPR*, vol. 11, no. 1, pp. 13–26, 2012.
- [76] J. O. Morales and J. T. McConville, "Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 77, no. 2, pp. 187–199, 2011.
- [77] Y. Wang, P. Li, and L. Kong, "Chitosan-modified PLGA nanoparticles with versatile surface for improved drug delivery," *AAPS PharmSciTech*, vol. 14, no. 2, pp. 585–

592, 2013.

- [78] L. Zhong, X. Zhu, X. Luo, and W. Su, "Dissolution properties and physical characterization of telmisartan-chitosan solid dispersions prepared by mechanochemical activation," *AAPS PharmSciTech*, vol. 14, no. 2, pp. 541–550, 2013.
- [79] E. Calce, V. Bugatti, V. Vittoria, and S. De Luca, "Solvent-free synthesis of modified pectin compounds promoted by microwave irradiation," *Molecules*, vol. 17, no. 10, pp. 12234–12242, 2012.
- [80] E. Karavas, E. Georganakis, and D. Bikiaris, "Application of PVP/HPMC miscible blends with enhanced mucoadhesive properties for adjusting drug release in predictable pulsatile chronotherapeutics," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 64, no. 1, pp. 115–126, 2006.
- [81] S. Sahoo, C. Kanti Chakraborti, P. Kumar Behera, and S. C. Mishra, "Spectroscopic investigations of a controlled release mucoadhesive suspension," *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, vol. 4, no. 2, pp. 63–70, 2011.
- [82] H. Espinosa-Andrews, O. Sandoval-Castilla, H. Vázquez-Torres, E. J. Vernon-Carter, and C. Lobato-Calleros, "Determination of the gum arabic-chitosan interactions by fourier transform infrared spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological features of their coacervates," *Carbohydr. Polym.*, vol. 79, no. 3, pp. 541–546, 2010.
- [83] K. Pal, A. K. Banthia, and D. K. Majumdar, "Preparation and characterization of polyvinyl alcohol-gelatin hydrogel membranes for biomedical applications," *AAPS PharmSciTech*, vol. 8, no. 1, pp. 1–5, 2007.
- [84] J. N. Shen, C. C. Yu, G. N. Zeng, and B. van der Bruggen, "Preparation of a facilitated transport membrane composed of carboxymethyl chitosan and polyethylenimine for CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> separation," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 2, pp. 3621–3638, 2013.
- [85] A. A. Al-Badr, "Miconazole Nitrate: Comprehensive Profile," *Profiles Drug Subst. Excipients Relat. Methodol.*, vol. 32, pp. 1–66, 2005.
- [86] N. B. Dobarra, A. C. Badhan, and R. C. Mashru, "A novel itraconazole bioadhesive film for vaginal delivery: design, optimization, and physicochemical characterization,"

- AAPS PharmSciTech*, vol. 10, no. 3, pp. 951–959, 2009.
- [87] S. Freiberg and X. X. Zhu, “Polymer microspheres for controlled drug release,” *Int. J. Pharm.*, vol. 282, no. 1–2, pp. 1–18, 2004.
- [88] F. Bigucci *et al.*, “Chitosan/pectin polyelectrolyte complexes: selection of suitable preparative conditions for colon-specific delivery of vancomycin,” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 35, no. 5, pp. 435–441, 2008.
- [89] A. Ribeiro, A. Figueiras, D. Santos, and F. Veiga, “Preparation and solid-state characterization of inclusion complexes formed between miconazole and methyl- $\beta$ -cyclodextrin,” *AAPS PharmSciTech*, vol. 9, no. 4, pp. 1102–1109, 2008.
- [90] A. Gupta and H. K. Kar, “Solid state compatibility studies of miconazole using thermal and spectroscopic methods,” *Adv. Anal. Chem.*, vol. 5, no. 3, pp. 51–55, 2015.
- [91] C. Leuner and J. Dressman, “Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 50, no. 1, pp. 47–60, 2000.
- [92] D. Q. M. Craig, “The mechanisms of drug release from solid dispersions in water-soluble polymers,” *Int. J. Pharm.*, vol. 231, no. 2, pp. 131–144, 2002.
- [93] F. A. Mohammed and H. Khedr, “Preparation and in vitro/in vivo evaluation of the buccal bioadhesive properties of slow-release tablets containing miconazole nitrate,” *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 29, no. 3, pp. 321–337, 2003.
- [94] V. Grabovac, D. Guggi, and A. Bernkop-Schnürch, “Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 57, no. 11, pp. 1713–1723, 2005.
- [95] E. M. Costa, S. Silva, M. Veiga, F. K. Tavoria, and M. M. Pintado, “A review of chitosan’s effect on oral biofilms: Perspectives from the tube to the mouth,” *J. Oral Biosci.*, vol. 59, no. 4, pp. 205–210, 2017.
- [96] K. Peh, T. Khan, and H. Ch’ng, “Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing,” *J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 3, no. 3, pp. 303–311, 2000.
- [97] A. Domján, J. Bajdik, and K. Pintye-Hódi, “Understanding of the Plasticizing Effects of Glycerol and PEG 400 on Chitosan Films Using Solid-State NMR Spectroscopy,”

- Macromolecules*, vol. 42, no. 13, pp. 4667–4673, 2009.
- [98] I. C. Libio, R. Demori, M. F. Ferrão, M. I. Z. Lionzo, and N. P. da Silveira, “Films based on neutralized chitosan citrate as innovative composition for cosmetic application,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 67, pp. 115–124, 2016.
- [99] A. M. Avachat, K. N. Gujar, and K. V. Wagh, “Development and evaluation of tamarind seed xyloglucan-based mucoadhesive buccal films of rizatriptan benzoate,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 91, no. 2, pp. 537–542, 2013.
- [100] H. Nagahama, H. Maeda, T. Kashiki, R. Jayakumar, T. Furuike, and H. Tamura, “Preparation and characterization of novel chitosan/gelatin membranes using chitosan hydrogel,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 76, no. 2, pp. 255–260, 2009.
- [101] J. Hurler and N. Skalko-Basnet, “Potentials of chitosan-based delivery systems in wound therapy: bioadhesion study,” *J. Funct. Biomater.*, vol. 3, no. 1, pp. 37–48, 2012.
- [102] S. Karki, H. Kim, S.-J. J. Na, D. Shin, K. Jo, and J. Lee, “Thin films as an emerging platform for drug delivery,” *Asian J. Pharm. Sci.*, vol. 11, no. 5, pp. 559–574, 2016.
- [103] R. A. Espinel Villacrés, S. K. Flores, and L. N. Gerschenson, “Biopolymeric antimicrobial films: Study of the influence of hydroxypropyl methylcellulose, tapioca starch and glycerol contents on physical properties,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 36, no. 1, pp. 108–117, 2014.
- [104] F. Ma *et al.*, “Effect of solution plasma process with bubbling gas on physicochemical properties of chitosan,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 98, pp. 201–207, 2017.
- [105] Z. Li, H. R. Ramay, K. D. Hauch, D. Xiao, and M. Zhang, “Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 18, pp. 3919–3928, 2005.
- [106] C. Zhuang, F. Tao, and Y. Cui, “Anti-degradation gelatin films crosslinked by active ester based on cellulose,” *RSC Adv.*, vol. 5, no. 64, pp. 52183–52193, 2015.
- [107] M. P. Tedesco, C. A. Monaco-Lourenço, and R. A. Carvalho, “Gelatin/hydroxypropyl methylcellulose matrices — Polymer interactions approach for oral disintegrating films,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 69, no. 1, pp. 668–674, 2016.

- [108] G. Lawrie *et al.*, "Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS," *Biomacromolecules*, vol. 8, no. 8, pp. 2533–2541, 2007.
- [109] S.-H. Park, M.-K. Chun, and H.-K. Choi, "Preparation of an extended-release matrix tablet using chitosan/carbopol interpolymer complex," *Int. J. Pharm.*, vol. 347, no. 1–2, pp. 39–44, 2008.
- [110] J. Ostrowska-Czubenko and M. Gierszewska-Drużyńska, "Effect of ionic crosslinking on the water state in hydrogel chitosan membranes," *Carbohydr. Polym.*, vol. 77, no. 3, pp. 590–598, 2009.
- [111] X. Li, H. Xie, J. Lin, W. Xie, and X. Ma, "Characterization and biodegradation of chitosan-alginate polyelectrolyte complexes," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 94, no. 1, pp. 1–6, 2009.
- [112] Z. Dong, Q. Wang, and Y. Du, "Alginate/gelatin blend films and their properties for drug controlled release," *J. Memb. Sci.*, vol. 280, no. 1–2, pp. 37–44, 2006.
- [113] C. Cozic, L. Picton, M. R. Garda, F. Marlhoux, and D. Le Cerf, "Analysis of arabic gum: Study of degradation and water desorption processes," *Food Hydrocoll.*, vol. 23, no. 7, pp. 1930–1934, 2009.
- [114] S. Sahoo, C. K. Chakraborti, and S. C. Mishra, "Qualitative analysis of controlled release ciprofloxacin/carbopol 934 mucoadhesive suspension," *J. Adv. Pharm. Technol. Res.*, vol. 2, no. 3, pp. 195–204, 2011.
- [115] J. S. Ahn *et al.*, "Release of triamcinolone acetonide from mucoadhesive polymer composed of chitosan and poly (acrylic acid) in vitro," *Biomaterials*, vol. 23, no. 6, pp. 1411–1416, 2002.
- [116] M. Z. Elsabee and E. S. Abdou, "Chitosan based edible films and coatings: A review," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, no. 4, pp. 1819–1841, 2013.
- [117] A. Palmeira-de-Oliveira *et al.*, "Anti-Candida activity of a chitosan hydrogel: mechanism of action and cytotoxicity profile," *Gynecol. Obstet. Invest.*, vol. 70, no. 4, pp. 322–327, 2010.
- [118] F. Seyfarth, S. Schliemann, P. Elsner, and U.-C. Hipler, "Antifungal effect of high and low molecular weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan

- oligosaccharide and N-acetyl-D-glucosamine against candida albicans, candida krusei and candida glabrata," *Int. J. Pharm.*, vol. 353, no. 1–2, pp. 139–148, 2008.
- [119] A. H. El-Kamel, L. Y. Ashri, and I. A. Alsarra, "Micromatrical metronidazole benzoate film as a local mucoadhesive delivery system for treatment of periodontal diseases," *AAPS PharmSciTech*, vol. 8, no. 3, pp. 184–194, 2007.
- [120] R. Kolakovic, L. Peltonen, A. Laukkanen, J. Hirvonen, and T. Laaksonen, "Nanofibrillar cellulose films for controlled drug delivery," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 82, no. 2, pp. 308–315, 2012.
- [121] G. Tejada, G. N. Piccirilli, M. Sortino, C. J. Salomón, M. C. Lamas, and D. Leonardi, "Formulation and in-vitro efficacy of antifungal mucoadhesive polymeric matrices for the delivery of miconazole nitrate," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 79, pp. 140–150, 2017.
- [122] K. M. Gallagher and O. I. Corrigan, "Mechanistic aspects of the release of levamisole hydrochloride from biodegradable polymers," *J. Control. Release*, vol. 69, no. 2, pp. 261–272, 2000.
- [123] P. Tonglairoum, T. Ngawhirunpat, T. Rojanarata, S. Panomsuk, R. Kaomongkolgit, and P. Opanasopit, "Fabrication of mucoadhesive chitosan coated polyvinylpyrrolidone/cyclodextrin/clotrimazole sandwich patches for oral candidiasis," *Carbohydr. Polym.*, vol. 132, pp. 173–179, 2015.
- [124] P. Tonglairoum, T. Ngawhirunpat, T. Rojanarata, R. Kaomongkolgit, and P. Opanasopit, "Fabrication of a novel scaffold of clotrimazole-microemulsion-containing nanofibers using an electrospinning process for oral candidiasis applications," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 126, no. 2, pp. 18–25, 2015.
- [125] B. Szabó, I. Sebe, N. Kállai, K. Süvegh, and R. Zelkó, "Comparison of the micro- and macrostructural characteristics of biopolymer cast films," *Eur. Polym. J.*, vol. 49, no. 9, pp. 2422–2425, 2013.
- [126] N. E. Suyatma, L. Tighzert, A. Copinet, and V. Coma, "Effects of hydrophilic plasticizers on mechanical, thermal, and surface properties of chitosan films," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 10, pp. 3950–3957, 2005.
- [127] V. L. Campo, D. F. Kawano, D. B. da Silva, and I. Carvalho, "Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – A review," *Carbohydr.*

- Polym.*, vol. 77, no. 2, pp. 167–180, 2009.
- [128] V. M. Patel, B. G. Prajapati, and M. M. Patel, “Design and characterization of chitosan-containing mucoadhesive buccal patches of propranolol hydrochloride,” *Acta Pharm.*, vol. 57, no. 1, pp. 61–72, 2007.
- [129] J. O. Morales, S. Huang, R. O. Williams, and J. T. McConville, “Films loaded with insulin-coated nanoparticles (ICNP) as potential platforms for peptide buccal delivery,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 122, pp. 38–45, 2014.
- [130] N. A. Nafee, F. A. Ismail, N. A. Boraie, and L. M. Mortada, “Mucoadhesive buccal patches of miconazole nitrate: in vitro/in vivo performance and effect of ageing,” *Int. J. Pharm.*, vol. 264, no. 1–2, pp. 1–14, 2003.
- [131] D. de Britto and S. P. Campana-Filho, “A kinetic study on the thermal degradation of N,N,N-trimethylchitosan,” *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 84, no. 2, pp. 353–361, 2004.
- [132] L. R. Rane, N. R. Savadekar, P. G. Kadam, and S. T. Mhaske, “Preparation and characterization of k-carrageenan/nanosilica biocomposite film,” *J. Mater.*, vol. 2014, pp. 1–8, 2014.
- [133] M. Sadeghi, “Synthesis of a biocopolymer carrageenan-g-poly(AAm-co-IA)/montmorillonite superabsorbent hydrogel composite,” *Brazilian J. Chem. Eng.*, vol. 29, no. 2, pp. 295–305, 2012.
- [134] S. V. Jermain, C. Brough, and R. O. Williams, “Amorphous solid dispersions and nanocrystal technologies for poorly water-soluble drug delivery – An update,” *Int. J. Pharm.*, vol. 535, no. 1–2, pp. 379–392, 2018.
- [135] A. Peña, N. S. Sánchez, and M. Calahorra, “Effects of chitosan on candida albicans: Conditions for its antifungal activity,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2013, pp. 1–15, 2013.
- [136] S. Keshani, W. R. W. Daud, M. M. Nourouzi, F. Namvar, and M. Ghasemi, “Spray drying: An overview on wall deposition, process and modeling,” *J. Food Eng.*, vol. 146, pp. 152–162, 2015.
- [137] S. Singh, S. Jain, M. S. Muthu, S. Tiwari, and R. Tilak, “Preparation and evaluation of buccal bioadhesive films containing clotrimazole,” *AAPS PharmSciTech*, vol. 9, no. 2, pp. 660–667, 2008.

- [138] S. S. Shidhaye, N. S. Saindane, S. Sutar, and V. Kadam, "Mucoadhesive bilayered patches for administration of sumatriptan succinate," *AAPS PharmSciTech*, vol. 9, no. 3, pp. 909–916, 2008.
- [139] J. Priotti, A. V. Codina, D. Leonardi, M. D. Vasconi, L. I. Hinrichsen, and M. C. Lamas, "Albendazole microcrystal formulations based on chitosan and cellulose derivatives: physicochemical characterization and in vitro parasitocidal activity in trichinella spiralis adult worms," *AAPS PharmSciTech*, vol. 18, no. 4, pp. 947–956, 2017.
- [140] Y. Yeo and K. Park, "Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems," *Arch. Pharm. Res.*, vol. 27, no. 1, pp. 1–12, 2004.
- [141] C. G. Kumar and Y. Poornachandra, "Biodirected synthesis of miconazole-conjugated bacterial silver nanoparticles and their application as antifungal agents and drug delivery vehicles," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 125, pp. 110–119, 2015.
- [142] R. M. Mainardes, M. P. D. Gremião, and R. C. Evangelista, "Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles," *Rev. Bras. Ciências Farm.*, vol. 42, no. 4, pp. 523–530, 2006.
- [143] X.-G. G. Li, M.-R. R. Huang, and H. Bai, "Thermal decomposition of cellulose ethers," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 73, no. 14, pp. 2927–2936, 1999.
- [144] W. C. Ling, "Thermal degradation of gelatin as applied to processing of del mass," *J. Pharm. Sci.*, vol. 67, no. 2, pp. 218–223, 1978.
- [145] I. Dranca and S. Vyazovkin, "Thermal stability of gelatin gels: Effect of preparation conditions on the activation energy barrier to melting," *Polymer (Guildf)*, vol. 50, no. 20, pp. 4859–4867, 2009.
- [146] C.-H. Chen *et al.*, "Studies of chitosan. I. Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol) blend films," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 105, no. 3, pp. 1086–1092, 2007.
- [147] R. B. Chavan, R. Thipparaboina, D. Kumar, and N. R. Shastri, "Evaluation of the inhibitory potential of HPMC, PVP and HPC polymers on nucleation and crystal growth," *RSC Adv.*, vol. 6, no. 81, pp. 77569–77576, 2016.

- [148] J. E. Eldridge and J. D. Ferry, "Studies of the cross-linking process in Gelatin gels. III. Dependence of melting point on concentration and molecular weight," *J. Phys. Chem.*, vol. 58, no. 11, pp. 992–995, 1954.
- [149] P. Blasi, A. Schoubben, S. Giovagnoli, L. Perioli, M. Ricci, and C. Rossi, "Ketoprofen poly(lactide-co-glycolide) physical interaction," *AAPS PharmSciTech*, vol. 8, no. 2, pp. 78–85, 2007.
- [150] L. Wang, W. Dong, and Y. Xu, "Synthesis and characterization of hydroxypropyl methylcellulose and ethyl acrylate graft copolymers," *Carbohydr. Polym.*, vol. 68, no. 4, pp. 626–636, 2007.
- [151] V. Nart *et al.*, "Ball-milled solid dispersions of BCS Class IV drugs: Impact on the dissolution rate and intestinal permeability of acyclovir," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 53, pp. 229–238, 2015.
- [152] E. J. Lee, S. A. Khan, and K. H. Lim, "Gelatin nanoparticle preparation by nanoprecipitation," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 22, no. 4–6, pp. 753–771, 2011.
- [153] P. Calvo, C. Remuñán-López, J. L. Vila-Jato, and M. J. Alonso, "Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 63, no. 1, pp. 125–132, 1997.
- [154] M. R. Bhalekar, V. Pokharkar, A. Madgulkar, N. Patil, and N. Patil, "Preparation and evaluation of miconazole nitrate-loaded solid lipid nanoparticles for topical delivery," *AAPS PharmSciTech*, vol. 10, no. 1, pp. 289–296, 2009.
- [155] M. Qushawy, A. Nasr, M. Abd-Alhaseeb, and S. Swidan, "Design, optimization and characterization of a transfersomal gel using miconazole nitrate for the treatment of candida skin infections," *Pharmaceutics*, vol. 10, no. 1, pp. 1–22, 2018.
- [156] D. R. Sahoo and S. Jain, "A rapid and validated RP-HPLC method for the simultaneous quantification of benzoic acid, metronidazole and miconazole nitrate in vaginal formulations," *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 54, no. 9, pp. 1613–1618, 2016.
- [157] G. S. El-Feky, R. F. Abdulmaguid, G. M. Zayed, and R. Kamel, "Mucosal co-delivery of ketorolac and lidocaine using polymeric wafers for dental application," *Drug Deliv.*, vol. 25, no. 1, pp. 35–42, 2018.
- [158] C. E. Lacasa and M. E. Mazuelos, "Métodos estandarizados por el CLSI para el

- estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A),” *Revista Iberoamericana de Micología*, 2007.
- [159] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), *M27-A2. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standards*, 2nd Ed. 2002.
- [160] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), *M27-A3. Reference method for broth dilution Antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard*, 3th Ed. 2008.
- [161] M. A. Pfaller, D. J. Sheehan, and J. H. Rex, “Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 17, no. 2, pp. 268–280, 2004.
- [162] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), *M27-S4. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts*, 4th Ed. 2017.
- [163] K. S. Soppimath, T. M. Aminabhavi, A. R. Kulkarni, and W. E. Rudzinski, “Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices,” *J. Control. Release*, vol. 70, no. 1–2, pp. 1–20, 2001.
- [164] “Dynamic light scattering common terms defined.” Malvern Instruments Limited, 2011.
- [165] “International Standard ISO13321:1996 - Particle size analysis - Photon correlation spectroscopy,” 1996. .
- [166] “International Standard ISO 22412:2008 - Particle size analysis - Dynamic light scattering (DLS),” 2008. .
- [167] M. Gaumet, A. Vargas, R. Gurny, and F. Delie, “Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 69, no. 1, pp. 1–9, 2008.
- [168] G. Lazzara, S. Milioto, M. Gradzielski, and S. Prevost, “Small angle neutron scattering, x-ray Diffraction, differential scanning calorimetry, and thermogravimetry studies to characterize the properties of clay nanocomposites,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 113, no. 28, pp. 12213–12219, 2009.

- [169] Y. Kohda *et al.*, "Controlled release of lidocaine hydrochloride from buccal mucosa-adhesive films with solid dispersion," *Int. J. Pharm.*, vol. 158, no. 2, pp. 147–155, 1997.
- [170] R. Abu-Huwaij, S. Assaf, M. Salem, and A. Sallam, "Mucoadhesive dosage form of lidocaine hydrochloride: I. Mucoadhesive and physicochemical characterization," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 33, no. 8, pp. 855–864, 2007.
- [171] M. P. Arévalo *et al.*, "Antifungal activity of the echinocandin anidulafungin (VER002, LY-303366) against yeast pathogens: A comparative study with M27-A microdilution method," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 51, no. 1, pp. 163–166, 2003.
- [172] S. Hawser, "Comparisons of the effects of fungicidal and fungistatic antifungal agents on the morphogenetic transformation of *Candida albicans*," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 43, no. 3, pp. 411–413, 1999.