

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



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

**SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA
BASADOS EN COMPLEJOS DE INCLUSIÓN
CICLODEXTRINA-FÁRMACO INCLUIDOS EN
MATRICES POLIMÉRICAS**

Tesista Lic. Natalia Velázquez

Director de Tesis: Dr. Julio Luna
Co-director de Tesis: Dr. Luciano Mengatto

Química Fina - Instituto de Desarrollo Tecnológico para la
Industria Química (INTEC) - CONICET - UNL

-2018-

**“EL HOMBRE PREPARA EL CABALLO
PARA ENTRAR EN BATALLA PERO
EL SEÑOR ES QUIEN DA LA VICTORIA”**

PROVERBIOS 21.31 (DHH)

/AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi Dios, porque sin Él este trabajo nunca se hubiese llevado a adelante ni concluido. Gracias por su guía y su sostén en todo momento, por darme la suficiente capacidad para hacer, para sobrellevar los problemas y para disfrutar del proceso y las recompensas.

Quiero dedicar este trabajo de tesis a la memoria de mi abuelo, la persona que siempre me incentivó para superarme y seguir estudiando. No me cabe duda que estaría muy feliz por este logro. También se lo quiero dedicar a mi abuela, que me acompañó y acompaña siempre.

Al Estado Nacional y todos los ciudadanos, por haberme brindado la posibilidad de poder realizar un doctorado exclusivamente, lo cual no es factible en todos los países del mundo. A la Universidad Nacional del Litoral, por darme el lugar para realizar un estudio de posgrado de manera gratuita.

A Luciano, por su invaluable esfuerzo, apoyo y dirección en este trabajo. Por soportarme y con su particular manera incentivarme a continuar. Al Dr. Julio Luna por darme la oportunidad y el lugar para realizar esta tesis. A Andrea por su infinita paciencia. A Graciela por su gran aporte en el análisis de RMNp.

A la Mesa Pergolera, a uno y cada uno de sus integrantes: Agus, Carlitos, Elan, Fede F., Fede K., Fede S., Guachín, Pes, Lili, Lucio, Ludmi, Luli, Lutziano, Mara, Mari, Mario, Maru, Nico, Pablo, Vicky y Yura, por los divertidos almuerzos, charlas y momentos vividos. Por el apoyo, las palabras de aliento y los consejos en los momentos más difíciles. Por la asistencia en muchas complicaciones experimentales y por el agradable lugar de trabajo construido, que enriquece y pule, mucho más que lo laboral.

A mis grandes amigos de la vida y de laboratorio: Juan y Fede. Por la compañía, amistad y por los inolvidables momentos que pasamos juntos, desde el principio hasta el fin. Por **siempre** sacar lo

Agradecimientos

mejor de mí, ser positivos y optimistas. Por divertirme con sus chistes tontos y ocurrencias, y por valorarme como persona en todo y con todo.

A los Runners, por tolerarme en esta última etapa. Por su compañía y oraciones. A mis amigos Los Fantásticos: Bichi, Ema, Joni, Juli y Nanu, por entender mis ausencias y locuras.

A mi familia, por su acompañamiento y por compartir conmigo este momento.

No quisiera olvidarme de nadie, pero posiblemente lo hice. Por eso quiero agradecer a cada persona con la cual me crucé en este tiempo y que colaboró conmigo, no solo en la parte laboral sino en la parte personal. Uno crece, madura y evoluciona, no solo por sí mismo, sino por lo que le toca vivir y con quien se relaciona en el camino. Me llevo muchas cosas en mi memoria y en mi corazón, y eso es más valioso que cualquier trabajo o éxito personal. Espero haber sido también de ayuda, apoyo y compañía para ustedes, y haber podido retribuirles un poco de todo lo que me dieron en todo este tiempo.

Gracias, gracias y más gracias. Sólo eso.

A handwritten signature in black ink that reads "Natalia". The script is cursive and elegant, with a long, sweeping underline that curves under the name.

/PUBLICACIONES

PUBLICACIONES

- Application of simultaneous multiple response optimization in the preparation of thermosensitive chitosan/glycerophosphate hydrogels (2016). Luciano N. Mengatto; Juan I. Pessoa; Natalia S. Velázquez; Julio A. Luna. *Iran Polym J.* 25:897-906.
- Pulsed NMR spectroscopy applied to the study of Paclitaxel/ β -Cyclodextrin interactions (2018). Natalia S. Velázquez; María Graciela Ferreyra; Luciano N. Mengatto; Patricio R. Santagapita; M. Pilar Buera; Julio A. Luna. *En redacción*.
- Thermosensitive hydrogel releases progesterone for vaginal application (2018). Natalia S. Velázquez; Ludmila N. Turino; Luciano N. Mengatto; Julio A. Luna. *En redacción*.

/ ÍNDICE
DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	III
PUBLICACIONES	VII
ÍNDICE DE CONTENIDOS	XI
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	XVII
RESUMEN.....	XXI
ABSTRACT	XXVII
INTRODUCCIÓN. DESARROLLO TEÓRICO.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. PACLITAXEL	3
2.1. Generalidades	3
2.2. Mecanismos de acción.....	4
2.3. Indicaciones terapéuticas.....	5
2.4. Formulación actual	5
2.5. Formulaciones alternativas	5
3. PROGESTERONA	6
3.1. Generalidades.....	6
3.2. Mecanismo de acción en el aparato reproductor	7
3.3. Usos.....	7
3.4. Vías de administración y formulaciones	7
3.5. Formulaciones vaginales	10
3.5.1. Crinone® 8 %	10
4. CICLODEXTRINAS.....	11
4.1. Ciclodextrinas naturales	11
4.2. β -Ciclodextrinas y sus derivados.....	12
4.3. Complejos de inclusión.....	13
4.4. Diagrama de solubilidad de fases	15
4.5. β -Ciclodextrinas y paclitaxel	17
4.6. β -Ciclodextrinas y progesterona	18
5. QUITOSANO	19
5.1. Generalidades.....	19
5.2. Propiedades biológicas del quitosano.....	20
5.3. Aplicaciones del quitosano.....	21
5.4. Formulaciones del quitosano.....	21
6. LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS	22

6.1. Hidrogeles	22
6.1.1. Hidrogeles basados en quitosano	23
7. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	24
7.1. Etapa de Screening	24
7.2. Etapa de optimización	25
7.2.1. Función Deseabilidad	26
OBJETIVOS	27
OBJETIVO GENERAL.....	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
CAPÍTULO 1. COMPLEJOS DE INCLUSIÓN DE PACLITAXEL.....	31
1.1. INTRODUCCIÓN	33
1.2. OBJETIVOS	33
1.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
1.3.1. Materiales.....	33
1.3.2. Cuantificación de paclitaxel	34
1.3.2.1. Cromatografía líquida de alta resolución	34
1.3.2.2. Espectroscopía UV	35
1.3.3. Diagrama de solubilidad de fases	35
1.3.4. Obtención de los complejos de inclusión	36
1.3.4.1. Determinación de la eficiencia de inclusión	37
1.3.5. Caracterización de los complejos PTX/RAME β -CD	37
1.3.5.1. Espectroscopía infrarroja	38
1.3.5.2. Calorimetría diferencial de barrido	38
1.3.5.3. Resonancia magnética nuclear.....	38
1.3.5.4. Resonancia magnética nuclear pulsada	38
1.3.5.5. Dispersión de luz dinámica	39
1.3.5.6. Microscopía electrónica de barrido	40
1.4. RESULTADOS Y CONCLUSIONES.....	40
1.4.1. Cuantificación de paclitaxel	40
1.4.1.1. Cromatografía líquida de alta resolución.....	40
1.4.1.2. Espectroscopía UV.....	41
1.4.2. Diagrama de solubilidad de fases	42
1.4.3. Obtención de los complejos de inclusión en PBS:EtOH	46
1.4.3.1. Espectroscopía infrarroja.....	46
1.4.3.2. Calorimetría diferencial de barrido	49
1.4.3.3. Resonancia magnética nuclear	50

1.4.3.4. Resonancia magnética nuclear pulsada	51
1.4.3.5. Dispersión de luz dinámica	55
1.4.3.6. Determinación Eficiencias de Inclusión mediante espectroscopía UV	58
1.4.4. Obtención de los complejos de inclusión en H ₂ O:EtOH	59
1.4.4.1. Dispersión de luz dinámica	59
1.4.4.2. Microscopía electrónica de barrido	61
1.4.5. Protocolos alternativos de obtención de los complejos de inclusión	62
1.4.5.1. Dispersión de luz dinámica	63
1.4.5.2. Proyecciones futuras	65
1.4.6. Conclusiones parciales	65
CAPÍTULO 2. COMPLEJOS DE INCLUSIÓN DE PROGESTERONA	67
2.1. INTRODUCCIÓN	69
2.2. OBJETIVOS	69
2.3. MATERIALES Y MÉTODOS	69
2.3.1. Materiales	69
2.3.2. Cuantificación de progesterona	70
2.3.3. Diagrama de solubilidad de fases	70
2.3.4. Obtención de los complejos de inclusión	71
2.3.4.1. Determinación de la eficiencia y del rendimiento de inclusión	72
2.3.5. Caracterización de los complejos PGT/CD	72
2.3.5.1. Calorimetría diferencial de barrido	72
2.3.5.2. Espectroscopía infrarroja	73
2.3.5.3. Resonancia magnética nuclear	73
2.3.5.4. Dispersión de luz dinámica	73
2.3.5.5. Microscopía electrónica de barrido	74
2.4. RESULTADOS Y CONCLUSIONES	74
2.4.1. Cuantificación de progesterona	74
2.4.2. Diagrama de solubilidad de fases	75
2.4.3. Obtención de los complejos de inclusión	79
2.4.4. Caracterización de los complejos PGT/CD	82
2.4.4.1. Calorimetría diferencial de barrido	82
2.4.4.2. Espectroscopía infrarroja	83
2.4.4.3. Resonancia magnética nuclear	85
2.4.4.4. Dispersión de luz dinámica	87
2.4.4.5. Microscopía electrónica de barrido	88
2.4.5. Conclusiones parciales	89

CAPÍTULO 3. GELES DE QUITOSANO.....	91
3.1. INTRODUCCIÓN.....	93
3.2. OBJETIVOS.....	94
3.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	94
3.3.1. Materiales.....	94
3.3.2. Preparación de geles de quitosano.....	95
3.3.2.1. Etapa preliminar de <i>screening</i>	95
3.3.2.2. Optimización.....	96
3.3.3. Caracterización del sistema optimizado.....	96
3.3.3.1. Espectroscopía infrarroja.....	96
3.3.3.2. Estudios reológicos.....	96
3.3.4. Geles de quitosano con complejos de inclusión.....	96
3.3.4.1. Caracterización de geles de quitosano con complejos de inclusión.....	97
3.3.5. Experimentos de liberación <i>in vitro</i>	97
3.4. RESULTADOS Y CONCLUSIONES.....	98
3.4.1. Preparación de geles de quitosano.....	98
3.4.1.1. Etapa preliminar de <i>screening</i>	99
3.4.1.2. Optimización.....	101
3.4.2. Caracterización del sistema optimizado.....	106
3.4.2.1. Espectroscopía infrarroja.....	106
3.4.2.2. Estudios reológicos.....	108
3.4.3. Caracterización de geles de quitosano con complejos de inclusión.....	109
3.4.3.1. Espectroscopía infrarroja.....	109
3.4.3.2. Microscopía electrónica de barrido.....	112
3.4.3.3. Comportamiento de geles en fluido vaginal simulado.....	114
3.4.4. Experimentos de liberación <i>in vitro</i>	116
3.4.5. Conclusiones parciales.....	120
CONCLUSIONES.....	123
CONCLUSIONES.....	125
BIBLIOGRAFÍA.....	127
ANEXO.....	143
1. RAME β -CD.....	145
2. MEZCLA FÍSICA.....	147
3. COMPLEJOS DE INCLUSIÓN.....	148

**/ ABREVIATURAS
Y SÍMBOLOS**

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

^1H -RMN: Resonancia magnética nuclear de protones

α -CD: Alfa-ciclodextrina

β -CD: Beta-ciclodextrina

γ -CD: Gamma-ciclodextrina

δ : Desplazamiento químico

$\Delta\delta$: Variación de desplazamiento químico

ϵ : Constante dieléctrica

A: Intensidad de la señal de la curva de decaimiento de inducción libre

Ac: Acuoso

ACN: Acetonitrilo

BSA: Albúmina de suero bovina

$\text{Ca}(\text{OH})_2$: Hidróxido de calcio

CD: Ciclodextrina

CE: Eficiencia de encapsulación

C_{GP} : Concentración de β -glicerofosfato de sodio

CI: Complejos de inclusión

C_Q : Concentración de quitosano

D: Deseabilidad

D_2O : Agua deuterada

DCC: Diseño central compuesto

DCM: Diclorometano

D_h : Diámetro hidrodinámico

DLS: Dispersión de luz dinámica

DS: Desviación estándar

DSC: Calorimetría diferencial de barrido

DSF: Diagrama de solubilidad de fases

E_{PGT} : Eficiencia de inclusión de la PGT

E_{PTX} : Eficiencia de inclusión del PTX

EtOH: Etanol

FID: Decaimiento de inducción libre

FIV: Fertilización *in vitro*

FM: Fase móvil

FT-IR: Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier

GP: β -glicerofosfato de sodio

GS: Grado de sustitución

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

HPMC: Hidroxipropilmetil celulosa

HP β -CD: Hidroxipropil beta-ciclodextrina

K_{1:1}: Constante de estabilidad aparente de estequiometría 1:1

Lio: Liofilizado

M₂: Segundo momento

MeOH: Metanol

MF: Mezcla física

m_R: Masa residual

Org: Orgánico

p: Valor de probabilidad

PBS: Solución tamponada de fosfatos

PBS-EtOH: Solución tamponada de fosfatos con etanol

PGT: Progesterona

PTX: Paclitaxel

PVP: Polivinilpirrolidona

Q: Quitosano

RAME β -CD: Beta-ciclodextrina metilada al azar

R_{PGT}: Rendimiento de inclusión de PGT

R_{PTX}: Rendimiento de inclusión de PTX

RMNp: Resonancia magnética nuclear pulsada

S₀: Solubilidad intrínseca del soluto

SEM: Microscopía electrónica de barrido

SVF: Fluido vaginal simulado

T₂: Tiempo de relajación espín-espín protónico

TA: Temperatura ambiente

t_{gel}: Tiempo de formación de gel

T_{mezcla}: Temperatura de mezcla

t_{mezcla}: Tiempo de mezcla

UV: Ultravioleta

/RESUMEN

RESUMEN

Desde hace años la investigación farmacéutica busca nuevas moléculas que den respuesta terapéutica a las enfermedades antiguas y a las de aparición reciente. Sin embargo, no descuida la búsqueda de nuevas formulaciones que optimicen la liberación de drogas y por lo tanto su actividad. Hay fármacos que, si bien son ampliamente utilizados, requieren que su presentación o aplicación sea mejorada. Debido a la experiencia de trabajo y a desarrollos previos en nuestro grupo, esta de tesis se centra en el estudio de dos de estos casos: paclitaxel (PTX) y progesterona (PGT).

El PTX es un agente antitumoral muy eficaz que presenta baja solubilidad acuosa, por lo que se administra de forma intravenosa mediante un vehículo no acuoso que contiene Cremophor®EL/etanol. Este vehículo puede causar reacciones alérgicas graves, hipersensibilidad, neurotoxicidad, y la precipitación en dilución acuosa. Por este motivo, existen varias formulaciones de PTX que intentan mejorar su solubilidad, evitando al mismo tiempo el uso del mencionado vehículo, pero se encuentran muy distantes de ser totalmente satisfactorias.

Una formulación alternativa de PTX, que sea estable y fácil de utilizar en la práctica clínica a la vez que evita el vehículo no acuoso, podría incluir ciclodextrinas (CDs) como excipiente. Estos oligosacáridos cíclicos son capaces de solubilizar drogas hidrofóbicas mediante la formación de complejos de inclusión (CI).

En el **primer capítulo** de este trabajo de tesis (**Complejos de Inclusión de Paclitaxel**), se estudió el comportamiento del PTX con una CD metilada al azar (RAME β -CD) en tres solventes diferentes (PBS:EtOH, H₂O:EtOH y agua) mediante sus diagramas de solubilidad de fases (DSF). Se calcularon las constantes de estabilidad ($K_{1:1}$) y las Eficiencias de Encapsulación (CE), obteniendo mejores resultados en PBS:EtOH. Se ensayaron distintos protocolos de formación de CI entre PTX y RAME β -CD en PBS:EtOH. Se calcularon las Eficiencias de Inclusión (E_{PTX}), siendo menores al 50 % en todos los casos. Luego, se caracterizaron los CI mediante FT-IR, DSC, RMNp y DLS, verificándose la inclusión de la droga en la CD. Los CI PTX/RAME β -CD formaron agregados que impidieron la determinación cuantitativa de la droga mediante HPLC.

Posteriormente, se obtuvieron CI en H₂O:EtOH entre PTX y RAME β -CD en distintas relaciones molares. Se logró obtener una buena eficiencia de inclusión del PTX en complejos 1:20 mol/mol PTX:RAME β -CD (>90 %). Luego, estos CI se caracterizaron mediante DLS y SEM. Los agregados obtenidos en este caso fueron 1,5 veces mayores a los obtenidos en

PBS:EtOH. Las micrograffas obtenidas por SEM dieron un nuevo indicio de la formación de los CI mediante la presencia de una nueva fase sólida.

Finalmente se prepararon nuevos CI PTX/RAME β -CD: en solventes diferentes (EtOH, MeOH o agua) y con aditivos disgregantes o disrupción mecánica (ácido cítrico, PVP o sonicación). Se calcularon las eficiencias de inclusión del PTX en la CD, y se observó que modificando el solvente, las eficiencias mejoraban con respecto a los CI en H₂O:EtOH. Por otro lado, los complejos a los que se les agregaron los aditivos antiagregantes, si bien dieron eficiencias de inclusión menores al 60 %, poseían tamaños de partícula reducidos en comparación a los complejos anteriormente obtenidos.

La PGT es una hormona natural esteroidea que desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la fisiología normal del sistema reproductivo femenino y es ampliamente utilizada en el campo médico, especialmente como apoyo a la fase luteínica en tratamientos de fertilización asistida. Es prácticamente insoluble en agua por lo que se administra de forma micronizada y/o en vehículos con aceites mediante diversas vías: oral, intramuscular y vaginal. La incorporación de la PGT en la cavidad de las CDs permitiría aumentar la solubilidad acuosa de la hormona y mejorar las formulaciones existentes.

En el **segundo capítulo** de esta tesis (**Complejos de Inclusión de Progesterona**), se realizó un estudio del comportamiento de la PGT en dos CDs (β -CD y RAME β -CD) y en dos solventes diferentes (agua y H₂O:EtOH), mediante la obtención de sus DSF. Se calcularon las $K_{1:1}$ y las CE de cada caso, obteniendo buenos resultados con la RAME β -CD. Por ese motivo se ensayaron distintos protocolos de formación de CI entre PGT y RAME β -CD, variando las relaciones molares entre los reactivos y solventes utilizados. Se calcularon las Eficiencias de Inclusión (E_{PGT}) y Rendimientos de Inclusión (R_{PGT}) de cada uno, obteniendo resultados favorables en la mayoría de los complejos. Se seleccionó como solvente para la preparación la mezcla H₂O:EtOH y la relación molar 1:5 PGT:RAME β -CD, y se caracterizaron los CI obtenidos mediante DSC, FT-IR, ¹H-RMN, DLS y SEM, verificando en todos ellos la inclusión de la PGT en la RAME β -CD.

En el **Capítulo 3** de este trabajo (**Geles de Quitosano**), se estudió la incorporación de los CI PGT/RAME β -CD en geles de quitosano (Q), como alternativa para la administración de PGT vía vaginal. Para eso, en primera instancia se optimizó la preparación de geles de Q mediante el diseño estadístico de experimentos. Se lograron establecer criterios de optimización que fueron verificados experimentalmente: transición a gel (pH=6,92) en 2,37 min a una temperatura de 37,5 °C y con un porcentaje del 63,44 % de masa residual *in vitro* luego de 7 días de inmersión en solución reguladora. Los geles optimizados luego se

caracterizaron mediante FT-IR y por mediciones reológicas, verificando nuevamente la optimización exitosa de los geles.

Posteriormente se incorporaron los CI PGT/RAME β -CD a geles de Q y se los caracterizaron mediante FT-IR y SEM. La incorporación de los CI no modificó las características micro y macroscópicas de los geles, así como tampoco los tiempos de formación con respecto a los geles optimizados previamente. Se evaluó el comportamiento de los geles en fluido vaginal simulado. Se encontró que los geles de Q con CI resistieron en mayor medida que el gel comercial a la degradación en este medio.

Finalmente se evaluó la difusión *in vitro* a través de tejido vaginal porcino de PGT desde los geles con CI y se la comparó con soluciones de la hormona libre e incluida en CI, así como también con un gel comercial de PGT micronizada (Crinone[®]). Se encontró que los geles con CI presentaron difusiones sostenidas en el tiempo similares a las exhibidas por el gel comercial, por lo que se plantea como alternativa viable la utilización de geles de Q con CI PGT/RAME β -CD. Estos geles permitirían evitar el uso de polímeros que causan irritación y malestar locales en el sitio de aplicación.

/ ABSTRACT

ABSTRACT

For years, pharmaceutical research has focused on the search for new molecules that help controlling old and recent diseases. However, the search for new formulations that optimize drug release and its activity is not lost. Although some drugs are widely used, an improvement of their presentation or application is required. Due to expertise and previous developments in our group, this thesis focuses on the study of two of these cases: paclitaxel (PTX) and progesterone (PGT).

PTX is a very effective antitumor agent with low water solubility; therefore, it is administered intravenously through a non-aqueous vehicle containing Cremophor®EL/ethanol. This vehicle can cause severe allergic reactions, hypersensitivity, neurotoxicity, and precipitation in aqueous dilution. For this reason, there are PTX formulations that try to improve their solubility, while avoiding the use of the vehicle. However, these formulations are very far from being totally satisfactory.

An alternative formulation of PTX, stable and easy to use in clinical practice, could include cyclodextrins (CDs) as an excipient. These cyclic oligosaccharides are capable of solubilizing hydrophobic drugs through the formation of inclusion complexes (IC).

In the **first chapter** of this thesis (***Paclitaxel Inclusion Complexes***), PTX behavior was studied with a random methylated CD (RAME β -CD) in three different solvents (PBS:EtOH, H₂O:EtOH and water) by means of its phase solubility diagrams (PSD). Stability constants ($K_{1:1}$) and Encapsulation Efficiencies (EE) were calculated. The best results were obtained for PBS:EtOH. Different protocols of IC preparation between PTX and RAME β -CD in PBS:EtOH were tested. The Inclusion Efficiencies (E_{PTX}) were calculated and were less than 50 % in all cases. The IC were characterized by FT-IR, DSC, pulsed NMR and DLS, verifying drug inclusion within CD cavity. The PTX/RAME β complexes formed aggregates that hampered the quantitative determination by HPLC technique.

Subsequently, PTX/RAME β -CD complexes in H₂O:EtOH in different molar ratios were obtained. It was possible to achieve a good Inclusion Efficiency in complexes 1:20 mol/mol PTX:RAME β -CD (>90 %). The IC were characterized by DLS and SEM. The aggregates were 1,5 times higher than those obtained in PBS:EtOH. The micrographs obtained by SEM indicated the formation of IC since a new solid phase.

In addition, PTX/RAME β -CD complexes were prepared in different solvents (EtOH, MeOH or water) and with disintegrating additives or mechanical disruption (citric acid, polyvinylpyrrolidone or sonication). On one hand, the Inclusion Efficiencies improved by

modifying the solvent, with respect to IC prepared in H₂O:EtOH. On the other hand, complexes with anti-aggregant additives presented Inclusion Efficiencies less than 60 % and reduced particle sizes in comparison with the previous complexes.

PGT is a natural steroid hormone that plays a crucial role in maintaining the normal physiology of the female reproductive system and is used in the medical field, especially as a support to the luteal phase in assisted fertilization treatments. Because of its low solubility, it is administered in a micronized manner and/or in vehicles with oils by different ways: oral, intramuscular and vaginal. The incorporation of PGT into the CD cavity will allow to increase the solubility of the hormone and improve the existing formulations.

In the **second chapter** of this thesis (**Progesterone Inclusion Complexes**), a study of the PGT behavior with two CD (β -CD and RAME β -CD) in two different solvents (water and H₂O:EtOH) was carried out by obtaining their PSD. $K_{1:1}$ and the EE were calculated for each case. Good results were obtained with the RAME β -CD. For this reason, several protocols for the IC preparation between PGT and RAME β -CD were tested. Different molar ratios of reactants and several solvents were assayed. Good results for Inclusion Efficiencies (E_{PGT}) and Inclusion Yields (R_{PGT}) were obtained. The mixture H₂O:EtOH and the 1:5 molar ratio PGT:RAME β -CD were selected as conditions for complexes preparation. IC were characterized by DSC, FT-IR, ¹H-NMR, DLS and SEM, and PGT inclusion was verified.

In **Chapter 3** of this thesis (**Chitosan Gels**), the PGT/RAME β -CD complexes were incorporated in chitosan (Q) gels, as an alternative for the vaginal administration of PGT. First, Q gel preparation was optimized by statistical design experiments. It was possible to establish optimization criteria that were verified experimentally: transition to gel in 2,37 min at a temperature of 37,5 °C, with an *in vitro* residual mass percentage of 63,44 % after 7 days of immersion in buffer solution and pH of the gel equal to 6,92. Then, the optimized gels were characterized by FT-IR and by rheological measurements.

Gels containing the PGT/RAME β -CD complexes were characterized by FT-IR and SEM. Neither the micro and macroscopic characteristics of the gels nor the time of transition from solution to gel were modified after the incorporation of the complexes. The behavior of the gels in simulated vaginal fluid was evaluated. It was found that the Q gels with IC resisted the degradation to a greater extent in comparison to commercial gel.

Finally, the *in vitro* diffusion of PGT through porcine vaginal tissue (in gels with IC) was evaluated and compared with PGT solutions (free and complexed PGT) and a commercial micronized-PGT gel (Crinone®). It was found that the Q gels with IC presented sustained diffusions in time similar to that exhibited by the commercial gel. The use of Q gels with

PGT/RAME β -CD complexes would be a viable alternative for vaginal administration of PGT. This formulation would prevent local irritation at the application site.

**INTRODUCCIÓN / DESARROLLO
TEÓRICO**

DESARROLLO TEÓRICO

1. INTRODUCCIÓN

En distintos proyectos de I+D de nuestro grupo de trabajo se utilizan oncológicos y progestágenos como drogas de estudio. En el marco de estas líneas de investigación se propuso avanzar en el conocimiento de dos drogas pertenecientes a los grupos mencionados y orientar el estudio a la aplicación de ciclodextrinas (CD) y matrices poliméricas como plataformas de sistemas de liberación. Por ese motivo, a continuación, se realiza una breve descripción de los fármacos utilizados en este trabajo (paclitaxel y progesterona), es decir sus características fisicoquímicas, aplicaciones y formulaciones actuales y una breve revisión de la bibliografía del uso de CDs como estrategia alternativa para mejorar sus solubilidades y por lo tanto sus aplicaciones. Asimismo, se describe el polímero utilizado como soporte de liberación (quitosano), explicando sus características, propiedades y usos, haciendo hincapié en los sistemas denominados hidrogeles. El quitosano es, desde hace años, un polímero de uso en nuestro grupo de trabajo para la preparación de sistemas de liberación de aplicación en salud humana y animal.

2. PACLITAXEL

2.1. Generalidades

El paclitaxel (PTX) es un agente antitumoral muy eficaz, descubierto a principios de 1960, que se obtiene a partir de la corteza de *Taxus brevifolia*, un árbol pequeño de hoja perenne y crecimiento lento originario del noroeste de Norteamérica [1,2].

Es una molécula hidrofóbica (Figura 1) de baja solubilidad acuosa (0,34 mg/L o 0,4 μ M) y peso molecular alto (853,91 g/mol) perteneciente a la familia de los taxanos [3-5].

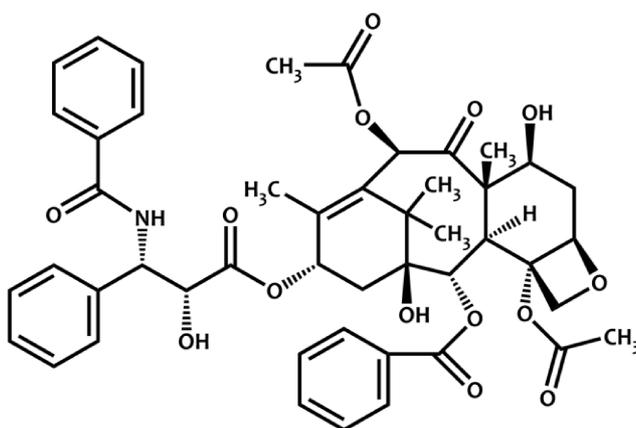


Figura 1. Estructura química del paclitaxel.

Es un diterpenoide tricíclico que contiene un anillo complejo "taxano" y una función amida, por lo que ocasionalmente se lo considera un pseudo alcaloide [1]. En su estructura química se destaca un esqueleto hidrocarbonado formado por tres ciclos de 6, 8 y 6 carbonos polisustituido con cuatro metilos y ocho funciones oxigenadas (entre ellas, una de b-feniloserina que esterifica la posición C-13). La molécula posee en total once estereocentros [6].

El PTX, es aún uno de los agentes terapéuticos más efectivo y ampliamente utilizado contra una gran variedad de tumores [1].

2.2. Mecanismos de acción

Los microtúbulos son el principal constituyente del huso mitótico en todas las células eucariotas, es por eso que son un blanco farmacológico interesante para la terapia del cáncer [1]. Los microtúbulos son polímeros tubulares formados por heterodímeros de dos tipos de proteínas: α y β -tubulina, que se combinan en presencia de guanosín trifosfato (GTP), Mg^{2+} y ciertas proteínas asociadas a microtúbulos. Poseen dos extremos: uno negativo inerte, en el cual se inicia la nucleación, y otro positivo dinámico, que está sujeto a frecuentes crecimientos (por adición de dímeros $\alpha\beta$) o contracciones (por liberación de estos dímeros) [6,7]. Este equilibrio dinámico entre los microtúbulos y los dímeros de tubulina juega un rol fundamental en la coordinación de numerosos procesos biológicos como: segregación cromosómica, mantenimiento de la forma celular y en la motilidad celular [6,7].

En 1979, en el colegio de medicina Albert Einstein de Nueva York, se dilucidó por primera vez el mecanismo de acción del PTX [8]. El PTX se une selectivamente a la subunidad β de las proteínas de tubulina, promoviendo su polimerización y ensamblaje, estabilizando así la formación de los microtúbulos [1]. Sin embargo, aunque son muy estables, estos microtúbulos son demasiado largos y disfuncionales, lo que deriva en la pérdida de la función del huso mitótico, la consiguiente detención del ciclo celular y, finalmente, la apoptosis celular [1,6]. Ya que en las células cancerosas la división celular es mucho más rápida que en las células normales, el PTX estabiliza sus microtúbulos e inhibe la multiplicación de las células tumorales. Es por eso que se lo clasifica como antimitótico.

Asimismo, se encontró que PTX restringe la angiogénesis tumoral e induce la expresión de genes y citoquinas que conducen a la inhibición del crecimiento celular y la apoptosis [1]. Por consiguiente, la combinación de estas propiedades antiproliferativas y citotóxicas resulta en la alta eficacia antitumoral del PTX.

2.3. Indicaciones terapéuticas

Aunque en 1979 se descubrió el mecanismo de acción de PTX, no fue hasta 1992 que la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, del inglés *Food and Drug Administration*) autorizó la comercialización del PTX para el tratamiento del cáncer de ovario. Hoy en día se utiliza para: Sarcoma de Kaposi (segunda línea), cáncer de mama (metastásico o no metastásico), cáncer de ovario avanzado (primera línea) y neoplasia maligna pulmonar microcítica (metastásica o no metastásica) [1,2,5]. Además, dada su potente actividad antineoplásica, a menudo se lo utiliza fuera de indicación (del inglés *off-label*) para tratar el cáncer de esófago, vejiga, próstata, gástrico, entre otros [1].

A pesar del amplio espectro de actividad antitumoral, su eficacia en tumores sólidos y diseminados y de su mecanismo de acción único, presenta efectos secundarios significativos producidos por el vehículo utilizado en la formulación convencional [9].

2.4. Formulación actual

El PTX posee un índice terapéutico bajo, es extremadamente hidrófobo y posee una escasa solubilidad [3,5]. Por este motivo, la formulación comercial actual de PTX (Taxol®) utiliza un vehículo no acuoso que contiene Cremophor®EL (aceite de ricino polietoxilado) y etanol, (50:50, v:v). Generalmente durante la quimioterapia, se administra en forma sistémica por vía intravenosa, pero genera efectos secundarios severos en los pacientes que incluyen: reacciones alérgicas graves, hipersensibilidad, nefrotoxicidad y neurotoxicidad; causados por Cremophor®EL [2,5,10,11]. Además, luego de la dilución en la solución para su administración, presenta una baja estabilidad con la posibilidad de precipitación [5]. Por estos motivos, se trabaja en el desarrollo de formulaciones alternativas de PTX con una solubilidad en agua mejorada que al mismo tiempo eviten o minimicen los efectos secundarios de la formulación actual.

2.5. Formulaciones alternativas

Se han reportado varios sistemas nuevos para suministrar PTX: partículas y cápsulas en micro y nano escala, profármacos, conjugados con albúmina, emulsiones, conjugados poliméricos, micelas, liposomas, uso de cosolventes y ciclodextrinas [1,3,9,12,13]. Algunas formulaciones lograron mejorar la solubilidad del fármaco y al mismo tiempo evitar el uso del Cremophor®EL con la consecuente disminución de la toxicidad, por lo que se encuentran en fase de ensayo clínico o ya fueron aprobadas para su uso, como es el caso de Abraxane®, Lipusu®, Genexol® y Opaxio™, entre otros. Sin embargo, los procesos de fabricación son

difíciles de escalar o incluso costosos y por lo tanto las formulaciones son costosas; además, en algunos casos no son considerables los beneficios en términos de eficacia terapéutica con respecto al producto comercial. En otros casos el sistema es tan novedoso que es difícil diseñar un modelo animal predictivo para ensayos preclínicos [1].

3. PROGESTERONA

3.1. Generalidades

La progesterona (PGT) es una hormona natural esteroidea producida tanto en hombres como en mujeres en la corteza suprarrenal y las gónadas, en el sistema nervioso central y periférico y en la placenta en mujeres durante el embarazo. Se sintetiza a partir de la pregnenolona, un derivado del colesterol, a través de diferentes procesos mediados por enzimas [14,15].

Estructuralmente la PGT consiste en 21 átomos de carbono distribuidos en cuatro anillos fusionados: tres conformados por seis átomos de carbono y uno por cinco átomos de carbono. Contiene grupos funcionales cetona y metilo (Figura 2). Es una molécula lipofílica de 314,47 g/mol de peso molecular y una baja solubilidad acuosa (7 mg/L o 22,26 μ M, a 25 °C) [14,16] que presenta un tiempo de vida media biológico corto [15].

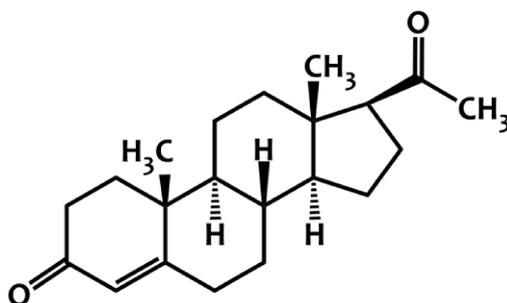


Figura 2. Estructura química de la progesterona.

Su nombre se deriva de "hormona esteroidea **prog**estacional". Desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la fisiología normal del sistema reproductivo femenino, ya que está principalmente involucrada en la proliferación tisular benigna dependiente del ciclo del útero, la ovulación, la implantación del óvulo fertilizado y el mantenimiento del embarazo. Otras acciones fisiológicas de la PGT incluyen la proliferación del tejido mamario normal, la protección contra la pérdida ósea, así como la regulación de las señales de respuesta sexual en el cerebro [14,17,18].

3.2. Mecanismo de acción en el aparato reproductor

Durante la segunda parte del ciclo menstrual (fase lútea o secretora), el cuerpo lúteo produce PGT, que estimula la actividad secretora del endometrio: el endometrio comienza a almacenar grandes cantidades de nutrientes a fin de ofrecer las condiciones adecuadas para la implantación del óvulo fecundado. Si se produce la fertilización y la implantación del óvulo, el cuerpo lúteo continúa produciendo PGT bajo la estimulación de la gonadotropina coriónica humana (hCG) hasta que la placenta se vuelva funcional, es decir alrededor de las 6-8 semanas de gestación. En este punto los trofoblastos placentarios se hacen cargo de la producción de PGT y la producción de PGT lútea comienza a disminuir a medida que disminuye la cantidad de hCG producida por la placenta. Luego, la producción de PGT placentaria durante el embarazo continúa aumentando hasta que la placenta es expulsada luego del parto [19,20].

3.3. Usos

En base a su gran importancia en el sistema reproductivo femenino, el uso terapéutico de la PGT se extendió al tratamiento de diversas afecciones. Está indicada en la preparación para la cirugía ginecológica y extra-ginecológica durante el embarazo, en amenazas de aborto, la hiper o hipo-menorrea y otros trastornos menstruales, el síndrome premenstrual y en la profilaxis de la depresión posnatal [14]. Además, el efecto antiestrogénico de la PGT en el endometrio condujo a su utilización como parte del tratamiento de preservación de la fertilidad para la hiperplasia endometrial y el carcinoma endometrial primario [17,18]. También se administra como parte de la terapia de reemplazo hormonal en mujeres menopáusicas [15,21].

En prácticamente todos los protocolos de estimulación utilizados para la fertilización *in vitro* (FIV), la fase lútea es defectuosa. Los mecanismos probablemente más responsables de este defecto en la tecnología de reproducción asistida incluyen niveles suprafisiológicos de estradiol, producción disminuida de hormona luteinizante y alteración del cuerpo lúteo [18]. Por eso, la PGT también está indicada como un suplemento en la fase lútea durante embarazos asistidos [14].

3.4. Vías de administración y formulaciones

Si bien existen diferentes opciones de formulación y administración de la PGT, en la actualidad las vías más comunes para la reproducción asistida son: oral, intramuscular y vaginal. Las propiedades farmacológicas son diferentes según la ruta de administración:

▪ *Vía Oral:* La PGT administrada por vía oral se absorbe casi por completo cuando se administra en forma micronizada en cápsulas. Sin embargo, muestra una baja biodisponibilidad (<10 %) debido a la intensa inactivación por el metabolismo de primer paso por el hígado [22,23]. Por este motivo, se requieren grandes dosis para alcanzar niveles sanguíneos razonables (hasta 600 mg/día), que solo logran bajas concentraciones endometriales del fármaco y no llegan a desencadenar la gama completa de cambios endometriales observados en la fase lútea tardía del ciclo menstrual [21,23]. Por consiguiente, su eficacia como soporte de la fase lútea en terapias de reproducción asistida es baja, ya que genera menores tasas de embarazo que mediante otras vías [18]. Por otro lado, los metabolitos de PGT pueden causar efectos secundarios significativos como fatiga, mareos y somnolencia [24]. La aparición de estos efectos secundarios, la baja biodisponibilidad y la ineficaz acción de la PGT oral hacen que en la actualidad este tipo de formulaciones no sea tan ampliamente utilizada [14,21,22].

▪ *Vía Intramuscular:* Las inyecciones intramusculares requieren que la PGT se encuentre solubilizada en un aceite. Si bien se logran buenas concentraciones plasmáticas y se mejora la absorción celular (y por lo tanto mejora la biodisponibilidad), el uso del aceite altera el tejido local y provoca dolor e irritación en el lugar de la inyección, infecciones, inflamaciones, reacciones alérgicas y posibles abscesos [14,18]. Puede llevar más de una semana recuperarse por completo de estos efectos secundarios, porque la vida media del aceite en el músculo suele ser de dos semanas. Estos efectos secundarios muchas veces pueden reducir el cumplimiento de la paciente y, por tanto, la eficacia terapéutica. Si bien la administración por esta vía en terapias de reproducción asistida posee una buena eficacia al mejorar las tasas de embarazo y nacimientos vivos [18], presenta además de los efectos secundarios mencionados, el inconveniente de requerir de una persona especializada para la aplicación [25].

▪ *Vía vaginal:* El epitelio vaginal posee una gran área de superficie, un abundante suministro de sangre y es permeable a una amplia gama de compuestos, entre ellos las hormonas [22,26]. Esto hace que la PGT posea una absorción preferencial mediante esta vía, al dirigirse específicamente al útero y la pelvis [18]. Además, como se evita el efecto de primer paso del hígado, sus efectos secundarios sistémicos adversos se minimizan [14,17].

En comparación con la administración intramuscular, la administración vaginal produce concentraciones de PGT sérica significativamente más bajas, pero concentraciones mucho más altas de PGT en los tejidos endometriales debido al efecto del primer paso uterino [24,25,27]. Además, la administración vaginal ofrece una serie de ventajas potenciales sobre las inyecciones intramusculares en términos de tolerabilidad y

conveniencia [28]. En diferentes estudios de casos utilizando PGT intramuscular y vaginal no se reportaron diferencias entre ambas vías en cuanto a las tasas de embarazo y en la prevención del trabajo de parto prematuro en mujeres en riesgo [24,25,29,30]. Sin embargo, la PGT vaginal presentó menos efectos indeseables en las pacientes [31].

Si bien las formulaciones vaginales de PGT actuales cuentan con claras ventajas sobre otras rutas, como la fácil aplicación y liberación en el sitio de acción con buenos resultados, evitando muchos de los efectos indeseados; exhiben otros inconvenientes. Por ejemplo: el ambiente vaginal es un medio con pH ácido (4,5 - 5,5), lo que genera limitaciones en los productos; las secreciones vaginales y los mecanismos de auto-limpieza llevan a la fuga de casi todas las formulaciones, dando por resultado tiempos de residencia vaginal disminuidos; y se producen eventos locales adversos, como irritación e inflamación del tejido y aumento de la frecuencia de micosis. Estos factores son responsables muchas veces de la discontinuidad del tratamiento y por tanto de un efecto terapéutico insatisfactorio [17,18,29].

En la Tabla 1 se presenta un cuadro comparativo entre las diferentes vías de administración de la PGT.

Tabla 1. Cuadro comparativo entre las diferentes vías de administración de PGT.

	VÍA DE ADMINISTRACIÓN		
	ORAL	INTRAMUSCULAR	VAGINAL
Biodisponibilidad	baja	alta	alta
Dosis [27,29]	200-600 mg/día	25-100 mg/día	90-600 mg/día
Eficacia en Reproducción asistida	Baja	Alta	Alta
Uso	Poco	Alto	Alto
Desventaja	Primer paso por el hígado	Requiere de una persona especializada para la aplicación	Descargas vaginales
Ventaja	Fácil aplicabilidad	Menor frecuencia de aplicación	Primer paso uterino
Efectos secundarios	Sensaciones de vértigo, fatiga, mareos y somnolencia	Locales: dolor, irritación, infecciones, inflamaciones, reacciones alérgicas y abscesos	Locales: irritación e inflamación del tejido y aumento de la frecuencia de micosis.
Ejemplo de producto comercial	Progeffik 200 mg Utrogestan 200mg Progest 200 mg	Gestone 200mg/2mL	<i>Cápsula blanda:</i> Progest 200 mg, Utrogestan 200mg. <i>Gel:</i> Crinone® 8 %.

3.5. Formulaciones vaginales

La vagina posee características que pueden ser consideradas limitantes o ventajosas a la hora de administrar fármacos. Sin embargo, es un sitio muy adecuado para formulaciones bioadhesivas. El uso de polímeros hidrofílicos, por ejemplo, permite aumentar el tiempo de retención del sistema de administración en los tejidos mucosos, lo que lleva a la liberación gradual del ingrediente activo y a una mejor tolerancia por parte de la paciente. Por eso, algunos de los sistemas de administración vaginal de fármacos se basan en polímeros mucoadhesivos. Un producto ampliamente utilizado es el gel comercial Crinone®.

3.5.1. Crinone® 8 %

Crinone® 8 % es un gel vaginal que contiene PGT y es utilizado en tratamientos de fertilidad asistida. Es un producto inglés que se lo puede adquirir en el mercado a \$1573¹; son 15 aplicaciones de dosis única que contienen 90 mg de PGT. La Figura 3 muestra el dispositivo comercializado.



Figura 3. Dispositivo comercial Crinone® 8 %.

La PGT se encuentra micronizada en aceite debido a su baja solubilidad acuosa. Contiene como excipientes carbopol (también conocido como carbómero) y policarbófilo, dos polímeros sintéticos de ácido acrílico con excelentes propiedades bioadhesivas [32]. Su dosificación es diaria durante el período de refuerzo de la fase lútea y hasta 12 semanas luego del implante del embrión. Esto es una ventaja por sobre otros dispositivos vaginales (cápsulas blandas) que requieren de tres aplicaciones diarias para lograr el mismo efecto [27]. Además, se encontró que las preferencias de las pacientes fueron significativamente más altas para los geles vaginales, en comparación con la administración intramuscular y las cápsulas blandas de uso vaginal [28]. Por otro lado, se encuentra reportado que el tratamiento de la infertilidad con Crinone® proporciona un efectivo

¹ Precio correspondiente a noviembre de 2017.

soporte de la fase lútea para ovocitos donados y programas regulares de FIV, y que las tasas de embarazo son comparables con las logradas después de la administración intramuscular de PGT [23,27,28].

El fabricante garantiza la liberación de la droga por lo menos durante tres días [33]. Aunque esto permite la liberación sostenida de PGT, al permanecer en la vagina durante varios días (sumado a la acumulación debida a la aplicación diaria) puede generar flujo vaginal con restos de producto que provocan irritación, inflamación, sequedad o dolor vaginal [18,24]. Muchas veces la acumulación de gel debe eliminarse manualmente, ya que puede causar malestar durante el coito [18,33].

4. CICLODEXTRINAS

4.1. Ciclodextrinas naturales

Las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos producidos por síntesis enzimática selectiva a partir del almidón y presentan una estructura en 3D caracterizada por una cavidad hidrofóbica y un exterior hidrófilo. Al ser productos naturales presentan un efecto tóxico muy bajo, pudiendo ser utilizadas en medicamentos, alimentos o cosméticos [34,35].

Existen distintos tipos de CDs, entre ellas las denominadas naturales, que constan de 6, 7 u 8 unidades de glucopiranosas unidas por enlaces α -(1-4), conocidas como α -, β - y γ -CDs respectivamente. El acoplamiento específico de los monómeros de glucosa otorga a cada CD una estructura molecular rígida con una cavidad interior con un volumen determinado. Si bien la altura de la cavidad es la misma para los tres tipos, el número de unidades de glucosa determina el diámetro interno de la cavidad y por tanto el volumen [34,36].

En la Figura 4 se muestra la estructura química y la representación esquemática de cada una de las CDs naturales y en la Tabla 2 se resumen sus principales propiedades fisicoquímicas.

La cavidad interna hidrofóbica de las CDs es una característica estructural fundamental de estas moléculas que les proporciona la capacidad de actuar como *anfitrión* y formar, con otras moléculas de naturaleza muy diversa (*huésped*), estructuras estables conocidas comúnmente como complejos de inclusión (CI). Estos complejos exhiben nuevas características fisicoquímicas, ya que mejoran las propiedades de las drogas incluidas, es decir la biodisponibilidad, solubilidad en agua, estabilidad en presencia de luz, calor y condiciones de oxidación; al mismo tiempo que disminuyen los efectos secundarios indeseados. Además de ser utilizadas en la industria farmacéutica, las CDs son usualmente utilizadas en sectores como las industrias cosmética, alimentaria, textil y química, las que

aprovechan esta capacidad de incluir una gran variedad de moléculas hidrofóbicas en su cavidad [37-39].

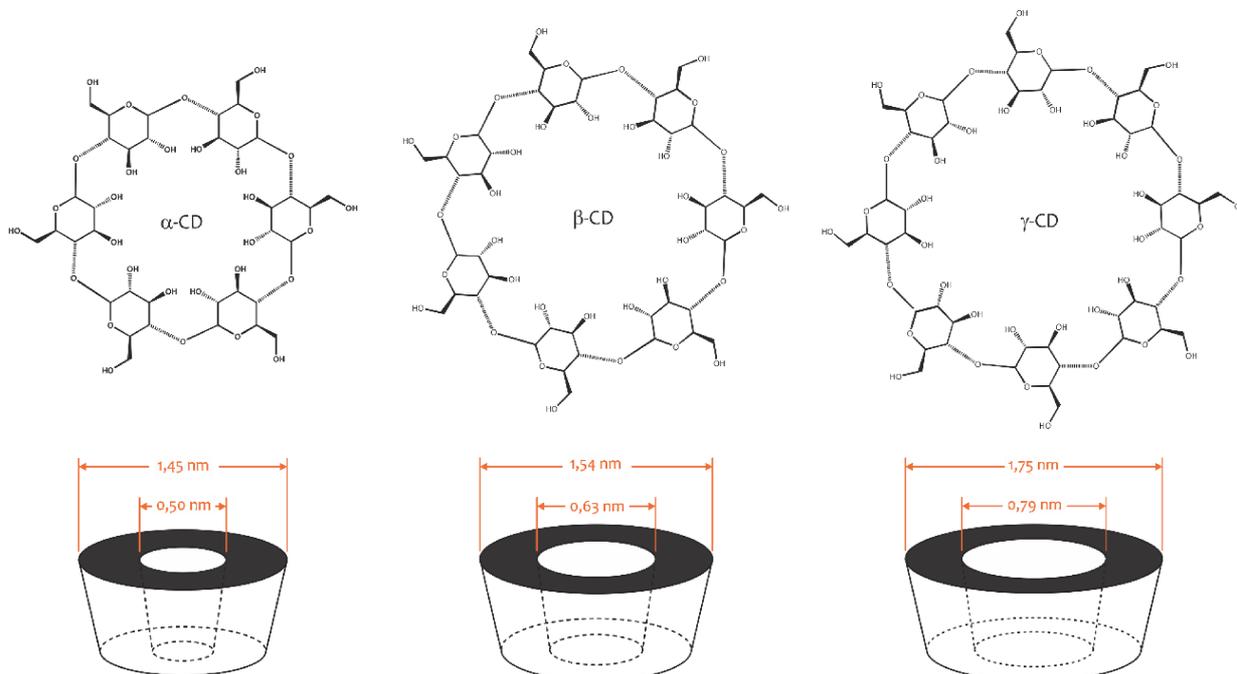


Figura 4. Estructuras de las ciclodextrinas naturales (adaptado de Frömring y col., 1993).

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de las ciclodextrinas naturales: α -ciclodextrina, β -ciclodextrina y γ -ciclodextrina (adaptado de Sharma y col., 2014).

PROPIEDAD	α -CD	β -CD	γ -CD
Unidades de Glucosa	6	7	8
Peso molecular (Da)	972	1135	1297
Solubilidad en agua a 25 °C (mg/mL)	145	18,5	232
Diámetro cavidad interna (nm)	0,47-0,53	0,6-0,65	0,75-0,83
Diámetro externo (nm)	1,42-1,5	1,5-1,58	1,35-2,15
Altura del anillo (nm)	0,79	0,79	0,79
Volumen aproximado de la cavidad ($\times 10^{-3}$ nm ³)	174	262	427

4.2. β -Ciclodextrinas y sus derivados

Aunque las CDs naturales y sus complejos son hidrófilos, su solubilidad acuosa se encuentra bastante limitada, especialmente la de las β -CDs. Esta limitación se debe a la fuerte unión de moléculas de CDs en el estado sólido y a que los puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilos dentro de las CDs disminuyen su capacidad de interactuar con las moléculas de agua circundantes [34,38]. Sin embargo, las CDs naturales pueden derivatizarse, gracias a la disponibilidad de estos grupos hidroxilo reactivos, para modificar convenientemente su solubilidad y propiedades de inclusión, y de esta manera extender su rango de aplicación [40,41]. Debido a las dimensiones moleculares y al precio, los esfuerzos

se volcaron a obtener diferentes derivados más solubles de β -CD con el propósito de aprovechar al máximo su mayor capacidad para incluir moléculas de fármaco en su cavidad [42].

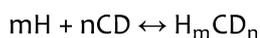
Cada unidad de glucosa de las CDs presenta dos hidroxilos secundarios y un hidroxilo primario, proporcionando entre 18-24 sitios para la modificación química y la derivatización. Las β -CDs poseen 14 hidroxilos secundarios en el extremo más ancho, correspondiente a los átomos de carbono C2 y C3 de las unidades de glucopiranososa y 7 hidroxilos primarios en el extremo más angosto del cono correspondientes a los carbonos C6 de cada glucosa, que pueden ser sustituidos por diversos grupos funcionales para formar diferentes derivados [43]. La sustitución de algunos de los grupos hidroxilo de las β -CDs forma derivados como: hidroxipropil- β -CD (HP- β -CD), sulfobutileter- β -CD (SBE- β -CD), hidroxietil- β -CD (HE- β -CD) y metil- β -CD (M- β -CD, en sus distintas formas), que son ampliamente utilizados por su solubilidad y capacidad de inclusión mejoradas con respecto a la β -CD natural [2,34,35,39].

Los derivados completamente sustituidos tienen una solubilidad acuosa menor que los derivados parcialmente sustituidos. Además, la capacidad de los derivados de CDs para formar complejos hidrosolubles también depende del grado de sustitución, por lo que generalmente se optimiza la reacción de sustitución con respecto a la capacidad de las CDs de generar complejos solubles en agua. Así, por ejemplo el grado de sustitución de la CD metilada al azar (RAME β -CD) de calidad farmacéutica es aproximadamente 12,6, es decir, que posee en promedio 1,8 grupos metoxilos por cada unidad de glucosa [38].

4.3. Complejos de inclusión

En solución acuosa, la cavidad no polar de las CDs está ocupada por moléculas de agua que se encuentran en un estado energéticamente desfavorecido. Esta conformación permite que, mediante el simple reemplazo del agua, se incluyan moléculas apolares o partes de moléculas dentro de la cavidad, constituyendo estructuras conocidas como complejos de inclusión (CI). Estas estructuras, de un estado energético más estable, se forman mediante interacciones hidrofóbicas, van der Waals y enlaces puentes de hidrógeno, y le confieren a las moléculas *huésped* nuevas y mejores características fisicoquímicas, como por ejemplo el incremento de la solubilidad aparente en agua y por consiguiente de la biodisponibilidad [34,41]. Debido a la falta de enlaces covalentes en estos complejos, las CDs son consideradas como excipientes y los complejos resultantes no son considerados como sustancias activas nuevas [43].

Si bien la interacción inicial para formar el complejo es muy rápida (a menudo de minutos), el equilibrio puede tardar más tiempo en alcanzarse [36]. Una vez dentro de la cavidad, la molécula *huésped* realiza ajustes conformacionales para aprovechar al máximo las fuerzas de interacción que existen en ese entorno. Sin embargo, esta unión no es fija o permanente, sino un equilibrio dinámico rápido con moléculas libres de la solución, regido por la siguiente ecuación:



Donde: m es el número de moléculas de *huésped* (H) asociadas con n moléculas de CD (CD) para formar un complejo H -CD con estequiometría $m:n$. La formación de los complejos se expresa cuantitativamente mediante la constante de formación $K_c = [H_mCD_n] / [H]^m [CD]^n$, donde $[H_mCD_n]$, $[H]$ y $[CD]$ son las concentraciones del fármaco incluido, el fármaco libre y la CD libre, respectivamente. Valores de K_c cercanos a 0 indican que el fármaco es incapaz de formar complejos con la CD [44].

La inclusión es un fenómeno molecular estequiométrico en el que generalmente solo una molécula *huésped* interactúa con la cavidad de una CD (estequiometría 1:1). Pero en el caso de algunas moléculas de bajo peso molecular, partes de más de una molécula *huésped* pueden caber en la cavidad, y en el caso de algunas moléculas de alto peso molecular, más de una molécula de CD puede unirse al *huésped* (Figura 5). Como resultado, es posible encontrar estequiometrías superiores.

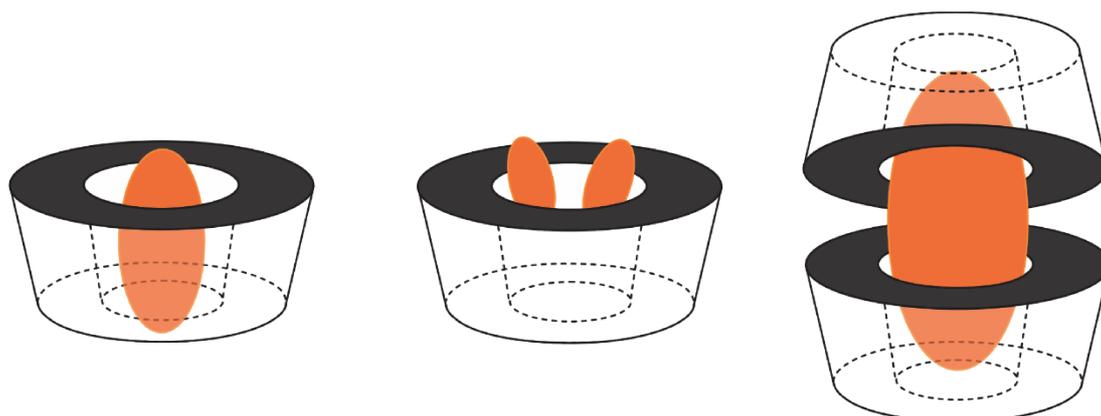


Figura 5. Estequiometrías posibles de complejos de inclusión.

Izquierda: estequiometría 1:1, centro: estequiometría 2:1, derecha: estequiometría 1:2.

En solución los complejos se forman y rompen continuamente. La disociación del CI es un proceso relativamente rápido, impulsado por la disolución o dilución. El gradiente de concentración resultante desplaza el equilibrio hacia la izquierda. En sistemas altamente diluidos y dinámicos (como el cuerpo humano) el *huésped* tiene dificultades para encontrar

otra CD y volver a formar el complejo, quedando libre en solución y pudiendo atravesar la membrana [37].

La capacidad de una CD para formar un CI con una molécula *huésped* es una función de dos factores clave. Por un lado, el **factor estérico**: la formación del complejo depende del tamaño de la CD relativo al de la molécula *huésped*, de ciertos grupos funcionales del *huésped* y de si se trata de una CD derivatizada o no. Si el *huésped* no tiene un tamaño compatible, no puede ingresar correctamente a la cavidad de la CD por impedimento estérico. En caso de una CD derivatizada, la estructura, cantidad y ubicación de los sustituyentes también tienen un efecto estérico que influye en la formación de los complejos [39]. Si el tamaño es el adecuado y el complejo se forma, la fuerza de unión depende de qué tan bien se ajuste el *huésped* al *anfitrión* y de las interacciones locales específicas entre los átomos superficiales. Por otro lado, la **interacción termodinámica** entre los diferentes componentes del sistema (CD, *huésped* y solvente): debe ser la adecuada para que la fuerza impulsora neta sea favorable y atraiga al *huésped* hacia la CD [34,37,39,41,42].

Los complejos se pueden obtener en solución o en estado sólido mediante una variedad de técnicas que dependen de las propiedades del material a incluir, la cinética de equilibrio, de los otros compuestos presentes y la forma de dosificación final deseada. Sin embargo, cada uno de estos procesos requiere de una pequeña cantidad de agua para favorecer la termodinámica. Entre los métodos utilizados se encuentran: la mezcla en seco, la mezcla en solución y suspensiones (seguidas de una separación adecuada, como filtración o centrifugación), la preparación de pastas y otras técnicas termomecánicas [36,37,42].

Las estructuras de los complejos sólidos no necesariamente son idénticas a las de los complejos en solución. En solución, la molécula *huésped* o sus partes se localizan dentro de la cavidad de la CD y todo el complejo está rodeado por una multicapa de moléculas de agua. En cambio, en el estado sólido, la molécula *huésped* puede localizarse no sólo dentro de la cavidad, sino también entre las moléculas de CD, formando una red de complejos de inclusión. Por este motivo los complejos en estado sólido rara vez presentan una composición estrictamente estequiométrica [37,41,42].

4.4. Diagrama de solubilidad de fases

Tradicionalmente, para determinar no solo el valor de la constante de estabilidad sino también para tener una idea de la estequiometría del equilibrio en solución, se lleva a cabo un análisis del efecto en la solubilidad de fases ejercido por el *anfitrión* sobre el *huésped*. Las explicaciones teóricas y prácticas de este análisis fueron desarrolladas por Higuchi y

Connors en un trabajo pionero publicado en 1965 [45]. Estos autores describieron una metodología, que, aunque no verifica la formación de los CI, permite clasificar los complejos según los perfiles de diagramas de solubilidad de fases (DSF). Esta clasificación se basa en cómo varía la solubilidad aparente del soluto en estudio debido a la formación de complejos cuando aumenta la concentración de CD disuelta [42].

Experimentalmente, se coloca una cantidad constante y en exceso del soluto en viales a los que se les añade un volumen constante de solución que contiene concentraciones crecientes de CDs. Los viales se agitan a temperatura constante hasta que se establece el equilibrio. Las suspensiones se filtran y se determina la concentración total del soluto disuelto (espectrofotometría UV, HPLC, etc.). Finalmente se construyen los DSF que exhiben el efecto de la CD sobre la solubilidad aparente del soluto (fármaco *huésped*). En base a la forma del diagrama se pueden identificar varios tipos de comportamientos, como se ilustra en la Figura 6.

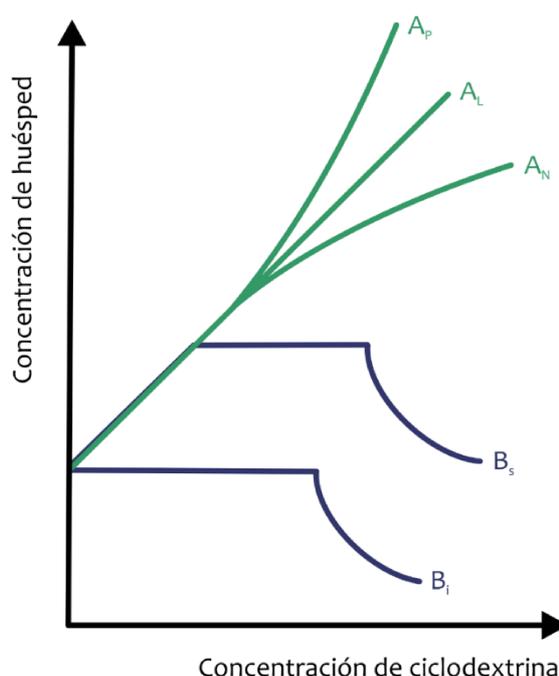


Figura 6. Tipos de diagramas de solubilidad de fases propuestos por Higuchi y Connors, 1965.

Los DSF se dividen principalmente en dos tipos: A y B. Los diagramas de *tipo A* se obtienen cuando la solubilidad del *huésped* (fármaco) aumenta al aumentar la concentración de *anfitrión* (CD), a través de la formación de complejos solubles en agua. Este perfil a la vez se subdivide en tres: A_L que indica que hay un aumento lineal de la solubilidad en función de la concentración de CD; A_p que indica una isoterma en la que la curva se desvía de la linealidad de una manera positiva, lo que sugiere que la CD es

proporcionalmente más eficaz a concentraciones más altas; y A_N que indica una desviación negativa respecto a la linealidad, lo que significa que la CD es menos eficaz a mayor concentración. Las tres curvas indican que se están formando estructuras solubles en agua con solubilidades superiores a las del sustrato no incluido [42,46].

Cuando el complejo es de primer orden con respecto al fármaco y a la CD, entonces estamos en presencia de perfiles del tipo A_L . Si el complejo es de primer orden con respecto al fármaco, pero de segundo orden o mayor con respecto a la CD, tenemos perfiles del tipo A_P . Los perfiles del tipo A_N son muy difíciles de interpretar en este sentido, y probablemente respondan a cambios en la constante dieléctrica del medio o a la agregación de las moléculas de CD [37].

En general, las CDs solubles en agua forman perfiles del tipo *A*, mientras que las CDs naturales menos solubles forman frecuentemente perfiles del tipo *B* que indican la formación de estructuras con limitada solubilidad en el medio de inclusión acuoso. Estos complejos de tipo *B* también se subdividen en dos: B_s de solubilidad limitada y B_i insolubles (Figura 6) [46,47].

4.5. β -Ciclodextrinas y paclitaxel

En la Tabla 3 se presentan algunos trabajos que reportan la inclusión del PTX en varias CDs, con el método que utilizaron para su obtención. Estos autores demostraron la viabilidad de realizar complejos de PTX con distintas CDs sin pérdida de actividad del PTX [2,4,5,11,48-53].

Sharma y colaboradores realizaron un estudio exhaustivo de CI obtenidos mediante dos métodos con seis CDs diferentes (β -CD, γ -CD, HP- β -CD, HP- γ -CD, DM- β -CD y HE- β -CD), en el cual obtuvieron buenos resultados con las β -CDs modificadas [48]. Por su parte, Alcaro y sus colaboradores ensayaron la obtención de CI con tres CDs que luego caracterizaron completamente. En su trabajo encontraron experimental y teóricamente (por modelado) que los complejos con DM- β -CD fueron los más estables [49]. Tanto Bouquet y colaboradores [4] como Shah y colaboradores [11] obtuvieron CI con diferentes β -CDs funcionalizadas, obteniendo resultados similares. Zarrabi y colaboradores utilizaron una β -CD funcionalizada con poliglicerol para obtener CI con PTX por el método de liofilización [50].

Algunos autores obtuvieron CI con CDs que luego incorporaron a nanopartículas [2,51,52] e hidrogeles [5,53].

Otros autores utilizaron CDs con mayores modificaciones para formar los complejos. Por ejemplo en el trabajo de Liu y colaboradores [54] utilizaron β -CDs unidas por puentes de

oligo-etilenodiamino y en el de Jing y colaboradores [55] conjugaron las CDs con ácido hialurónico para incluir el PTX.

Tabla 3. Trabajos en los que se reportan CI de PTX.

AUTOR	CD	MÉTODO	SOLVENTE
Sharma y col. [48]	β -CD γ -CD HP- β -CD HP- γ -CD DM- β -CD HE- β -CD	Liofilizado	Metanol:Agua (NI v:v) o TB:Agua (NI v:v)
Alcaro y col. [49]	β -CD DM- β -CD TM- β -CD	Liofilizado	Etanol:Agua (46:54 v:v)
Bouquet y col. [4]	HP- β -CD DM- β -CD RAME β -CD SBE- β -CD	Liofilizado	Etanol:Agua (50:50 v:v)
Shah y col. [11]	HP- β -CD M- β -CD SBE- β -CD	Liofilizado	Agua:ACN:TB (50:1:4 v:v:v)
Zarrabi y col. [50]	β -CD-g-PG	Liofilizado	Etanol:Agua (NI v:v)
Agüeros y col. [51,52]	β -CD HP- β -CD MoAm- β -CD	Secado en vacío	Etanol:Agua (20:80 v:v)
Ye y col. [2]	DM- β -CD	Liofilizado	Etanol:Agua (50:50 v:v)
Choi y col. [53]	DM- β -CD	Liofilizado	Agua
Jiang y col. [5]	HP- β -CD	Liofilizado	Etanol:Agua (NI v:v)

HP- β -CD= hidroxipropil- β -CD, HP- γ -CD= hidroxipropil- γ -CD, DM- β -CD= dimetil- β -CD, HE- β -CD= hidroxietil- β -CD, TM- β -CD= trimetil- β -CD, RAME β -CD= β -CD metilada al azar, SBE- β -CD = sulfobutil-etil- β -CD, M- β -CD= metil- β -CD, β -CD-g-PG = β -CD funcionalizada con poliglicerol, MoAm- β -CD= 6-monodeoxi-6-monoamino- β -CD; NI= no informa, ACN = acetonitrilo, TB = terbutanol

4.6. β -Ciclodextrinas y progesterona

La baja solubilidad acuosa de la PGT impulsó a que varios autores desarrollen diferentes protocolos para obtener CI con una amplia gama de CDs, reportando notables mejoras en la solubilidad [14,56-67].

En la Tabla 4 se mencionan algunos de los trabajos con el método que utilizaron para la obtención de los CI. Por ejemplo, mediante el método de secado en vacío Uekama y colaboradores [60] demostraron la formación de CI entre PGT y β - y γ -CD, mientras que Liu y colaboradores [61] obtuvieron CI con β -CD. Lahiani-Skiba y colaboradores compararon la obtención de CI de PGT con distintas CDs (β -CD, hidroxipropil- β -CD, trimetil- β -CD y γ -CD) utilizando dos métodos de preparación diferentes [56]. Separadamente, Torri y colaboradores [62] y Zopetti y colaboradores [15] demostraron que es posible la obtención

de CI de PGT con hidroxipropil- β -CD utilizando el método de coprecipitación para su preparación. Schipper y colaboradores prepararon los CI con dimetil- β -CD en etanol, que luego del secado resuspendieron en solución tamponada de fosfatos para su aplicación nasal [63].

Además, se reportaron estudios de CI de PGT con distintas CDs, obtenidos mediante diversos métodos, e incorporados en estructuras como: micropartículas de quitosano [58], nanoesferas [64,65], nanopartículas [66] y nanopartículas lipídicas sólidas [67]; para formar sistemas ternarios (Tabla 4).

Tabla 4. Trabajos en los que se reportan CI de PGT.

AUTOR	CD	MÉTODO	SOLVENTE
Uekama y col. [60]	β -CD γ -CD	Secado en vacío	Agua
Liu y col. [61]	β -CD	Secado en vacío	Agua
Lahiani-Skiba y col. [56]	β -CD HP- β -CD TM- β -CD γ -CD	Coprecipitación Liofilizado	Agua
Torri y col. [62]	HP- β -CD	Coprecipitación	Agua
Zopetti y col. [15]	HP- β -CD	Coprecipitación	Agua
Schipper y col. [63]	DM- β -CD	Solución+secado	Etanol
Cerchiara y col. [58]	HP- β -CD	Secado por spray Liofilizado	Agua
Da Silveira y col. [66]	HP- β -CD	Solución acuosa	Agua
Luppi y col. [64]	HP- β -CD DM- β -CD	Secado por spray Liofilizado	Agua
Cavalli y col. [67]	β -CD HP- β -CD	Coprecipitación	Etanol:Agua (30:70 v:v)
Memisoglu y col. [65]	β -CD anfifílica	Liofilización	Etanol:Agua (50:50 v:v)

HP- β -CD= hidroxipropil- β -CD, TM- β -CD= trimetil- β -CD, DM- β -CD= dimetil- β -CD

5. QUITOSANO

5.1. Generalidades

El quitosano (Q) es un polisacárido lineal formado por unidades de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina (Figura 7) distribuidas al azar y unidas por enlaces β -(1,4) glucosídicos [68,69].

Se trata de un aminopolisacárido, obtenido por la desacetilación de la quitina, un compuesto natural muy abundante (el segundo más abundante después de la celulosa) presente en el exoesqueleto de crustáceos e insectos y en las paredes celulares de ciertas

algas y de la mayoría de los hongos [5,70,71]. Tiene un peso molecular promedio que varía entre 3,8 a 20 kDa, y un grado de desacetilación de entre 66 a 95 % [70].

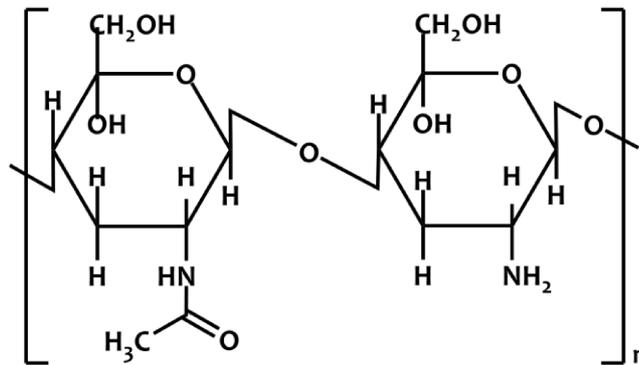


Figura 7. Estructura química del quitosano.

La desacetilación de la quitina consiste en la pérdida del grupo acetilo (del grupo amida) ubicado en el carbono 2, dando lugar a un grupo amino en esa posición. Como generalmente la desacetilación es parcial, se obtiene una mezcla de cadenas, formadas por distintas proporciones de las unidades, que originan materiales con diferentes propiedades [68,70]. La relación entre las dos unidades se conoce como grado de desacetilación, y cuando es de aproximadamente de 50 %, el Q se vuelve soluble en medios acuosos ácidos [68,72].

La existencia de los grupos amino en el Q representa una gran ventaja, ya que le otorga funciones biológicas distintivas, así como la capacidad de modificación mediante reacciones químicas [73]. Los grupos amino pueden protonarse en condiciones ácidas (el pKa de la amina es 6,3) [69]. Estas cargas positivas le permiten interactuar con diversos tipos de moléculas y con las membranas celulares cargadas negativamente de los microorganismos (actividad antimicrobiana). Se cree además que estas cargas son las responsables de la actividad hemostática del Q [68,72].

5.2. Propiedades biológicas del quitosano

Las excelentes propiedades de este polisacárido han potenciado su uso como alternativa a los polímeros sintéticos disponibles [73]. Además de sus propiedades químicas, el Q muestra diversas propiedades biológicas [12,68,72-76]:

1. Biocompatible:
 - i. Polímero natural
 - ii. Seguro y no tóxico
 - iii. Biodegradable
2. Posee un efecto regenerador en el tejido conectivo

3. Acelera la formación de osteoblastos responsables de la formación de huesos
4. Hemostático
5. Espermicida (para control de la natalidad)
6. Antitumoral (inhibe el crecimiento de células o tumores)
7. Anticolesterolémico (reduce el colesterol)
8. Inmunoadyuvante (implicado en la mejora de la respuesta inmune)
9. Antimicrobiano
10. Mucoadhesivo (capaz de unirse a las membranas mucosas).

5.3. Aplicaciones del quitosano

Las excelentes propiedades antes mencionadas, además de su abundancia y bajo costo, hacen que el Q sea utilizado en una amplia gama de campos que incluyen biotecnología, medicina (como sistema de liberación controlada de fármacos, antimicrobiano y cicatrizante de heridas), ingeniería de tejidos y cosmética. Otros usos farmacéuticos incluyen su uso como agente aglutinante, disgregante, como polímero de recubrimiento y liberación de genes en el sector biomédico [5,69]. También se lo utiliza para tratamientos de agua y aguas residuales, debido a su capacidad de adsorción que permite la eliminación de colorantes o iones metálicos. Se lo usa ampliamente en la industria alimentaria, como agente clarificante y antioxidante en jugos, antioxidante en salchichas o en forma de films antimicrobianos; y en agricultura, como recubrimiento de semillas y de hojas, en fertilizantes y fertilización o fumigación sostenida en el tiempo [68,70,76]. Además, se usa para la administración transmucosa de péptidos y proteínas ya que es mucoadhesivo y tiene la capacidad de abrir las uniones estrechas entre las células epiteliales. Consecuentemente, el Q facilita el transporte de fármacos macromoleculares [5,12,70,72].

5.4. Formulaciones del quitosano

En lo que respecta al uso en liberación controlada de fármacos, el Q se puede procesar fácilmente y se lo puede utilizar para preparar una amplia variedad de formulaciones y sistemas de diferentes formas y tamaños (macro, micro y nano) que incluyen: geles, polvos, perlas, películas o membranas, comprimidos, cápsulas, esferas, esponjas y fibras [5,69]. En la literatura existen muchas revisiones que examinan cientos de artículos relacionados con los sistemas de administración de fármacos de Q [5,68,73-75], y los hidrogeles representan un área de investigación en continuo crecimiento [69]. Sus propiedades únicas, como formación *in situ*, mucoadhesión, carácter hidrofílico y mejora de la permeación, hacen que sean muy estudiados como matriz en sistemas de administración de fármacos [68].

Nuestro grupo de trabajo tiene experiencia en el diseño de sistemas de liberación basados en Q. Se ha estado trabajando en parches transdérmicos [77], membranas [78], partículas [79] y geles [80,81] para la administración de hormonas y drogas oncológicas.

6. LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS

Aunque, desde hace años, la investigación farmacéutica se centra en la búsqueda de nuevas moléculas que den respuesta terapéutica a las enfermedades antiguas y a las de aparición reciente, no descuida la búsqueda de nuevas formulaciones que optimicen la liberación de las drogas y por lo tanto su actividad [75]. Esta búsqueda, que supone también un claro beneficio para el paciente, incluye hallar nuevas formas de administración que optimicen la actividad terapéutica al [10,69]:

- Aprovechar totalmente la cantidad de fármaco administrado y reducir la dosis del ingrediente farmacéutico activo incluido en el medicamento.
- Disminuir o eliminar el riesgo de efectos no deseados de los medicamentos, ya sean secundarios o tóxicos.
- Mejorar la dosificación, es decir buscar la vía de administración más cómoda y reducir el número de tomas o aplicaciones por día.

Debido al creciente interés en lograr estos objetivos, se han desarrollado diversos soportes que permiten liberar fármacos de forma controlada e incluso vectorizada [10,82].

6.1. Hidrogeles

Los hidrogeles están compuestos por redes reticuladas con un alto número de grupos o dominios hidrófilos que tienen una alta afinidad por el agua [75,83]. Sin embargo, estas cadenas de polímero son insolubles en agua en condiciones fisiológicas debido a los enlaces químicos o físicos formados entre ellas. Cuando el agua penetra en las redes causa su hinchazón, lo que le da la forma al hidrogel y le otorga cierto grado de integridad estructural y elasticidad [69,84]. Al mismo tiempo, el alto contenido de agua (entre 70-99%), hace que la consistencia blanda y gomosa sea una propiedad común a la de los tejidos biológicos [75,85].

Los hidrogeles tienen además la capacidad de encapsular fácilmente fármacos hidrófilos y como típicamente se forman en soluciones acuosas, el riesgo de desnaturalización y agregación del fármaco por la exposición a disolventes orgánicos se minimiza [69,75,83]. La bioadhesividad mejora el tiempo de residencia del fármaco y la permeabilidad del tejido. Esta propiedad adhesiva se debe a puentes intercatenarios entre los grupos funcionales del polímero de hidrogel y las glicoproteínas mucosas, que pueden ayudar a mejorar la unión

específica a regiones del colon, la nariz y la vagina [69]. Además son relativamente deformables y se ajustan fácilmente a la forma de cualquier espacio al que están confinados [75,83].

Los geles que exhiben una transición de fase en respuesta a cambios en condiciones externas como el pH, la fuerza iónica, la temperatura y las corrientes eléctricas se conocen como geles "sensibles a los estímulos" o geles "inteligentes" [84,85]. Estos sistemas se pueden inyectar en forma líquida y experimentar una transición solución-gel dentro del cuerpo humano, por ejemplo por el cambio de temperatura cuando toma contacto con el cuerpo (37 °C). Los sistemas de formación de geles *in situ* basados en la variación de temperatura muestran ciertas ventajas, por ejemplo no requieren la presencia de disolventes orgánicos, agentes de entrecruzamiento o agentes externos para el inicio de la transición [86]. Dicha transición ocurre en respuesta al aumento de la temperatura desde el ambiente hasta la temperatura fisiológica y los hidrogeles resultantes adquieren la forma del espacio disponible en el sitio de inyección [5,75].

6.1.1. Hidrogeles basados en quitosano

Dentro de los hidrogeles termosensibles de formación *in situ*, los basados en Q combinados con una sal de poliol (β -glicerofosfato de sodio (GP) o monooleato de glicerilo) están siendo estudiados. El tiempo de transición solución-gel depende de la concentración y del grado de desacetilación del polímero, la temperatura, el pH de la solución final y la concentración de la sal de poliol [86,87].

Los mecanismos propuestos, por los cuales se obtiene el gel durante la transición son varios. Algunos autores reportan que en las mezclas Q/GP, cuando hay un aumento de la temperatura, ocurre una transferencia de protones del Q al GP produciendo una neutralización del Q, y como consecuencia, la formación de un gel físico debido al establecimiento de fuerzas atractivas entre las cadenas [86]. La hidratación/deshidratación de las cadenas de Q también está involucrada en la formación del gel: a baja temperatura, la fuerte interacción del polímero con el agua evita la interacción entre cadenas; pero cuando se calienta, las cadenas de polímero pierden el agua de hidratación y la unión entre las cadenas produce la formación de gel debido a un fortalecimiento de las interacciones hidrofóbicas [86].

Desde la aparición de estos hidrogeles, se han realizado varios intentos para mejorar sus propiedades, centrándose en su preparación y caracterización [15,16,89-91] y en la mejora de las capacidades de los hidrogeles como sistema de administración controlada de fármacos [92,93]. Por ejemplo, Ruel-Gariépy y colaboradores y Cho y colaboradores

estudiaron las propiedades físicas de soluciones de Q utilizando GP como entrecruzante y la optimización de las mismas [89,91]. Por su parte, Peng y colaboradores reportaron la optimización de hidrogeles termosensibles de Q/GP para la administración sostenida de un antidepresivo (clorhidrato de venlafaxina) [93], mientras que Kim y colaboradores reportaron la optimización de estos hidrogeles para la administración de un antioxidante (ácido elágico) como tratamiento para el cáncer [92].

Durante el desarrollo de esta tesis, se trabajó en la puesta a punto de un sistema base de hidrogel de Q/GP de formación *in situ* [94], que pueda utilizarse como plataforma para la liberación de distintas drogas. Este sistema ya ha sido evaluado con éxito como sistema gel con micropartículas de ácido poli(láctico-co-glicólico), para liberación de paclitaxel como tratamiento intratumoral y adyuvante en ratones BALB/c desafiados con células del adenocarcinoma de mama M-234p [80,81].

7. DISEÑO EXPERIMENTAL

Una manera muy efectiva de mejorar el valor de la investigación y disminuir el tiempo de experimentación es llevar a cabo un proceso de optimización a través de la utilización de un diseño experimental. Como un resultado (o respuesta) puede estar influenciado por una amplia variedad de factores, se realiza un *screening* preliminar en las etapas iniciales del diseño experimental, a fin de determinar los factores que tienen un efecto significativo en la respuesta. La siguiente etapa es el proceso de optimización para encontrar las condiciones que producen el mejor resultado o el resultado más cercano al deseado. De esta manera, los experimentos pueden ser planificados de modo tal de obtener la mayor información posible con el menor número de experiencias y así alcanzar los objetivos propuestos [95,96].

7.1. Etapa de Screening

Para la elección de los factores² y sus niveles³ es necesario conocer el proceso completo. Tal conocimiento suele ser una combinación de experiencia práctica y comprensión teórica. A fin de recopilar los datos y definir los factores que afectan a la función objetivo existen distintos tipos de experimentos que se pueden realizar en esta etapa. Estos pueden ser:

- Factorial Completo a 2 niveles (2^k) donde k es el número de factores.

² Factor: Variable independiente que es estudiada en el experimento que se considera que pueden afectar a la respuesta. Se puede fijar a un nivel dado y puede ser cualitativa o cuantitativa.

³ Nivel: Valor que puede tomar el factor a estudiar en el diseño experimental.

- Factorial Fraccionado (2^{k-p}) donde el número de experimentos se reduce a la mitad con respecto al diseño completo de acuerdo con el número p .
- Plackett-Burman, son diseños factoriales fraccionados a 2 niveles utilizados para estudiar muchos factores. Tienen como supuesto que no debe haber interacciones entre los factores. Solo los efectos principales son calculados con un número reducido de experimentos [97].

7.2. Etapa de optimización

Una vez que se determinaron los factores responsables del experimento, así como sus interacciones, la siguiente etapa a realizar es el proceso de optimización, donde se van a conocer los valores de los factores que proporcionan la respuesta buscada. Existen dos tipos de optimizaciones que se pueden llevar a cabo en esta etapa:

- Optimización Simultánea: se construye un diseño experimental y, con un modelo matemático a través del Método de Superficie de Respuesta se estudia la relación entre las respuestas y los factores. Los diseños experimentales utilizados en estos casos son: Factorial Completo para 3 o más niveles, Central Compuesto, Box-Behnken, Diseños de Mezclas, entre otros.
- Optimización Secuencial: se basa en un diseño inicial de experimentos con sus respectivas mediciones y obtención del resultado, a partir de los cuales se diseña otra serie de experiencias hasta encontrar el punto óptimo. El diseño experimental que se utiliza para este análisis es el método Simplex. Un Simplex es una figura geométrica con $(k+1)$ vértices, donde k es el número de factores en un dominio experimental de dimensión k .

Mientras que el método Simplex permite sólo llegar a los alrededores del máximo, los métodos como los de Superficie de Respuesta permiten determinarlo con exactitud.

Finalmente, una vez que se construyó un modelo y se obtuvieron los gráficos de las superficies de respuesta, se procede a la *optimización* propiamente dicha. Este proceso puede realizarse en forma *gráfica* o *numérica*. La superposición de las curvas de contorno de cada respuesta individual permite estimar la solución conjunta siempre que el número de respuestas y factores no sea demasiado grande. Cuando el número de respuestas y variables es mayor a dos, la optimización gráfica se vuelve poco práctica y difícil de interpretar. En estos casos, para optimizar respuestas múltiples, la optimización numérica mediante la utilización de la Función Deseabilidad es una alternativa. Esta función combina

las respuestas individuales en una única función compuesta que luego será maximizada [97].

7.2.1. Función Deseabilidad

La Función Deseabilidad se utiliza ampliamente en la industria y se basa en la idea de que la calidad de un producto o proceso que tiene muchas características es completamente inaceptable si una de esas características está fuera del límite "deseable". Su objetivo es encontrar las condiciones experimentales que garanticen el cumplimiento de los criterios de todas las respuestas implicadas y, al mismo tiempo, proporcionar el mejor "valor de la respuesta deseable" (óptimo) para todas las variables evaluadas [95].

Para eso se define una función de deseabilidad individual (d_i) para cada una de las variables de respuesta, y a partir de estas últimas se define una deseabilidad global (D) que varía entre 0 y 1, siendo: 0 menos deseable y 1 más deseable. Dependiendo del criterio de optimización prefijado se elegirán las condiciones experimentales que produzcan las respuestas más deseables. Sin embargo, esto no necesariamente implica que el valor de D sea igual a 1. La elección debe ser criteriosa, basándose en el conocimiento previo del sistema de estudio, recordando que el objetivo es obtener respuestas óptimas y no valores de deseabilidad de 1 [97].

/ OBJETIVOS

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo es preparar un sistema de liberación controlada que comprenda una matriz polimérica y complejos de inclusión ciclodextrina-fármaco hidrofóbico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener complejos de inclusión fármaco hidrofóbico/ciclodextrina y optimizar su preparación.
- Caracterizar los complejos de inclusión.
- Preparar matrices poliméricas a base de quitosano que contengan los complejos de inclusión.
- Estudiar *in vitro* la liberación de los fármacos desde los sistemas complejo-matriz.
- Realizar experimentos para evaluar toxicidad y eficacia de los sistemas complejo-matriz.

**CAPÍTULO 1 / COMPLEJOS DE
INCLUSIÓN
DE PACLITAXEL**

CAPÍTULO 1

COMPLEJOS DE INCLUSIÓN DE PACLITAXEL

1.1. INTRODUCCIÓN

Como se mencionó en la introducción del presente trabajo, el paclitaxel (PTX) es un agente antitumoral muy eficaz que presenta baja solubilidad acuosa (0,34 mg/L o 0,4 μ M) [3,4]. Por este motivo, la primer formulación comercial de PTX (Taxol[®]) para la administración intravenosa que se desarrolló (y aún se emplea), utiliza un vehículo no acuoso que contiene Cremophor[®]EL/etanol, el cual puede causar reacciones alérgicas graves, hipersensibilidad, neurotoxicidad, y la precipitación en dilución acuosa [10,11]. Aunque actualmente existen otras formulaciones de PTX que mejoran su solubilidad, evitando al mismo tiempo el uso del Cremophor[®]EL/etanol, están lejos de ser totalmente satisfactorias.

La gran eficacia de esta molécula contra una amplia gama de tumores malignos hace que las investigaciones para encontrar una fórmula alternativa de PTX, que sea estable y fácil de utilizar en la práctica clínica, sigan en aumento [1,92]. Se reportaron distintos estudios para alcanzar este objetivo, como por ejemplo los que utilizan CDs. Estos trabajos demostraron la viabilidad de realizar complejos de PTX/CDs sin pérdida de actividad del PTX [2,4,5,11,48-53], aunque aún restan refinar muchos detalles para obtener una formulación exitosa.

1.2. OBJETIVOS

Los objetivos específicos para este capítulo fueron:

- Realizar un estudio de Diagrama de Solubilidad de Fases de PTX con CDs.
- Seleccionar los componentes y las condiciones de preparación de complejos de inclusión PTX/CDs.
- Preparar y caracterizar los complejos de inclusión.

1.3. MATERIALES Y MÉTODOS

1.3.1. Materiales

El PTX (Paklitaxfil[®]) fue adquirido en Filaxis.

La β -ciclodextrina metilada al azar (RAME β -CD) con un grado de sustitución (GS) de 12,6 fue comprada en Cyclolab (Hungría).

El agua utilizada durante todo el trabajo fue producida con un sistema de purificación Milli-Q® (Millipore, EE.UU.). El etanol (EtOH), el ácido cítrico y el diclorometano (DCM) fueron de grado analítico (Cicarelli). El metanol (MeOH) y el acetonitrilo (ACN) fueron de calidad cromatografía líquida (Merck).

El bromuro de potasio (KBr) de calidad analítica fue adquirido en Anedra. La polivinilpirrolidona (PVP) de calidad analítica (peso molecular: 40000 g/mol), fue adquirida en Sigma-Aldrich®.

El agua deuterada (D₂O) 99,8 % D utilizada para los estudios de ¹H-RMN fue adquirida en Sigma-Aldrich®.

La solución reguladora de fosfatos (PBS) se preparó disolviendo 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 0,2 g de KH₂PO₄ y 1,44 g de Na₂HPO₄·2H₂O en 1 L de agua. Todas las sales fueron de grado analítico (Anedra).

1.3.2. Cuantificación de paclitaxel

La cuantificación de PTX se realizó mediante dos métodos: cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y espectroscopía UV.

1.3.2.1. Cromatografía líquida de alta resolución

Se desarrolló un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para cuantificar la cantidad de PTX, basado en el descrito por Lee y colaboradores [99]. Se utilizó un equipo HPLC Shimadzu LC-20A, con detector de arreglo de diodos e inyector automático. La separación cromatográfica se llevó a cabo utilizando una columna Hichrom Ultrasphere® C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm de tamaño de poro) (Hichrom). Se trabajó durante todos los ensayos a una temperatura de la columna constante (25 °C). Se utilizó como fase móvil (FM) una solución de ACN y H₃PO₄ 0,1 % v/v en una relación 55:45 (v:v), con un caudal de 1,3 mL/min. La detección se realizó mediante absorción UV a 227 nm.

Se disolvió PTX en un volumen determinado de MeOH para preparar una solución madre de 300,0 µg/mL. A fin de verificar la linealidad del método en el rango de 1,0 a 100,0 µg/mL se prepararon, por dilución de la solución madre en FM, soluciones de calibrado a seis niveles de concentración, las cuales se inyectaron por triplicado (1,0; 5,0; 25,0; 50,0; 75,0 y 100,0 µg/mL de PTX).

1.3.2.2. Espectroscopía UV

Para cuantificar la cantidad de PTX mediante espectroscopía UV se utilizó un espectrómetro UV-VIS Perkin-Elmer Lambda 35. La detección se realizó mediante absorción UV a 227 nm.

Se disolvió PTX en un volumen determinado de MeOH para preparar una solución madre de 300,0 µg/mL. A fin de verificar la linealidad del método en el rango de 0,25 a 40,0 µg/mL se prepararon, por dilución de la solución madre en EtOH, soluciones de calibrado a siete niveles de concentración, las cuales se midieron por triplicado (0,25; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 25,0 y 40,0 µg/mL de PTX).

1.3.3. Diagrama de solubilidad de fases

Se siguió la metodología descrita por Higuchi y Connors [45] para obtener los diagramas de solubilidad de fases (DSF). Se colocó una cantidad fija en exceso de PTX y cantidades crecientes de RAMEβ-CD (0 - 100 mM) en un solvente dado: agua ultrapura, mezcla H₂O:EtOH 50 % v/v o mezcla PBS:EtOH 50 % v/v. Las distintas soluciones se almacenaron en estufa a 37 °C, con agitación orbital (100 rpm) durante 72 horas. Al alcanzar el equilibrio, las soluciones se centrifugaron durante 40 minutos y los sobrenadantes se cuantificaron mediante espectroscopía UV. Cada experimento se realizó por triplicado. Con el promedio y el error de cada medición se realizó un gráfico de concentración del sustrato disuelto (PTX) en función de la concentración del *anfitrión* (RAMEβ-CD) para obtener los perfiles de DSF de cada condición evaluada.

Luego, se calculó el valor de la Constante de Estabilidad Aparente ($K_{1:1}$) utilizando el valor de la pendiente de los DSF obtenidos y de la solubilidad intrínseca del fármaco S_0 (en ausencia de CD). Higuchi y Connors [45] describieron la relación entre ambas variables mediante la siguiente ecuación:

$$K_{1:1} = \frac{\text{Pendiente}}{S_0 \cdot (1 - \text{Pendiente})} \quad \text{Ecuación 1.1}$$

Donde:

S_0 es la solubilidad intrínseca del PTX en ausencia de CD en el medio de inclusión acuoso en estudio.

Pendiente es la pendiente de la fracción lineal del DSF (curva Concentración de PTX vs Concentración de CD).

Además se calculó el parámetro propuesto por Loftsson y Brewster [35] denominado Eficiencia de Encapsulación (CE), el cual relaciona la concentración de CD que forma un

complejo y la CD libre. Este parámetro se obtiene utilizando la pendiente de la porción lineal de los DSF mediante la siguiente ecuación:

$$CE = \frac{\text{Pendiente}}{(1 - \text{Pendiente})} \quad \text{Ecuación 1.2}$$

1.3.4. Obtención de los complejos de inclusión

Se obtuvieron los complejos de inclusión (CI) de PTX con RAME β -CD mediante el método denominado *liofilizado* [4]. Los diferentes protocolos ensayados se muestran en la Tabla 5. Se probaron variaciones tanto en el tipo de solvente (EtOH, MeOH, DCM, PBS, agua) y sus combinaciones, como en las relaciones molares entre el PTX y la RAME β -CD.

Tabla 5. Condiciones de preparación de complejos PTX/RAME β -CD.

COMPLEJO	PTX:RAME β -CD (mol:mol)	SOLVENTE		Ac:Org (v:v)
		Ac	Org	
C1 _x	1:5	PBS	EtOH	50:50
C2 _x	1:20			
C3 _x	1:30			
C4 _x	1:1	H ₂ O	EtOH	50:50
C5 _x	1:5			
C6 _x	1:20			
C7 _x	1:20	H ₂ O	-	100:0
C8 _x	1:10	-	MeOH	0:100
C9 _x	1:10	-	EtOH	0:100
C10 _x ^a	1:20	-	DCM	0:100
C11 _x ^b	1:20	H ₂ O	EtOH	50:50
C12 _x ^c	1:20	H ₂ O	EtOH	50:50

a: con sonicador de punta, **b:** con PVP 1%, **c:** con ácido cítrico 1%;
PVP = polivinilpirrolidona, DCM = diclorometano

El protocolo consistió en disolver paralelamente una cantidad adecuada de PTX en el solvente orgánico (Org) y una cantidad proporcional de la RAME β -CD en agua en las relaciones molares: 1:1; 1:5, 1:10, 1:20 y 1:30 mol:mol⁴. Luego se mezclaron ambas soluciones y se agitaron durante 15 min con agitador magnético. Seguidamente se colocaron en baño ultrasónico (Cole-Parmer) durante 5 min y tras lo cual se eliminó el solvente Org bajo presión reducida a 50 °C con un evaporador rotatorio (Yamato). La solución obtenida se

⁴ En el caso de los complejos que no se realizaron con agua, todos los reactivos se disolvieron en el solvente Org, y en el caso de los complejos que se realizaron completamente en agua, todos los reactivos se disolvieron en este solvente.

centrifugó para eliminar el PTX no incluido⁵. El sobrenadante se congeló a -80 °C y se liofilizó durante 24 hs a 1 mbar de presión.

En el caso del complejo C_{10x} todos los sólidos se disolvieron en DCM, luego la solución se colocó en baño ultrasónico durante 15 min, se eliminó completamente el solvente Org bajo presión reducida y se agregó el mismo volumen de agua. Inmediatamente la solución acuosa se sonicó con un pulso de 30 seg y 100 % de potencia usando un procesador ultrasónico (Cole-Parmer de 130 watts). Luego la solución se centrifugó y se continuó con el protocolo base. En el caso de los complejos C_{11x} y C_{12x}, previamente a la obtención de la solución hidroalcohólica, se agregó a la solución acuosa de CD: polivinilpirrolidona 1 % y ácido cítrico 1 %, respectivamente. Luego se continuó con el protocolo descripto.

1.3.4.1. Determinación de la eficiencia de inclusión

El cálculo de la eficiencia de inclusión permite estimar la cantidad de PTX que fue incluido. Ya que en EtOH se disuelven tanto la droga libre como la incluida, mientras que en agua solamente se disuelve la droga incluida en la CD, se prepararon dos soluciones en estos solventes disolviendo la misma cantidad de CI. Luego, se analizaron separadamente y las absorbancias obtenidas se relacionaron con la curva de calibrado mencionada para calcular la concentración de PTX. Cada medición fue realizada por triplicado.

Mediante la Ecuación 1.3 se calcularon las eficiencias de inclusión (E_{PTX}):

$$E_{PTX} = \frac{C_{PTX-H_2O}}{C_{PTX-EtOH}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 1.3}$$

Donde:

C_{PTX-H_2O} es la concentración calculada (en $\mu\text{g/mL}$) a partir de la absorbancia obtenida en espectroscopía UV correspondiente al PTX presente en la muestra disuelta en agua.

$C_{PTX-EtOH}$ es la concentración calculada (en $\mu\text{g/mL}$) a partir de la absorbancia obtenida por espectroscopía UV correspondiente al PTX presente en la muestra disuelta en EtOH.

1.3.5. Caracterización de los complejos PTX/RAME β -CD

Se estudiaron y caracterizaron los CI mediante espectroscopía infrarroja, calorimetría diferencial de barrido, resonancia magnética nuclear de protones, resonancia magnética

⁵ En los complejos en los que no se utilizó agua se eliminó el solvente Org completamente hasta sequedad, luego se agregó un volumen de agua igual al volumen de solvente Org inicial para redissolver el polvo obtenido. La solución se centrifugó y se prosiguió con el protocolo indicado.

nuclear pulsada, dispersión de luz dinámica y microscopía electrónica de barrido como se describe a continuación.

1.3.5.1. Espectroscopía infrarroja

Se realizaron estudios de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) utilizando un espectrómetro FTIR-8201 PC (Shimadzu), en el rango de frecuencia $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ a una resolución de 8 cm^{-1} y 40 escaneos por espectro. Las muestras fueron preparadas en discos de KBr, previamente secado en estufa a 100 °C por 24 h para asegurar que los picos correspondientes al agua no interfieran con aquellos pertenecientes a los compuestos en estudio. A fin de obtener espectros más claros y definidos se ensayó cada componente en los discos de KBr en una concentración de 1 %. Se realizaron mediciones de los componentes puros (PTX y RAME β -CD), de las mezclas físicas y sus correspondientes complejos liofilizados en las relaciones molares: 1:10, 1:20 y 1:30.

1.3.5.2. Calorimetría diferencial de barrido

Se utilizó un calorímetro diferencial de barrido Mettler Toledo 822 (Mettler Toledo) para realizar el análisis térmico del PTX, la RAME β -CD, la mezcla física y el CI en las relaciones molares: 1:10, 1:20 y 1:30. Se colocó una porción de las muestras (4-13 mg) en cápsulas de aluminio, se sellaron y se realizaron las mediciones en atmósfera de nitrógeno. Se utilizó una rampa de calentamiento de $10\text{ °C}/\text{min}$ desde 25 °C hasta 300 °C .

1.3.5.3. Resonancia magnética nuclear

Se realizaron experimentos de RMN de protones (^1H -RMN) usando un espectrómetro Bruker AVANCE de 300 MHz. Las muestras (complejos liofilizados en las relaciones molares 1:10, 1:20 y 1:30) se disolvieron en D_2O a 25 °C . Se utilizó como referencia interna un corrimiento químico (δ) de 4,79 ppm para el D_2O .

1.3.5.4. Resonancia magnética nuclear pulsada

Las experiencias de RMN pulsada (RMNp) se realizaron en un analizador de protones Minispec Bruker BioSpin GMBH, operando con un cabezal protónico Bruker a la frecuencia de resonancia de 20 MHz.

Se realizaron determinaciones de tiempos de relajación espín-espín protónico T_2 (ms), de segundo momento M_2 (ms^{-2}) y de la intensidad de la señal A (volts) con ^1H -RMNp en muestras de cada componente puro (PTX y RAME β -CD), y de la mezcla física y el complejo liofilizado en las relaciones molares: 1:10, 1:15, 1:20 y 1:30. Para cada curva de Decaimiento de

Inducción Libre (FID, del inglés *Free Induction Decay*) se adquirieron puntos que son el promedio de 16 escanes. El ajuste de la señal se realizó con la siguiente ecuación [88,100]:

$$A(t) = A_r e^{\left(\frac{-a_r^2 t^2}{2}\right)} \frac{\text{sen } b_r t}{b_r t} + A_{mr} e^{\left(\frac{-a_{mr}^2 t^2}{2}\right)} \frac{\text{sen } b_{mr} t}{b_{mr} t} + A_{mo} e^{\left(\frac{-t}{T_{2mo}}\right)^{n_{mo}}} \quad \text{Ecuación 1.4}$$

Donde [101-105]:

$A(t)$ es la intensidad de señal total.

a es la desviación estándar de la forma de línea gaussiana que convolucionada con el espectro del protón rígido.

b es el ancho mitad de la correspondiente transformada de Fourier del espectro de RMN.

T_2 es el tiempo de relajación espín-espín protónico de la fracción de protones móviles.

A_r y A_{mr} es la amplitud de señal de las fracciones rígidas.

A_{mo} es la amplitud de señal de la fracción móvil.

Los parámetros a , b , T_2 , y A se obtuvieron del ajuste de los datos experimentales con la Ecuación 1.4. La amplitud de señal de las fracciones rígidas (A_r y A_{mr}) y de la móvil (A_{mo}) se obtienen a tiempo igual a cero. Cuando se habla de rigidez o movilidad de protones, se refiere a 3 poblaciones de protones que se corresponden a los términos de la Ecuación 1.4: el primer término ajusta a los protones rígidos (r), el segundo término a los protones menos rígidos (mr) y el último término a los protones algo móviles (mo).

El M_2 se calculó mediante la siguiente ecuación [88,106]:

$$M_2 = a^2 + \frac{b^2}{3} \quad \text{Ecuación 1.5}$$

1.3.5.5. Dispersión de luz dinámica

Las medidas de tamaño de las partículas se realizaron usando dispersión de luz dinámica (DLS) en un equipo Zetasizer Nano-ZS (Malvern). Las muestras se dispersaron en agua ultrapura y se analizaron en cubetas de poliestireno (dimensiones: 1,0 x 1,0 cm) a 25 °C de temperatura, irradiadas con un láser de He-Ne ($\lambda = 633$ nm). Se fijó el índice de refracción en 1,33 y la viscosidad en 0,8872 cP. Se detectó la intensidad de la luz dispersada con un ángulo de retrodispersión de 90° de los CI de PTX y la RAME β -CD pura. Se realizaron 11 corridas durante 10 segundos por triplicado. El equipo determina las fluctuaciones de intensidad de luz dispersada de las partículas iluminadas, y relaciona el movimiento browniano con el tamaño. Los datos fueron procesados mediante el software Zetasizer versión 6.2.

1.3.5.6. Microscopía electrónica de barrido

Las micrografías se realizaron mediante observación con un microscopio electrónico de barrido de escritorio Phenom ProX equipado con un software Phenom ProSuite. Las observaciones se realizaron bajo el modo de imágenes de electrones retrodispersados utilizando una tensión de aceleración de 15,0 kV.

Se realizaron observaciones de PTX, RAME β -CD, la mezcla física y los complejos de inclusión PTX/RAME β -CD relación molar 1:20.

1.4. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

1.4.1. Cuantificación de paclitaxel

Se llevaron a cabo dos métodos para cuantificar la cantidad de PTX: HPLC y espectroscopía UV.

1.4.1.1. Cromatografía líquida de alta resolución

Se confeccionó la curva de calibrado presentada en la Figura 8 utilizando los picos de elución obtenidos por HPLC de las soluciones patrones preparadas y sus respectivas concentraciones. Cada solución patrón se midió por triplicado. Los datos experimentales se ajustaron con un modelo lineal mediante el método de cuadrados mínimos. La ecuación de la recta de ajuste fue: $y = a + b * x$, donde y es la respuesta correspondiente al área del pico de PTX, a es la ordenada al origen, b es la pendiente y x la concentración de PTX expresada en $\mu\text{g/mL}$.

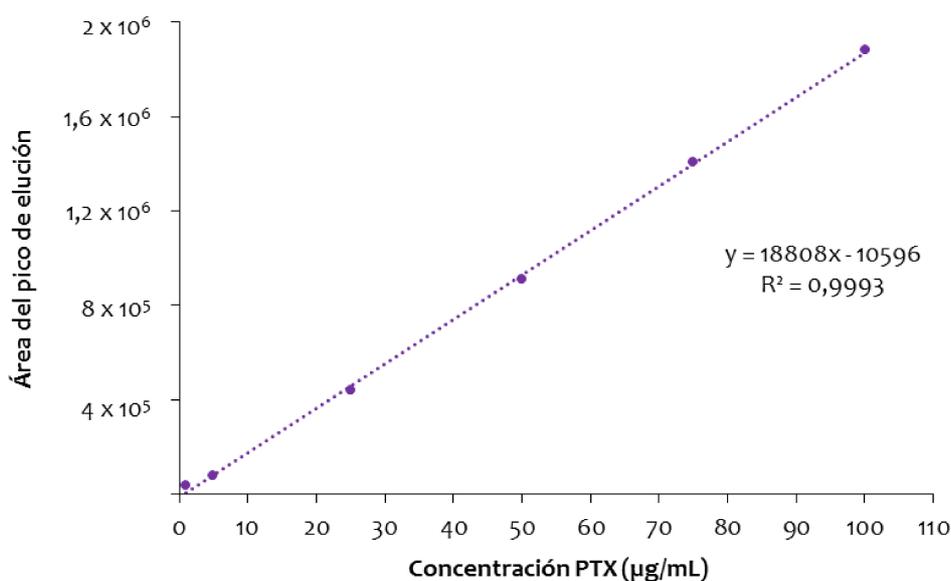


Figura 8. Curva de calibrado de paclitaxel obtenida mediante HPLC.

Para verificar la linealidad del método en el rango estudiado se realizó un análisis de la varianza (ANOVA), cuyos parámetros se muestran en la Tabla 6. Se presentan los parámetros *ordenada al origen* y *pendiente* con su correspondiente incertidumbre.

El estadístico R^2 indica que el modelo explica un 99,93 % de la variabilidad de la respuesta. El coeficiente de correlación es igual a 0,9997, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. Dado que el valor de probabilidad del modelo es inferior a 0,05, se puede concluir que existe una relación estadísticamente significativa entre el área de pico y la concentración de PTX para un nivel de confianza del 95,0 %.

Tabla 6. Parámetros estadísticos para el ajuste de variables concentración de PTX y área de pico de elución.

PARÁMETROS DE AJUSTE	VALOR
Ordenada al origen	$(-11 \pm 7) \times 10^3$
Pendiente	$(188 \pm 1) \times 10^2$
R^2	0,9993
Coefficiente de correlación	0,9997
Valor de probabilidad del modelo	0,0000

1.4.1.2. Espectroscopía UV

Asimismo, se obtuvo la curva de calibrado con las absorbancias de las soluciones patrones obtenidas mediante espectroscopía UV y sus respectivas concentraciones (Figura 9). De manera similar a lo realizado por HPLC, los datos experimentales (obtenidos por triplicado) se ajustaron con un modelo lineal mediante el método de cuadrados mínimos. La ecuación de la recta de ajuste fue: $y = a + b * x$, donde y es la respuesta correspondiente a la absorbancia de PTX, a es la ordenada al origen, b es la pendiente y x la concentración de PTX expresada en $\mu\text{g/mL}$.

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para verificar la linealidad del método en el rango estudiado. Se presentan los parámetros obtenidos en la Tabla 7, donde la *ordenada al origen* y *pendiente* se exhiben con su correspondiente incertidumbre. El modelo explica un 99,87 % de la variabilidad de la respuesta ($R^2=0,9987$). El coeficiente de correlación es igual a 0,9993, lo que indicaría que las variables presentan una relación relativamente fuerte entre ellas. El valor de probabilidad del modelo es inferior a 0,05, por lo que existe una relación estadísticamente significativa entre la absorbancia y la concentración de PTX para un nivel de confianza del 95,0 %.

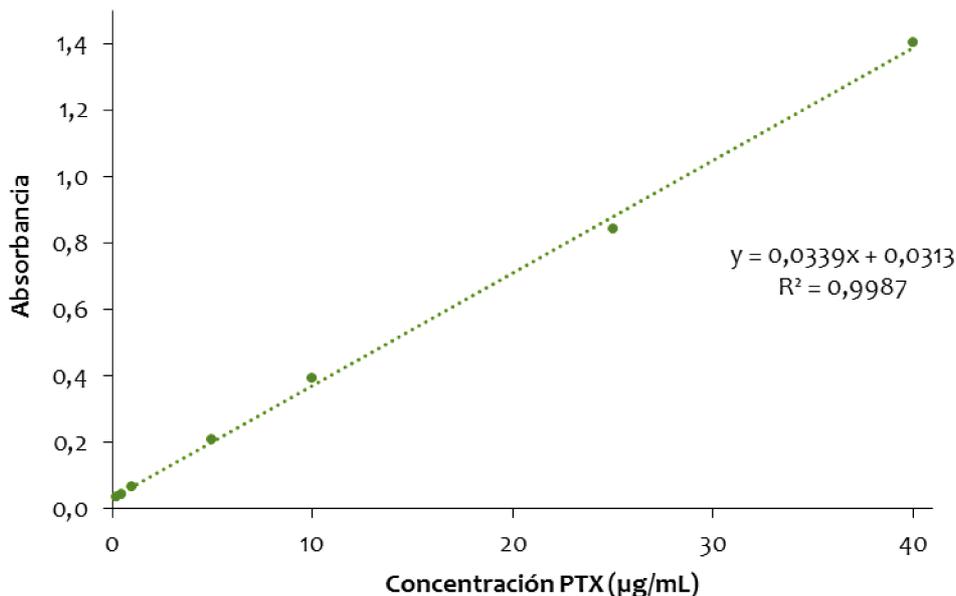


Figura 9. Curva de calibrado de paclitaxel obtenida mediante espectroscopía UV.

Tabla 7. Parámetros estadísticos obtenidos del ajuste de las variables concentración de PTX y absorbancia.

PARÁMETROS DE AJUSTE	VALOR
Ordenada al origen	$(3,1 \pm 0,5) \times 10^{-2}$
Pendiente	$(33,9 \pm 0,3) \times 10^{-3}$
R ²	0,9987
Coefficiente de correlación	0,9993
Valor de probabilidad del modelo	0,0000

1.4.2. Diagrama de solubilidad de fases

En la Introducción de este trabajo se mencionó que los DSF no verifican la formación de los CI [35], sin embargo, constituyen una herramienta útil para describir la manera en que aumenta la solubilidad del huésped cuando aumenta la concentración de CD [34]. Por ello, siguiendo el método de Higuchi y Connors [45], se obtuvieron los DSF del PTX con RAME β -CD en los solventes: agua ultrapura, una mezcla H₂O:EtOH 50 % v/v y una mezcla PBS:EtOH 50 % v/v. Los DSF para los diferentes solventes se presentan en la Figura 10.

En la Figura 11 se muestra el DSF ampliado del PTX con RAME β -CD en agua a 37 °C. Se observa que su comportamiento fue del tipo A_P, lo que indica la formación de complejos solubles en agua y que, cuando mayor es la concentración de la RAME β -CD, mayor es su capacidad de solubilizar el PTX. Este resultado coincide con el comportamiento observado por Hamada y colaboradores [107], quienes obtuvieron el DSF del PTX con dimetil- β -CD en agua a 25 °C en el mismo rango de concentraciones estudiado. Aunque no es exactamente la misma CD, su trabajo es útil para realizar una comparación, ya que la RAME β -CD que se utilizó en este estudio posee un grado de sustitución DS = 12,6; lo que la hace muy similar a

una CD dimetilada. Choi y colaboradores [53] obtuvieron también el DSF del PTX en agua a 25 °C con dimetil- β -CD, pero obtuvieron un diagrama del tipo A_L . Sin embargo, analizaron solamente concentraciones de CD entre 0 y 75 mM, lo que limitaría el análisis del comportamiento del PTX con la CD a concentraciones mayores. En este caso se observa que a partir de 40 mM la curva empieza a tener una tendencia exponencial. Por otro lado, Sharma y colaboradores [48] y Alcaro y colaboradores [49] obtuvieron diagramas lineales con PTX en agua a 25 °C para CDs metiladas (dimetil- β -CD; y dimetil y trimetil- β -CD; respectivamente), aunque en ninguno de los casos especifican el rango de concentraciones de CD en el que realizaron los ensayos.

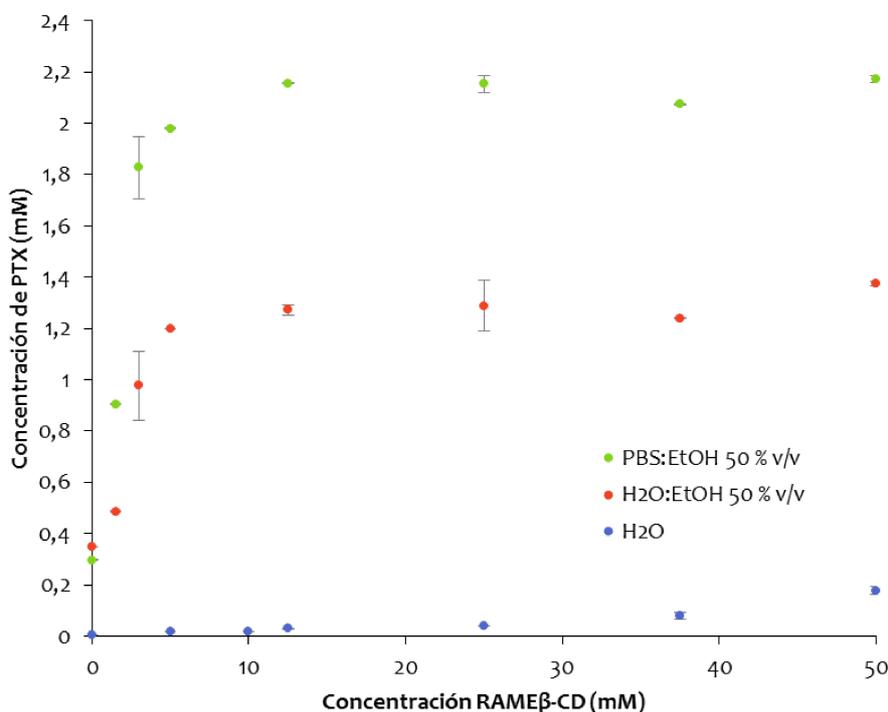


Figura 10. Diagrama de solubilidad de fases de PTX con RAME β -CD en: PBS:EtOH 50 % v/v (verde), H₂O:EtOH 50 % v/v (rojo) y H₂O (azul).

Los DSF del PTX con RAME β -CD en ambas mezclas hidroalcohólicas a 37 °C (Figura 10) mostraron un comportamiento del tipo B_s . Esto, según la clasificación de Higuchi y Connors [45], sugeriría la formación de complejos de inclusión de solubilidad limitada en agua. En la primera parte, la porción lineal corresponde al aumento de la solubilidad aparente del PTX a 37 °C, que luego alcanza una meseta en la cual se alcanza el límite de solubilidad de los complejos. A concentraciones mayores a estas, la solubilidad comenzaría a disminuir debido a la precipitación de los CI. Hasta el momento no se hallaron trabajos que reporten el comportamiento del PTX con la RAME β -CD en agua o utilizando una mezcla hidroalcohólica para obtener los DSF.

La porción lineal de los DSF obtenidos fue ajustada para calcular la Constante de Estabilidad Aparente ($K_{1:1}$) del PTX con RAME β -CD. Se presentan en la Figura 11 y 12 las gráficas y el ajuste para cada diagrama. Luego, se utilizó la Ecuación 1.1 para obtener los valores de $K_{1:1}$ que se presentan en la Tabla 8. Además se calculó la Eficiencia de Encapsulación (CE) utilizando la Ecuación 1.2, valores que se presentan también en la Tabla 8.

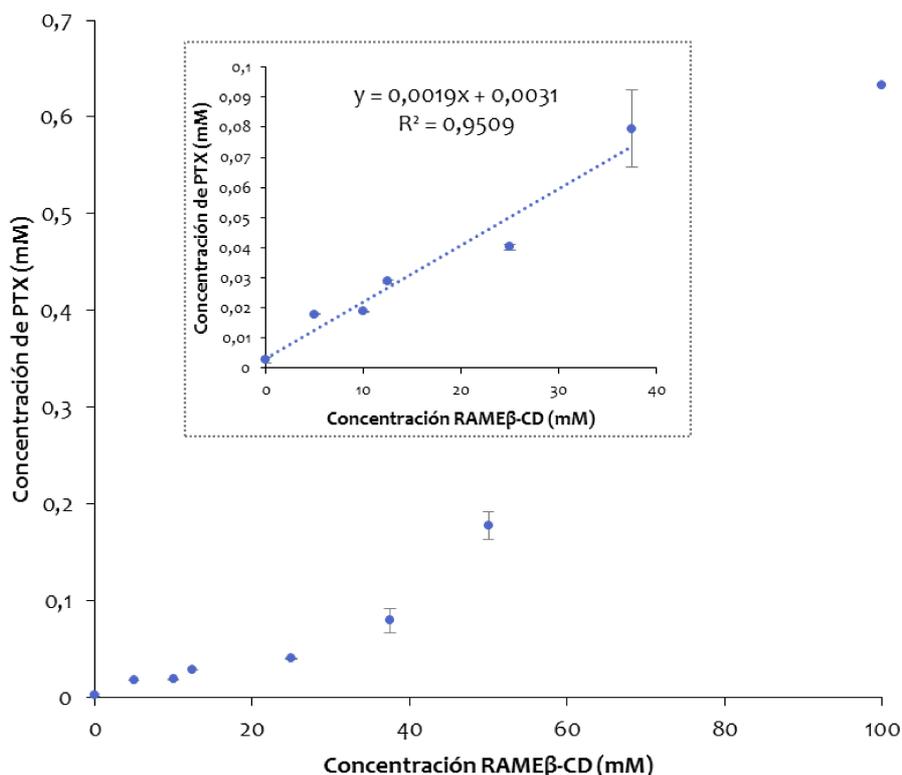


Figura 11. Diagrama de solubilidad de fases del PTX con RAME β -CD en agua ultrapura.

El valor de $K_{1:1}$ en agua fue bajo, indicando una afinidad débil entre PTX y la RAME β -CD en esas condiciones. Otros autores reportan constantes del mismo orden [48,49,53,107], como se muestra en la Tabla 9. Por otra parte, Loftsson y Brewster [35] describieron que cuando la porción orgánica del medio de inclusión aumenta, la constante aparente disminuye, ya que la polaridad del medio decrece (es decir, disminuye la constante dieléctrica ϵ). En ese trabajo, la constante dieléctrica disminuye de $\epsilon_{H_2O}=78,5$ a $\epsilon_{H_2O:EtOH\ 50\%}=55$. Por esa razón, la $K_{1:1}$ obtenida para la RAME β -CD en la mezcla $H_2O:EtOH$ ($640,89\ M^{-1}$) fue menor que la obtenida completamente en agua ($700,05\ M^{-1}$).

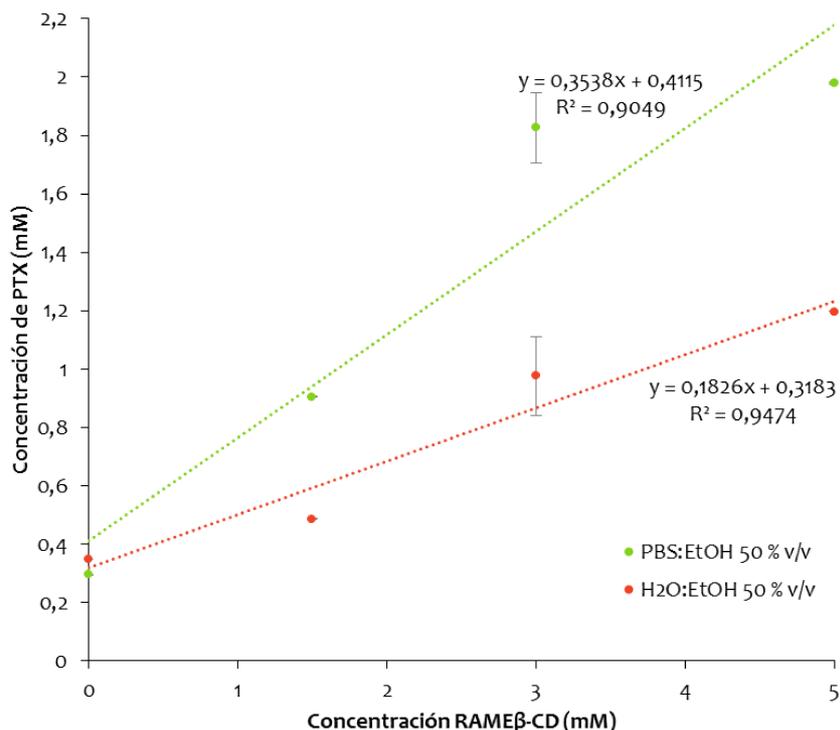


Figura 12. Diagrama de solubilidad de fases de PTX con RAMEβ-CD en PBS:EtOH 50 % v/v (verde) y H₂O:EtOH 50 % v/v (rojo).

Tabla 8. Resultados de cálculos de Constante de Estabilidad Aparente $K_{1:1}$ y la Eficiencia de Encapsulación CE.

DSF	CD	SOLVENTE		Ac:Org (v:v)	$K_{1:1}$ (M ⁻¹)	CE
		Ac	Org			
1 _x	RAMEβ-CD	H ₂ O	-	100:0	700,05 ± 93,25	0,0019 ± 0,0009
2 _x		H ₂ O	EtOH	50:50	640,89 ± 10,03	0,223 ± 0,001
3 _x		PBS	EtOH	50:50	1847,49 ± 26,11	0,548 ± 0,001

Se reportó que el agregado de pequeñas cantidades de sal mejora la solubilidad de ciertas drogas neutras en presencia de CDs. Tales aumentos pueden deberse a la formación de agregados entre la droga, el agua y la CD con intervención de la sal, lo que lleva a un aumento del valor de $K_{1:1}$ [35,108]. Esto explicaría el mayor valor de constante aparente obtenido para la mezcla PBS:EtOH (1847,49 M⁻¹) que para la mezcla sin sales H₂O:EtOH (640,89 M⁻¹).

Tabla 9. Valores de $K_{1:1}$ extraídas de otros trabajos.

HUÉSPED	CD	MEDIO	$K_{1:1}$ (M ⁻¹)	REFERENCIA
PTX (25 °C)	DM-β-CD	H ₂ O	23,70	Sharma y col. [48]
PTX (25 °C)	DM-β-CD	H ₂ O	129,36	Hamada y col. [99]
PTX (25 °C)	DM-β-CD	H ₂ O	241,85	Choi y col. [53]
PTX (37 °C)	DM-β-CD	H ₂ O	310	Alcaro y col. [49]

DM-β-CD= dimetil-β-CD

Los DSF permiten determinar la formación de complejos solubles, ya sea por la inclusión y/o la no inclusión del huésped en la CD, pero no permiten afirmar fehacientemente la formación de los mismos. Por eso, Loftsson y Brewster [35] propusieron el cálculo de CE, un parámetro que relaciona la concentración de CDs que forman complejos y la concentración de CDs libres, independizándose del valor de la solubilidad. Por consiguiente, la CE resulta más adecuada para la determinación del efecto solubilizante de las CDs [35]. El valor de CE obtenido para la RAME β -CD en la mezcla H₂O:EtOH (0,223) fue mayor al obtenido en agua ultrapura (0,0019), pero el mayor valor de CE fue el obtenido para la mezcla PBS:EtOH (0,548). Esto significa que, en el caso del agua por ejemplo, de cada 526 moléculas de RAME β -CD presentes, una molécula se encuentra formando complejos solubles en agua con PTX. En los casos de H₂O:EtOH y PBS:EtOH, son 1 de 5 y 1 de 3, las CDs que respectivamente forman complejos. Este resultado indicaría que el medio PBS:EtOH 50 % v/v sería el más eficiente para obtener los complejos de inclusión PTX/RAME β -CD.

1.4.3. Obtención de los complejos de inclusión en PBS:EtOH

En base a los resultados de los DSF se prepararon complejos de inclusión PTX/RAME β -CD de distintas relaciones molares en una mezcla PBS:EtOH 50 % v/v mediante el método de *liofilización*. Se disolvió RAME β -CD en PBS y PTX en EtOH, las soluciones se mezclaron y, luego de los pasos de agitación y sonicación, se eliminó el solvente orgánico. Finalmente, la mezcla resultante se liofilizó para obtener un producto sólido.

Al inicio de este trabajo de tesis, la determinación cuantitativa de PTX en las distintas muestras se realizó por la técnica analítica de HPLC. Sin embargo, luego del filtrado previo (filtros de 0,45 μ m) de las muestras disueltas en agua, se obtuvieron picos de elución con áreas muy pequeñas en comparación a los obtenidos para los complejos disueltos en fase móvil, lo que indicaba eficiencias de inclusión muy bajas (menores a 10 %). No obstante, ante la sospecha de la formación de los complejos y de la imposibilidad de cuantificarlos mediante HPLC, se llevaron a cabo diferentes técnicas a fin de verificar la presencia de los mismos.

1.4.3.1. Espectroscopía infrarroja

La espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) es un método que se utiliza para obtener información estructural, ya que se basa en los modos de vibración de una molécula. Cuando una muestra es irradiada por una fuente de energía IR se producen transiciones entre los niveles de energía que son muy sensibles a los detalles estructurales

de las moléculas, lo que permite obtener espectros muy útiles para la identificación de fármacos y otras sustancias orgánicas.

En algunos casos la formación de los CI puede demostrarse mediante espectroscopia IR. Cuando ocurre la inclusión de un compuesto, se produce un corrimiento o alteración de la intensidad de ciertas bandas características del espectro correspondiente al mismo. Sin embargo, a veces dichos cambios son muy sutiles y se ven apantallados por el espectro del *anfitrión*, debido a que el *huésped* representa un 5-15 % de la masa total del complejo. Es por esta limitación que se requiere una interpretación muy cuidadosa de los espectros obtenidos para extraer conclusiones con respecto a la formación de los CI [109].

La Figura 13 muestra los espectros FT-IR de cada componente: PTX y RAME β -CD, la mezcla física (MF) y el complejo liofilizado (CI) de cada relación molar (1:10, 1:20 y 1:30). La Tabla 10 resume los picos característicos del PTX y RAME β -CD y los que presentaron modificaciones en las MF y en los CI.

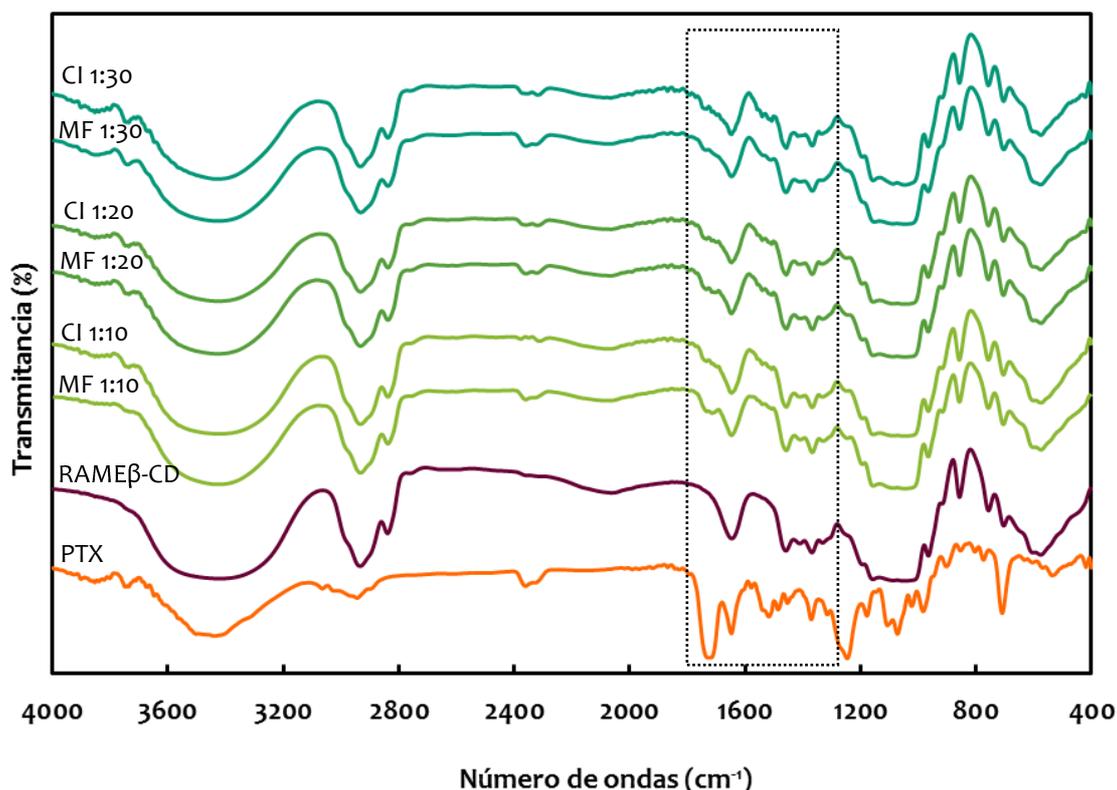


Figura 13. Espectros FT-IR de la PTX (naranja), la RAME β -CD (púrpura), la mezcla física (MF) y el complejo PTX/RAME β -CD (CI) en la relación: 1:10 (verde claro); 1:20 (verde oscuro) y 1:30 (celeste).

Se observaron las bandas características del PTX en coincidencia con lo reportado [110-113]. La ancha banda comprendida entre 3600 y 3200 cm⁻¹ corresponde al estiramiento de N-H y O-H. Las bandas exhibidas en la región alrededor de 3000 cm⁻¹ pueden asignarse a estiramientos C-H aromáticos. La región entre 2990-2870 cm⁻¹

corresponde al estiramiento simétrico y asimétrico $-CH_2$. En 1718 cm^{-1} se encuentra el estiramiento del grupo $-C=O$ del grupo éster, en 1647 cm^{-1} el estiramiento C-C de los anillos aromáticos, en 1371 cm^{-1} la flexión de CH_3 , en 1245 cm^{-1} el estiramiento de C-N, en 1072 cm^{-1} el estiramiento C-O, en 902 cm^{-1} los grupos C-H en el plano y en 709 cm^{-1} los C-H fuera del plano.

El espectro de la RAME β -CD también coincide con lo reportado en la bibliografía [2,114,115]. La banda intensa entre $3300-3500\text{ cm}^{-1}$ corresponde a la vibración de tensión del $-OH$, la vibración de los grupos $-CH$ y $-CH_2$ aparece en la región comprendida entre $2800-3000\text{ cm}^{-1}$ (2933 cm^{-1}) y en 2839 cm^{-1} se encuentran el pico correspondiente al grupo $-OCH_3$. En 1087 cm^{-1} se encuentra el pico del C-O-C y en 1047 cm^{-1} el pico correspondiente a C-O-H.

Tabla 10. Frecuencias de absorción características de los espectros FT-IR del PTX, RAME β -CD, MF y CI.

GRUPO FUNCIONAL	FRECUENCIA (cm^{-1})							
	PTX	RAME β -CD	Relación 1:10		Relación 1:20		Relación 1:30	
			MF	CI	MF	CI	MF	CI
O-H	3600-3200 (+ N-H)	3427	3425	3421	3425	3421	3425	3423
=C-H	3064							
$-CH_3, -CH_2$	2945; 2902							
$-CH, -CH_3$		2933	=	=	=	=	2931	=
$-OCH_3$		2839	2837	2837	2837	2837	2837	2837
C=O	1718		1715↓	↓↓	1714↓	↓↓	1714↓	↓↓
C-C	1647		=	=	=	=	=	=
CH_3	1371							
C-N	1245							
C-O-C		1087	=	=	=	=	=	=
C-O	1072							
C-O-H		1047	=	=	=	=	=	=
C-H en el plano	902							
C-H fuera del plano	709		705	705	705	705	703	703

↓: disminuyó en intensidad; = permaneció igual en intensidad y frecuencia

En la región entre 1780 y 1250 cm^{-1} (recuadrada en la Figura 13), se observaron cambios en los espectros de las MF y de los CI. La banda de estiramiento del carbonilo del PTX a 1718 cm^{-1} se desplazó ligeramente y se redujo tanto en las MF como en los CI. No obstante, la reducción fue mayor en los CI que en las MF. También se observó un leve corrimiento del pico de estiramiento de los O-H en las MF (3425 cm^{-1}) y en los CI (3421 cm^{-1}). Como la estructura cristalina del PTX se caracteriza por una red de enlaces de hidrógeno que implica el éster carbonílico, el $2'$ -OH y el $3'$ -NH de la cadena lateral [49,112], los cambios en el espectro IR podrían evidenciar la ruptura y/o formación de este tipo de enlaces como

consecuencia de la interacción del PTX con la CD [49,53,112,113], ya sea por formación de los complejos de inclusión o no inclusión.

También se observó para todos los casos un leve corrimiento en el pico correspondiente al grupo OCH₃ y al C-H fuera del plano. Asimismo, no se observaron los picos a 3064, 2945, 2902, 1371, 1245, 1072 y 902 cm⁻¹ del PTX (ni en las MF ni en los CI) posiblemente como consecuencia de las altas señales de la CD que enmascararían estos pequeños picos. Aunque estos resultados indican cierta interacción entre el PTX y la RAMEβ-CD, son insuficientes para confirmar la formación de los CI en los protocolos ensayados.

1.4.3.2. Calorimetría diferencial de barrido

Se estudió el comportamiento térmico de los componentes puros PTX y RAMEβ-CD, de las MF y los CI en las relaciones molares 1:10, 1:20 y 1:30, a fin de verificar la formación de los CI. En la Figura 14 se presentan los termogramas obtenidos.

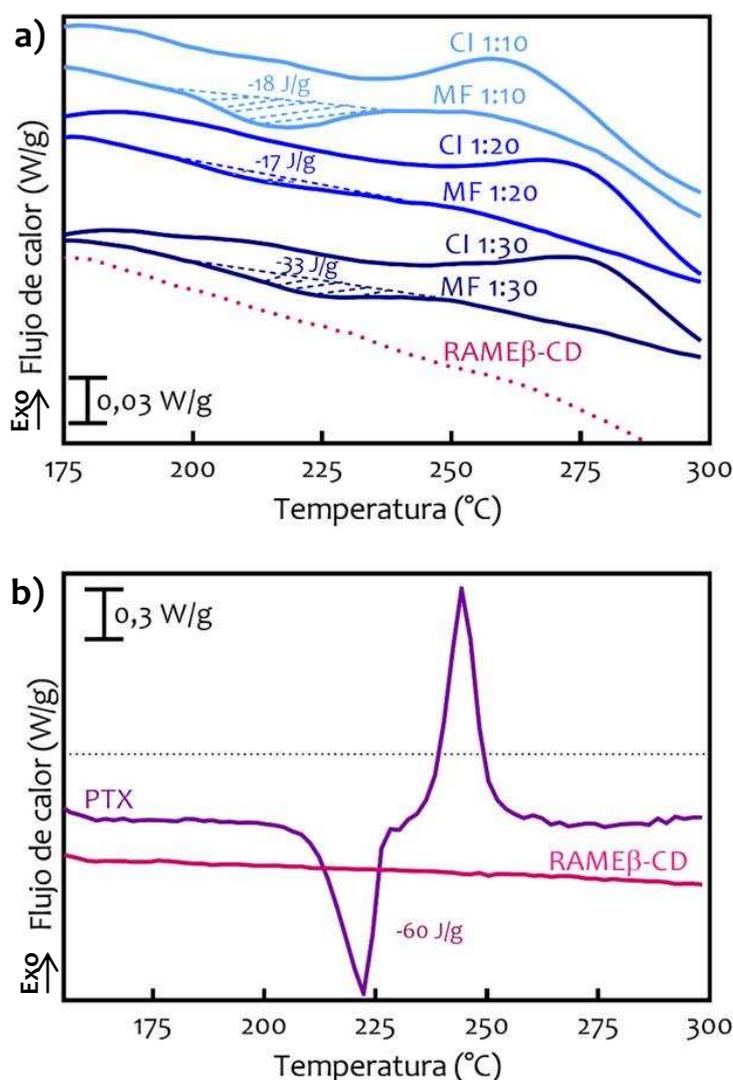


Figura 14. Termogramas obtenidos de experimentos de DSC: **a)** mezclas físicas (MF) y CI 1:10, 1:20 y 1:30, y RAMEβ-CD (rosado); **b)** PTX (lila) y RAMEβ-CD (rosado).

El termograma del PTX exhibió un único pico endotérmico a 222,3 °C y un pico exotérmico de degradación a 244,3 °C, resultados que concuerdan con lo reportado en bibliografía [4,53,54]. Por el contrario, el termograma de RAME β -CD no mostró picos en la región de 150-300 °C. Los termogramas de las MF mostraron un pico menor entre 212 y 225 °C, que corresponde a la fusión del PTX. La desaparición o disminución de la intensidad del pico endotérmico a 222,3 °C y del pico exotérmico a 244,3 °C en las MF podrían estar relacionadas con posibles interacciones entre el PTX y RAME β -CD a través de complejos de no inclusión [53] o podrían ser debidas a la gran cantidad de CD con respecto al PTX [4]. Sin embargo, el pico endotérmico correspondiente al PTX estuvo ausente en los termogramas de los CI, lo que indicaría la formación de complejos de inclusión. La inclusión del fármaco dentro de la cavidad de la RAME β -CD impediría la formación de PTX cristalino, y éste presentaría una estructura amorfa [11,53]. Estos resultados verificarían la inclusión del PTX dentro de la cavidad de la RAME β -CD.

1.4.3.3. Resonancia magnética nuclear

La resonancia magnética nuclear de protones (^1H -RMN) permite esclarecer las relaciones geométricas y la disposición (total o parcial) de la molécula *huésped* en el interior de la cavidad de las CDs a través del cálculo de los desplazamientos químicos que se producen como resultado de cambios en las señales de protones [109].

Se realizaron experimentos de ^1H -RMN en D_2O de los CI 1:10, 1:20 y 1:30 mol/mol PTX/RAME β -CD. Varios autores observaron, en CI de PTX con distintas CDs en D_2O , pequeños picos de resonancia en la región comprendida entre 7,5 y 8,5 ppm, correspondiente a los H aromáticos del PTX [4,11,116]. Sin embargo, en nuestro caso, no fue posible observarlos mediante esta técnica, probablemente debido a que el equipo utilizado para los experimentos posee una potencia de 300 MHz, mientras que los autores mencionados utilizaron equipos con potencias mucho mayores. Por este motivo se decidió realizar un estudio de RMN pulsada, como se describe a continuación.

A modo de ejemplo en la Figura 15 se presenta el espectro obtenido para el complejo 1:10 en D_2O (con supresión del pico del agua) en el que se resalta la región donde aparecerían los picos correspondientes a los protones aromáticos del PTX.

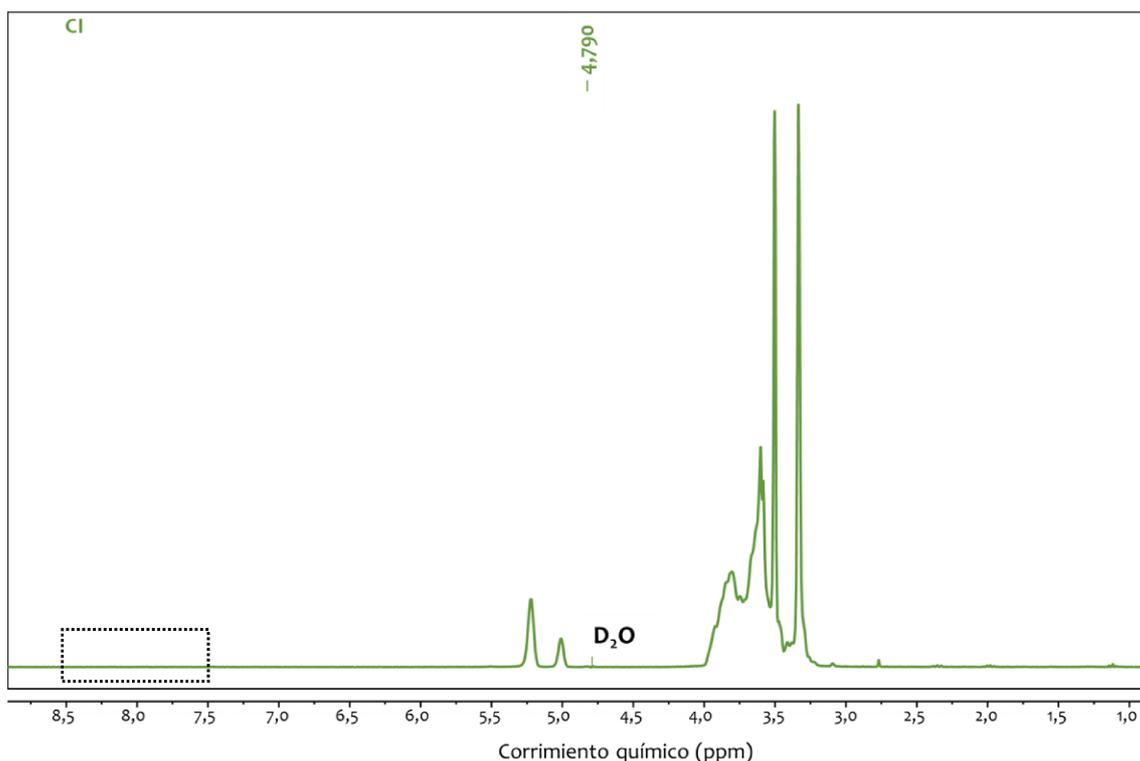


Figura 15. Espectro ^1H -RMN en D_2O del CI PTX/RAME β -CD 1:10 mol/mol.

1.4.3.4. Resonancia magnética nuclear pulsada

Los estudios de RMNp se realizaron con el fin de estudiar la movilidad protónica en las muestras. El tiempo de relajación espín-espín protónico (T_2) está asociado a la movilidad protónica y la intensidad de señal (A) es proporcional a la cantidad de protones.

A modo de ejemplo se muestran los resultados para la molécula de PTX, el resto de los resultados e información para la CD, las MF y los CI se puede consultar en el Anexo.

La estructura compleja del PTX posee 51 hidrógenos ($\text{C}_{47}\text{H}_{51}\text{NO}_{14}$). Se destaca un sistema tetracíclico polisustituído, con cuatro metilos y ocho funciones oxigenadas (Figura 16). Este sistema relativamente rígido exhibe cuatro cadenas laterales flexibles que pueden rotar libremente, lo que puede dar lugar a numerosas conformaciones.

En la Tabla 11 se muestra la clasificación, cuantificación teórica (%) y cuantificación experimental (% señal de RMNp) de los protones por unidad de PTX liofilizado. La intensidad de señal (A) es proporcional a la cantidad de protones y permitió cuantificar dicha cantidad para cada una de las poblaciones de protones: 80,44 % de protones rígidos, 18,58 % de protones menos rígidos y 0,98 % de protones móviles. Si bien la fracción de protones móviles es mínima, su término se mantuvo dado que permitía un mejor ajuste de la curva experimental de decaimiento con la Ecuación 1.4. No obstante, en el análisis la contribución de esta población de protones se sumó a la de los protones menos rígidos y se obtuvo un porcentaje total de 19,56 %. Esto se llevó a cabo debido a que el valor de T_2 fue

menor a la unidad de milisegundo (0,013 ms = 13 μ s). Los protones móviles en algunas ocasiones pudieron tener cierta movilidad y luego formar puentes de hidrógeno, quedando más restringidos. Es probable que entre 3'-NH y 2'-OH se formen y rompan algunos puentes de hidrógeno dando esa fracción de protones móviles. Por ejemplo, en sistemas de macromoléculas y primeras capas de agua (o incluso en el hielo), los protones forman puentes de hidrógeno y tienen un comportamiento inmóvil con valores de T_2 menores a 20 μ s [103-105], como es el caso de esta población. Por esta razón y por su menor proporción es que se incluyeron en la fracción de protones menos rígidos en lugar de considerarlos como móviles. Se tuvo la misma consideración para las otras muestras analizadas.

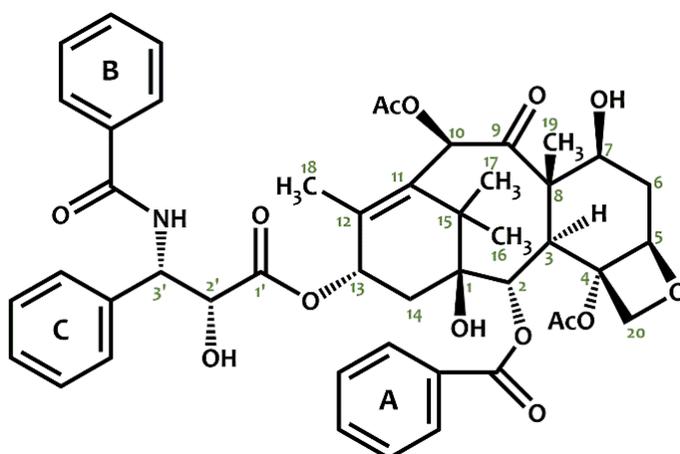


Figura 16. Estructura química del PTX.

Tabla 11. Clasificación y cuantificación de protones teóricos y experimentales del PTX.

PROTONES RÍGIDOS	CANTIDAD	CUANTIFICACIÓN TEÓRICA (%)	CUANTIFICACIÓN EXPERIMENTAL (%)
Unidos al cluster	14	27,45	
Unidos a grupos fenilos	15	29,41	
De los metilos	12	23,53	
Total	41	80,39	80,44
PROTONES MENOS RÍGIDOS	CANTIDAD	CUANTIFICACIÓN TEÓRICA (%)	CUANTIFICACIÓN EXPERIMENTAL (%)
De los acetilos	6	11,76	
De la amina en 3' y del hidroxilo en 2'	2	3,92	
De los hidroxilos en 1 y 7	2	3,92	
Total	10	19,61	19,56

Se observó que los valores de los porcentajes teórico y experimental fueron similares. Los protones rígidos no pueden caracterizarse por un valor de T_2 , sino que para monitorear su movilidad se utiliza el método de segundo momento (M_2). El M_2 permite obtener

conclusiones acerca de la movilidad de los protones inmóviles y es una medida de las interacciones dipolares. Si disminuye la densidad protónica puede ocurrir una reducción en el valor del M_2 , ya que las interacciones dipolares disminuyen con la sexta potencia de la distancia protón-protón [101].

En Tabla 12 se muestran los valores de cuantificación experimental (% señal de RMNp) de los protones rígidos y menos rígidos que componen cada muestra y los valores correspondientes de segundo momento (M_2).

Tabla 12. Valores de cuantificación experimental y de segundo momento de los protones rígidos y menos rígidos que componen las distintas muestras: PTX, RAME β -CD (liofilizada y no liofilizada), mezclas físicas (MF) y complejos de inclusión (CI).

MUESTRA	PTX		RAME β -CD		RAME β -CD no liof			
PROTONES	RÍGIDOS	MENOS RÍGIDOS	RÍGIDOS	MENOS RÍGIDOS	RÍGIDOS	MENOS RÍGIDOS		
CUANTIFICACIÓN EXPERIMENTAL (%)	80,44	19,56	78,18	21,82	81,41	18,59		
M_2 (ms ⁻²)	307,4	34,5	405,0	66,8	534,2	39,3		
MUESTRA	MF 1:10		MF 1:15		MF 1:20		MF 1:30	
PROTONES	RÍGIDOS	MENOS RÍGIDOS	RÍGIDOS	MENOS RÍGIDOS	RÍGIDOS	MENOS RÍGIDOS	RÍGIDOS	MENOS RÍGIDOS
CUANTIFICACIÓN EXPERIMENTAL (%)	51,69	48,31	71,12	28,88	70,78	29,22	43,94	56,06
M_2 (ms ⁻²)	706,5	51,2	766,5	106,5	731,8	100,6	920,5	143,2
MUESTRA	CI 1:10		CI 1:15		CI 1:20		CI 1:30	
PROTONES	RÍGIDOS	MENOS RÍGIDOS	RÍGIDOS	MENOS RÍGIDOS	RÍGIDOS	MENOS RÍGIDOS	RÍGIDOS	MENOS RÍGIDOS
CUANTIFICACIÓN EXPERIMENTAL (%)	66,22	33,78	66,77	33,23	78,92	21,08	80,00	20,00
M_2 (ms ⁻²)	775,7	111,8	730,1	104,1	507,2	4,2	507,2	1,2

El valor de M_{2r} (fracción rígida) para la RAME β -CD fue 405,0 ms⁻² y para el PTX fue 307,4 ms⁻². Si se cumpliera la premisa de que en una mezcla no ocurre una reacción química y cada uno de sus componentes mantiene su identidad y propiedades químicas, entonces el valor de M_2 para esta fracción de protones rígidos se debería situar entre 307,4 y 405,0 ms⁻². Sin embargo, se observa que el valor del M_{2r} para las cuatro MF es superior a los 700,0 ms⁻² (Tabla 12), de modo que supera ampliamente el valor que debiera dar una mezcla física sin ningún tipo de interacción. Esto implica, entonces, la existencia de algún tipo de interacción que se supone que no es de inclusión, es decir que ocurre en la parte externa de la CD y permite la formación de lo que se denomina complejos de no inclusión [35]. El PTX puede formar puentes de hidrógeno debido a la presencia de grupos hidroxilos y carbonilos en su estructura. La fracción menos rígida pierde movilidad y se vuelve un poco más rígida en la mezcla, ya que los valores de M_{2mr} de las mezclas en general superan a los valores de esa

fracción en los componentes puros. Esto también da indicio de algún tipo de interacción. La misma hipótesis permite explicar la razón por la cual la cuantificación teórica y cuantificación experimental de los protones para las MF no coincidieron (Anexo).

En las determinaciones para las muestras de los CI se obtuvieron, para las relaciones 1:10 y 1:15, valores de M_{2r} superiores a $700,0 \text{ ms}^{-2}$. Siguiendo el mismo razonamiento de las MF, se puede decir que existe algún tipo de interacción en la parte externa de la CD, es decir interacciones de no inclusión. Los valores de M_{2r} para los CI preparados en las proporciones 1:20 y 1:30 fueron evidentemente menores, de alrededor de $500,0 \text{ ms}^{-2}$.

Por otro lado, se realizaron mediciones de la CD no liofilizada. Si se comparan los valores M_{2r} de la CD no liofilizada con la CD liofilizada, se observa que en la primera el M_{2r} es mayor ($534,2 \text{ ms}^{-2} > 405,0 \text{ ms}^{-2}$). Esto se debe a que en la CD no liofilizada hay moléculas de agua y por lo tanto mayor densidad protónica que en la CD liofilizada. Además, esas moléculas de agua colaboran en la estructura cristalina de la CD no liofilizada [117], y dan rigidez a la molécula ubicándose tanto en el exterior como en su cavidad [118]. En la CD liofilizada la pérdida de las moléculas de agua supone la generación de un sólido amorfo [119] y la disminución del valor del segundo momento de la fracción más rígida. La diferencia en los valores de M_{2r} para los CI 1:20 y 1:30 y su similitud con el valor obtenido para la CD no liofilizada podrían deberse a la inclusión de parte de la molécula de PTX en la cavidad de la CD.

Alcaro y colaboradores [49] utilizaron programas computacionales y realizaron experimentos de modelado molecular para estudiar la interacción entre PTX y CDs con distintos grados de sustitución. Los parámetros de entrada para realizar las simulaciones tuvieron en cuenta descriptores geométricos capaces de indicar qué estructura de la molécula del PTX se puede incluir en la cavidad de la CD, y cuál es el lado de la cavidad en la que se produce la interacción. De hecho, la estructura voluminosa del PTX no puede ingresar completamente en la cavidad de la CD, y la formación del CI está limitada a alguno de los 3 anillos aromáticos: 2 presentes en la cadena lateral y el otro correspondiente al grupo benzoílo del sistema tetracíclico. Una de las CDs utilizadas en ese estudio fue la 2,6-dimetil- β -ciclodextrina, muy similar a la RAME β -CD que se utilizó en esta tesis. Dicha CD mostró, en los experimentos de modelado molecular, que el grupo fenilo en posición 3' del PTX es el que tiene preferencia de incluirse en la cavidad de la CD, ingresando por el borde más ancho. Esto ocurre debido a que la metilación de los hidroxilos primarios evita la formación del CI desde el borde más angosto. En los complejos formados con RAME β -CD estaría sucediendo algo similar: las primeras CDs en tomar contacto se posicionarían sobre el sistema tetracíclico y favorecerían que las siguientes CDs puedan interactuar con los

grupos más hidrofóbicos. Tal es el caso del fenilo en 3' para formar finalmente el CI. En la Figura 17 se presenta la interacción propuesta entre el PTX y la RAME β -CD en los CI.

Debido a la similitud entre los valores teóricos y experimentales obtenidos (protones rígidos: 78,52 y 78,92 %; protones menos rígidos: 21,48 y 21,08 %; respectivamente), la relación óptima entre el PTX y la RAME β -CD para la obtención de los CI es la de 1:20. En los complejos con más CD, el complejo se forma, pero el exceso de RAME β -CD favorece su agregación [35]. Esta es la razón por la cual aumenta la cuantificación de protones experimental con respecto a la teórica: para los CI 1:20 el aumento fue de 0,51 %, mientras que para los CI 1:30 y 1:40 fue de 2,13 % y 4,83 %, respectivamente.

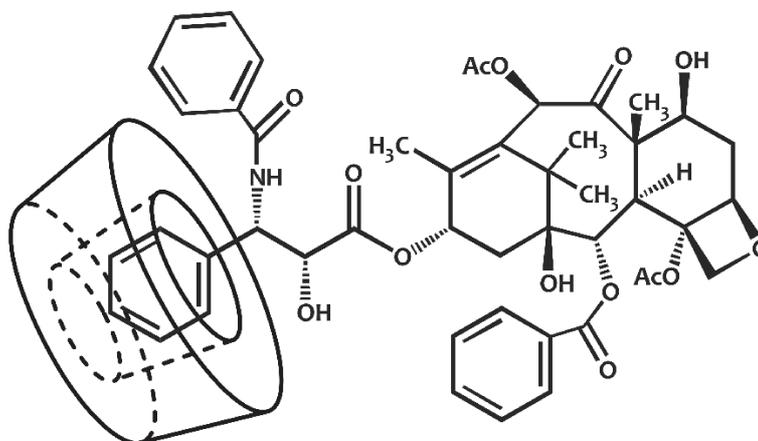


Figura 17. Interacción propuesta entre el PTX y la RAME β -CD en los CI PTX/RAME β -CD.

Por otra parte, como se mencionó, una disminución en el valor del M_2 ocurre por una disminución en la densidad protónica o un aumento en la movilidad. Este segundo fenómeno es el que genera la disminución en el valor de segundo momento de la fracción menos rígida (M_{2mr}). El M_{2mr} fue de 4,2 y 1,2 ms^{-2} para la relación 1:20 y 1:30, respectivamente. Las interacciones hidrofóbicas desestructuran produciendo mayor movilidad [103-105], por lo que el grupo fenilo hidrofóbico incluido en la cavidad estaría generando movilidad vibracional en los protones menos rígidos, disminuyendo la señal de los mismos.

1.4.3.5. Dispersión de luz dinámica

Se reportó que tanto las CDs como los CI pueden agregarse en solución formando grandes estructuras, y que estos agregados contribuyen a la solubilización de drogas lipófilas a través de la formación de complejos de no inclusión o estructuras similares a micelas [120]. Como consecuencia de los resultados obtenidos por RMNp, se sospechó que las diferencias halladas entre los resultados obtenidos mediante HPLC y espectroscopía UV en cuanto a las eficiencias de inclusión, podrían explicarse por la presencia de grandes estructuras que quedaban retenidas en el filtrado previo al análisis por HPLC y que no

necesariamente descartarían la formación de los CI. Por este motivo, se realizaron determinaciones de tamaño de partículas mediante dispersión de luz dinámica (DLS). Se disolvió una cantidad de muestra en agua ultrapurificada para medir los tamaños de los CI y de la RAME β -CD pura. Las mediciones se llevaron a cabo a 25 °C. Los resultados de diámetro hidrodinámico (D_h) basado en intensidad y de índice de polidispersidad (PDI) de las muestras con sus respectivos errores se presentan en la Tabla 13.

Tabla 13. Resultados de diámetros hidrodinámicos (D_h) e índice de polidispersidad (PDI).

MUESTRA	D_h (nm)		PDI
	Pico 1	Pico 2	
RAME β -CD	214,1 \pm 93,5	1,1 \pm 0,6	0,244 \pm 0,017
C $_3$ _x	3682,0 \pm 508,0	660,1 \pm 218,0	0,388 \pm 0,115

Todos los valores se expresan con su correspondiente desviación estándar (\pm DS)

Se obtuvieron dos poblaciones de diferente tamaño coexistentes en la RAME β -CD. La primera población, de aproximadamente 200 nm de tamaño, corresponde al agregado de la RAME β -CD, valor que se encuentra en el rango típico reportado para las CDs (entre 90-300 nm) [121]. Si bien los derivados de CDs tienen menor tendencia a formar agregados que las CDs nativas [122], como la RAME β -CD no se encuentra completamente sustituida, conserva aún la capacidad de establecer puentes de hidrógeno a través de los cuales formar estas estructuras. La segunda población corresponde a las moléculas de RAME β -CD individuales (sin agregar). Glisoni y colaboradores analizaron el tamaño de una CD metilada con un grado de sustitución similar a la RAME β -CD de este estudio [123], obteniendo tamaños semejantes a los mencionados (Tabla 13).

Los CI (C $_3$ _x) también presentaron dos poblaciones diferentes. Una población (Pico 1) presentó estructuras superiores a 3,5 μ m, mientras que la otra (Pico 2) presentó estructuras con un tamaño cinco veces menor. En cualquiera de los dos casos, los tamaños fueron mayores a los filtros utilizados para llevar adelante la cuantificación mediante HPLC (0,45 μ m), lo que confirmaría las sospechas sobre la retención de los complejos en los mismos. Esto también explicaría las diferencias observadas con los resultados obtenidos mediante espectroscopía UV y la imposibilidad de cuantificación de los complejos de PTX mediante HPLC. En los últimos años, se reportó que el agregado de las CDs y de los CI pueden afectar los resultados analíticos, proporcionando resultados poco consistentes o que no pueden explicarse por el pensamiento convencional de la formación de complejos huésped/CD. Algunos estudios indican que este comportamiento atípico de las CDs puede deberse a la presencia de agregados de CD unidos por puentes de hidrógeno en medios

acuosos y que sus interacciones con las moléculas de agua serían las responsables de los comportamientos imprevistos [121].

Por otro lado, los tamaños de las estructuras halladas en los CI fueron superiores a los de la CD sola, lo que verificaría lo reportado: en soluciones acuosas las moléculas de CDs libres tienen cierta tendencia a autoensamblarse para formar agregados, pero esta tendencia a la agregación es mayor para los CI [121]. Asimismo, Messner y colaboradores reportaron que los CI pueden agregarse en solución acuosa especialmente cuando los huéspedes tienden a autoagregarse [34], como es el caso del PTX [124]. Esto explicaría la diferencia con los CI de PGT que se presentarán en el siguiente capítulo.

Los valores de PDI proporcionan una buena idea de los cambios en una población y la amplitud del tamaño de esa población. Se utilizaron los tamaños por picos y no el tamaño de partícula promedio (*z-average*). El PDI del complejo resultó ligeramente mayor que el de la CD sola, esto podría deberse a que el CI presenta partículas de mayor tamaño que dispersan más la luz.

En solución acuosa los complejos se autoensamblan para formar nanopartículas solubles en agua (es decir, agregados) con un diámetro que con frecuencia ronda en un par de cientos de nm, y estas nanopartículas pueden autoensamblarse para formar agregados más grandes (formando soluciones coloidales y opalescentes) y sistemas de micropartículas [121]. En la Figura 18 se esquematiza el equilibrio propuesto para estas estructuras. Esto explicaría nuestras observaciones macroscópicas al disolver los CI de PTX/RAME β -CD en agua y los grandes tamaños obtenidos en la determinación de los tamaños de partículas. En la Figura 19 se compara la solubilidad del PTX libre e incluido en la CD.

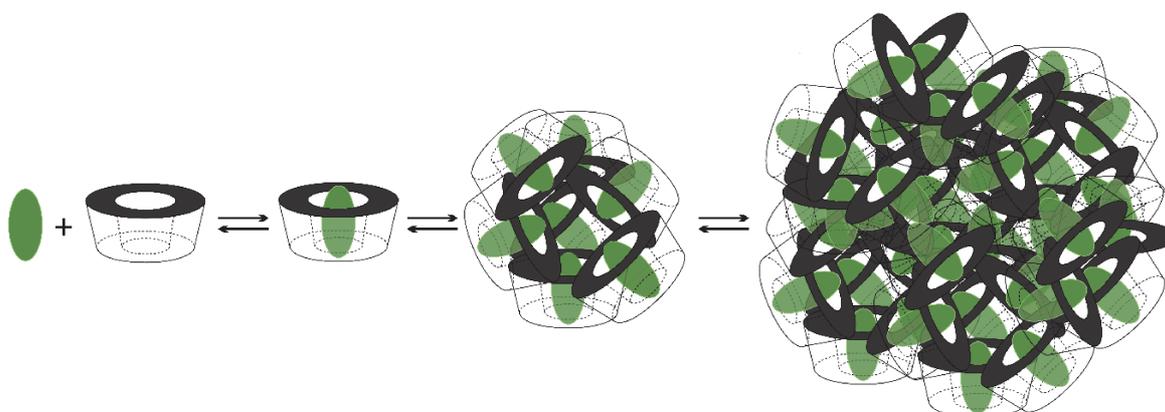


Figura 18. Formación de agregados de complejos de inclusión en solución acuosa (adaptado de Ryzhakov y col., 2016).



Figura 19. Comparación de la solubilidad del PTX en agua cuando está libre (vial izquierdo) y cuando está incluido en CD (vial derecho).

Fue documentada la coexistencia de complejos de inclusión y no inclusión en soluciones acuosas de CD y existen indicios que llevan a afirmar que la formación de tales complejos de no inclusión puede asociarse con la formación de agregados de fármaco/CD [47,121]. Estos agregados podrían actuar como reservorios capaces de potenciar la solubilidad acuosa de fármacos lipófilos [46,47,122], sin afectar su eficacia terapéutica, la cinética de la liberación de los CI o su farmacocinética [120].

1.4.3.6. Determinación Eficiencias de Inclusión mediante espectroscopía UV

Ante toda la evidencia obtenida y la imposibilidad de determinar las eficiencias mediante HPLC, se realizaron cuantificaciones mediante espectroscopía UV, obteniendo resultados muy diferentes a los adquiridos con HPLC. Por consiguiente, las determinaciones cuantitativas de los complejos PTX/RAME β -CD se realizaron íntegramente mediante espectroscopía UV y se calcularon las Eficiencias de Inclusión (E_{PTX}) mediante las Ecuación 1.3. Los valores se presentan en la Tabla 14.

Tabla 14. Eficiencias de Inclusión (E_{PTX}) para los complejos de PTX.

COMPLEJO	PTX:RAME β -CD (mol:mol)	SOLVENTE		Ac:Org (v:v)	E_{PTX} (%)
		Ac	Org		
C _{1x}	1:5	PBS	EtOH	50:50	21,79 %
C _{2x}	1:20				30,91 %
C _{3x}	1:30				49,96 %

Las Eficiencias de Inclusión para los tres complejos fueron menores al 50 %. A medida que la relación molar PTX:RAME β -CD fue aumentando, las eficiencias también lo hicieron. Esto evidencia el desplazamiento del equilibrio $CD + PTX \leftrightarrow CI$ hacia la formación de complejos de inclusión, lo que derivó en el aumento de las eficiencias. Sin embargo, las eficiencias fueron bajas en comparación con las reportadas por Bouquet y

colaboradores [4]. Si bien estos autores obtuvieron eficiencias menores al 60 % a relaciones molares menores a 1:20, obtuvieron eficiencias de ~90 % para complejos PTX:RAME β -CD 1:20 (mol/mol). En base a los resultados obtenidos, que distaban de los reportados, se ensayaron otros métodos de obtención de CI para mejorar las eficiencias de inclusión del PTX en la CD, como se describe a continuación.

1.4.4. Obtención de los complejos de inclusión en H₂O:EtOH

Para mejorar los resultados obtenidos con la mezcla PBS:EtOH y respondiendo a los buenos valores de CE calculados durante el análisis de los DSF, se obtuvieron complejos de inclusión PTX/RAME β -CD de distintas relaciones molares utilizando una mezcla H₂O:EtOH 50 % v/v mediante el método de *liofilización*. Se disolvió la RAME β -CD en agua y el PTX en EtOH, las soluciones se mezclaron y luego de los pasos de agitación y sonicación, se eliminó el solvente orgánico. Luego la mezcla resultante se liofilizó para obtener un producto sólido. La cuantificación de los CI se realizó mediante espectroscopía UV y las Eficiencias de Inclusión (E_{PTX}) se calcularon mediante la Ecuación 1.3, valores que se presentan en la Tabla 15.

Tabla 15. Eficiencias de Inclusión (E_{PTX}) para los complejos de PTX.

COMPLEJO	PTX:RAME β -CD (mol:mol)	SOLVENTE		Ac:Org (v:v)	E_{PTX} (%)
		Ac	Org		
C _{4x}	1:1	H ₂ O	EtOH	50:50	7,33 %
C _{5x}	1:5				29,37 %
C _{6x}	1:20				91,65 %

Las Eficiencias de Inclusión para los complejos C_{4x} y C_{5x} no mejoraron con respecto a las eficiencias obtenidas utilizando PBS:EtOH como medio de inclusión. Sin embargo, la Eficiencia de Inclusión del complejo C_{6x} fue mayor al 90 %, indicando una considerable mejora en el método utilizado para la obtención de los complejos. Nuevamente, a medida que la relación molar PTX:RAME β -CD fue aumentando, las eficiencias también lo hicieron, indicando un desplazamiento del equilibrio CD + PTX \leftrightarrow CI hacia la formación de complejos de inclusión y dando como resultado valores crecientes de eficiencias. En este caso, la eficiencia del complejo C_{6x} fue similar a la reportada por Bouquet y colaboradores [4] para PTX:RAME β -CD 1:20 (mol/mol) (~90 %).

1.4.4.1. Dispersión de luz dinámica

Nuevamente se determinó el tamaño de partículas mediante dispersión de luz dinámica (DLS), pero del complejo que presentó mayor eficiencia de inclusión, es decir del

complejo C6_x. Una pequeña cantidad del CI se disolvió en agua ultrapurificada. La medición se realizó a 25 °C. En la Tabla 16 se presentan los resultados de diámetro hidrodinámico (D_h) basado en intensidad y de índice de polidispersidad (PDI) del CI y de la RAMEβ-CD presentada en el inciso 1.4.3.5, con sus respectivos errores.

Tabla 16. Resultados de diámetros hidrodinámicos (D_h) y polidispersidad (PDI).

MUESTRA	D _h (nm)			PDI
	Pico 1	Pico 2	Pico 3	
RAMEβ-CD	214,1 ± 93,5	1,1 ± 0,6	-	0,244 ± 0,017
C6 _x	5359,7 ± 254,7	434,9 ± 48,2	200,7 ± 92,31	0,356 ± 0,161

Todos los valores se expresan con su correspondiente desviación estándar (± DS)

Se obtuvieron tres poblaciones de diferente tamaño para el complejo C6_x. La población 1 (Pico 1) presentó estructuras superiores a 3,5 μm, mientras que las otras dos presentaron estructuras menores a 450 nm. En este caso, el CI presentó aglomerados mayores a los obtenidos utilizando PBS:EtOH como solvente de inclusión (1,5 veces más grandes). Gonzalez-Gaitano y colaboradores encontraron que el uso de sales caotrópicas, como el NaCl utilizado para preparar el PBS, produce un debilitamiento de las fuerzas intermoleculares que mantienen juntos los agregados de CDs, ya que compite con las CDs en la formación de los puentes de hidrógeno [125]. Esto podría explicar los tamaños menores (3682,0 nm) encontrados al preparar los CI en PBS:EtOH como medio de inclusión.

Por otro lado, el C6_x presentó una población de menor tamaño (434,9 nm) a los presentes en el complejo obtenido anteriormente con PBS:EtOH; y se observaron aglomerados de aproximadamente 200 nm correspondientes a la CD sola (efecto que no se observó en los complejos realizados en PBS:EtOH). Se reportó que el agregado de sales (como los fosfatos del PBS), tienen un efecto cosmótrofo sobre ciertas moléculas, es decir que favorecen las interacciones intramoleculares de las macromoléculas, favoreciendo su agregación [126]. Puskás y colaboradores analizaron el efecto de la adición de algunas sales inorgánicas cosmótropas en el tamaño de los agregados de los complejos RAMEβ-CD-colesterol [127], encontrando que estas sales tienen un efecto agregante sobre los complejos. Esto podría explicar los resultados obtenidos en las poblaciones del Pico 2 y 3 del C6_x, ya que la no utilización de PBS en la preparación de los CI llevó a la obtención de agregados de tamaño menores (434,9 y 200,7 nm) con respecto a los obtenidos anteriormente (660,1 nm). Cabe aclarar que el PBS utilizado fue preparado tanto con sales caotrópicas (NaCl) como con sales cosmótropas (que aportan iones HPO₄⁻²), lo que lleva a observar este efecto dual. Sin embargo, el NaCl fue el que se encontró en mayor concentración, generando un efecto más remarcado sobre la población del Pico 1.

Como en el caso anterior, el PDI del complejo es mayor que el de la CD sola, diferencia que podría deberse a las grandes partículas presentes en el CI.

Los resultados obtenidos coinciden con lo observado macroscópicamente. En la Figura 20 se observa el complejo C6x disuelto en agua.



Figura 20. Comparación de la solubilidad del PTX en agua cuando está libre (vial izquierdo) y cuando está incluido en CD (vial derecho).

1.4.4.2. Microscopía electrónica de barrido

El microscopio electrónico de barrido es una herramienta que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos y proporciona información morfológica del material analizado, utilizando un haz de electrones para formar una imagen [128].

En la Figura 21 se muestran las micrografías correspondientes al PTX, RAME β -CD, la mezcla física y el complejo C6_x.

Como se puede observar, el PTX presentó una morfología en forma de barras, mientras que la RAME β -CD en forma de partículas esféricas huecas, algunas aparentemente rotas. La micrografía de la mezcla física mostró una mezcla de ambas estructuras (barras y partículas). Por el contrario, se observó un cambio en la forma de las estructuras en el CI, con una morfología de placas regulares rotas (posiblemente por el proceso de secado), lo que concordaría con un estado amorfo. La comparación entre las imágenes reveló que el CI fue estructuralmente diferente a los componentes aislados. El cambio en la morfología de la superficie del CI reveló la presencia de una nueva fase sólida, que podría deberse a la inclusión de PTX en la RAME β -CD. Choi y colaboradores [53] y Ye y colaboradores [2] reportaron resultados similares entre PTX y una DM- β -CD.

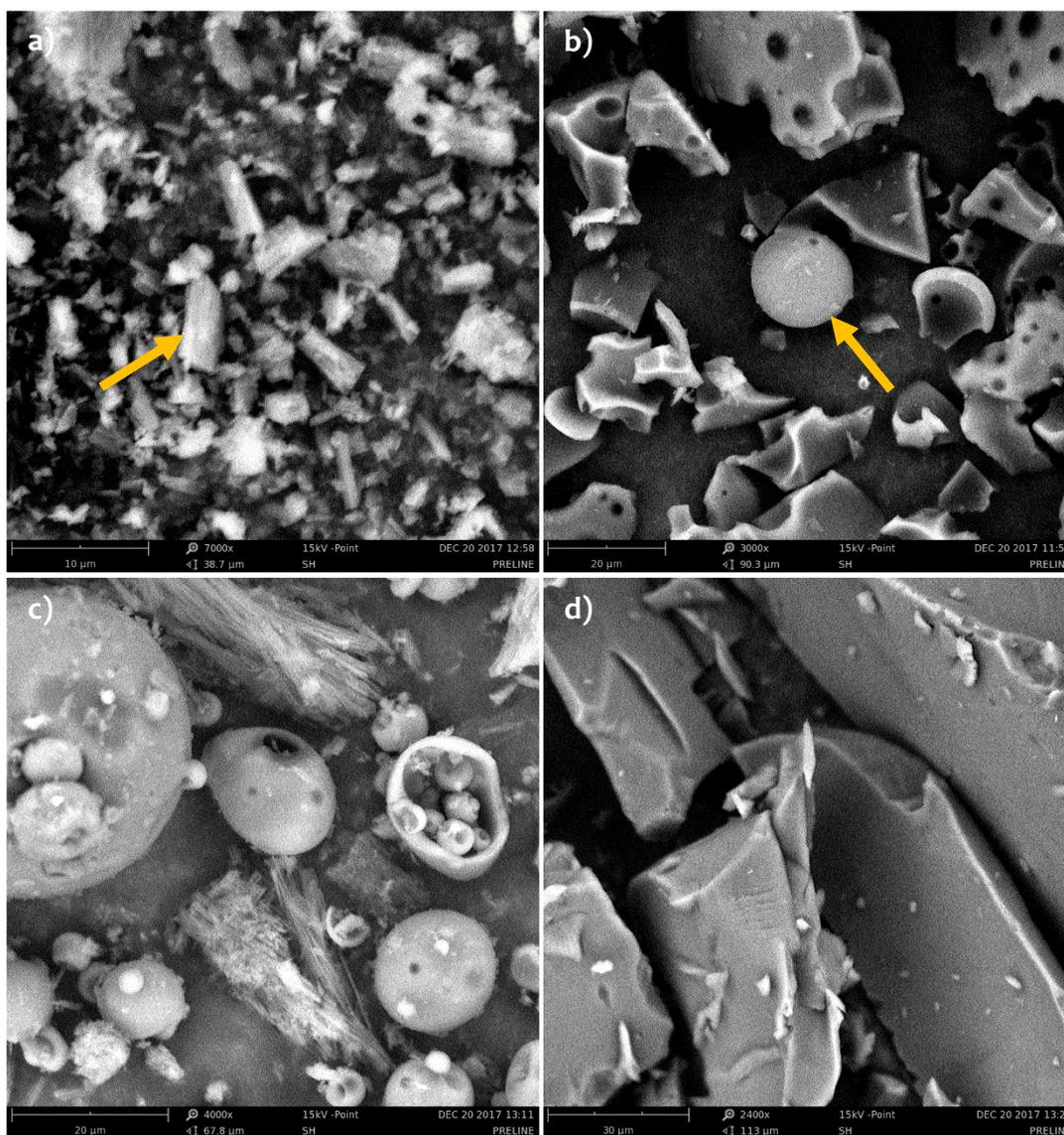


Figura 21. Micrograffías obtenidas por SEM de: **a)** PTX (7000x), **b)** RAMEβ-CD (3000x), **c)** mezcla física PTX/RAMEβ-CD (4000x) y **d)** CI PTX/RAMEβ-CD (2400x).

1.4.5. Protocolos alternativos de obtención de los complejos de inclusión

Además de los protocolos desarrollados, se realizaron experimentos utilizando como medio de obtención de los complejos: únicamente agua, para evaluar el efecto de un medio polar en la eficiencia de inclusión del PTX; y únicamente un solvente orgánico (MeOH y EtOH), para mejorar la solubilidad de la droga y favorecer la formación de los complejos.

Se reportó el uso de aditivos, como ácido cítrico y polivinilpirrolidona, para controlar la tendencia de las moléculas de CD a formar agregados [129]. Por ello, para evitar la aglomeración de los complejos de inclusión obtenidos, se llevaron a cabo dos protocolos en los que se le agregó al medio de reacción: ácido cítrico 1 % (C11_x) o polivinilpirrolidona 1 % (C12_x) como antiagregantes. Asimismo, se utilizó en otro protocolo, como estrategia para evitar la agregación, un sonicador de punta para obtener los CI (C10_x). Se realizó la

cuantificación de los complejos de inclusión mediante espectroscopía UV y las Eficiencias de Inclusión (E_{PTX}) se calcularon mediante la Ecuación 1.3. En la Tabla 17 se presentan los resultados de cada complejo.

Tabla 17. Eficiencias de Inclusión (E_{PTX}) para los complejos de PTX.

COMPLEJO	PTX:RAME β -CD (mol:mol)	SOLVENTE		Ac:Org (v:v)	E_{PTX} (%)
		Ac	Org		
C7 _x	1:20	H ₂ O	-	100:0	60,63 %
C8 _x	1:10	-	MeOH	0:100	88,55 %
C9 _x	1:10	-	EtOH	0:100	>99 %
C10 _x ^a	1:20	-	DCM	0:100	56,04 %
C11 _x ^b	1:20	H ₂ O	EtOH	50:50	33,60 %
C12 _x ^c	1:20	H ₂ O	EtOH	50:50	31,60 %

a: con DCM y sonicador de punta, **b:** con PVP 1 %, **c:** con ácido cítrico 1 %;
PVP = polivinilpirrolidona, DCM = diclorometano

Se obtuvieron Eficiencias de Inclusión superiores a 88 % para los complejos realizados enteramente en solvente orgánico (C8_x y C9_x).

La Eficiencia obtenida para el complejo realizado enteramente en agua (C7_x) mejoró (60,63 %) con respecto a la eficiencia del complejo realizado en PBS:EtOH en la misma relación molar (30,91 %), pero no mejoró con respecto al realizado en H₂O:EtOH (91,65 %).

Las eficiencias de los complejos obtenidos para evitar la agregación no fueron mayores al 60 %. A pesar de los resultados obtenidos, con el objetivo de comprobar el efecto de las modificaciones insertadas para evitar la agregación de los CI, se realizaron mediciones del tamaño de partículas.

1.4.5.1. Dispersión de luz dinámica

Para determinar la efectividad de las variantes introducidas para evitar la agregación de los CI (C10_x, C11_x y C12_x), se determinaron sus tamaños de partículas mediante DLS. Cada complejo se disolvió en agua ultrapurificada y se analizó a 25 °C. Se presentan en la Tabla 18 los resultados de diámetro hidrodinámico (D_h) basado en intensidad y de índice de polidispersidad (PDI) de cada complejo con su respectivo error. Además, a fines comparativos se incluyen los resultados de la RAME β -CD presentada en el inciso 1.4.3.5.

En los tres protocolos (C10_x, C11_x y C12_x) se obtuvo una de las poblaciones de partículas mayor a 5 μ m, como en el caso de los CI obtenidos en H₂O:EtOH (C6_x).

Tabla 18. Resultados de diámetros hidrodinámicos (Dh) y polidispersidad (PDI).

MUESTRA	D _h (nm)			PDI
	Pico 1	Pico 2	Pico 3	
RAME β -CD	214,1 \pm 93,5	1,1 \pm 0,6	-	0,244 \pm 0,017
C10 _x ^a	1807,9 \pm 624,8	311,84 \pm 44,6	5341,0 \pm 373,3	0,801 \pm 0,135
C11 _x ^b	1231,7 \pm 229,4	5384,0 \pm 152,7	-	0,558 \pm 0,069
C12 _x ^c	1694,3 \pm 553,9	5182,7 \pm 178,6	-	0,433 \pm 0,120

a: con DCM y sonicador de punta, **b:** con PVP 1%, **c:** con ácido cítrico 1%; PVP = polivinilpirrolidona, DCM = diclorometano

Con el agregado de ácido cítrico y PVP se observó además otra población de 1231,7 y 1694,3 nm, respectivamente. Esto verifica el efecto antiagregante de ambos reactivos. Por su parte, mediante el uso del sonicador durante la preparación del complejo C10_x se obtuvieron dos poblaciones más: una de tamaño ligeramente mayor que los complejos C11_x y C12_x (1807,8 nm) y una población de 311,84 nm. Esto indica que el protocolo C10_x fue más efectivo en reducir el tamaño de partículas que los protocolos C11_x y C12_x. Además, durante la obtención del C10_x, se observaron soluciones limpias y transparentes, a diferencia de lo que ocurrió en todos los casos anteriores, lo cual es un avance operativo significativo (Figura 22).



Figura 22. Comparación de la solubilidad del PTX en agua cuando está libre (vial izquierdo) y cuando está incluido en CD (vial derecho).

Con respecto al PDI, este fue mayor para el C10_x que para el C11_x y el C12_x. Esto se debe a que el complejo C10_x presenta tres poblaciones, a diferencia de los otros dos que presentan solo dos.

Los resultados de tamaños de partículas obtenidos en este trabajo verifican el efecto antiagregante de la sonicación, el ácido cítrico y la PVP en los complejos de inclusión PTX/RAME β -CD. Puskás y colaboradores reportaron que el ácido cítrico y la PVP tiene un efecto disgregante en las CDs [129]. Sin embargo, estos autores no verificaron el efecto de

esos aditivos en los tamaños de los CI. Hasta el momento no se han reportado trabajos que analicen el efecto de los aditivos mencionado en el tamaño de los CI.

1.4.5.2. Proyecciones futuras

Aunque las variantes introducidas en los protocolos para reducir los tamaños de los complejos no resultaron del todo satisfactorias en términos de eficiencias de inclusión, lograron reducir los agregados de CI. Estos ensayos correspondieron a etapas finales del presente trabajo de tesis. Por este motivo, se plantea (en experimentos futuros) continuar trabajando en este sentido, a fin de mejorar los resultados obtenidos hasta aquí.

1.4.6. Conclusiones parciales

Se calcularon las $K_{1:1}$ y las Eficiencias de Encapsulación (CE) utilizando los DSF entre el PTX y RAME β -CD en tres solventes diferentes (PBS:EtOH, H₂O:EtOH y agua).

Se ensayaron distintos protocolos de formación de complejos entre PTX y RAME β -CD en PBS:EtOH y se caracterizaron los CI obtenidos mediante FT-IR, DSC, RMNp y DLS. Se verificó la formación de CI y de agregados de gran tamaño de CI.

Para mejorar la eficiencia de inclusión se ensayaron nuevos protocolos de formación de complejos en H₂O:EtOH como medio de inclusión. Se prepararon complejos de inclusión 1:20 mol:mol PTX/RAME β -CD con buenos resultados de eficiencia, los que se caracterizaron mediante DLS y SEM.

Finalmente se prepararon tres complejos de inclusión en solventes diferentes (EtOH, MeOH o H₂O) y tres con aditivos disgregantes o disrupción mecánica (ácido cítrico, PVP o sonicación) y se calcularon sus eficiencias de inclusión. Los últimos tres complejos se caracterizaron por DLS; se logró reducir el tamaño de los agregados, aunque las eficiencias de inclusión disminuyeron. En las condiciones en las que se obtuvieron agregados más pequeños, se podrían ensayar distintas alternativas (como por ejemplo: modificar las relaciones de solventes, las relaciones molares entre los reactivos, momento en el que se incorpora el antiagregante, cantidad de antiagregante, entre otras), para intentar mejorar las Eficiencias de Inclusión. De esta manera se esperarían obtener soluciones de complejos estables y homogéneas, que solucionen el problema de baja solubilidad acuosa del PTX y que presenten una mejora tecnológica con respecto a la formulación comercial actual. El objetivo final sería incorporar los complejos en geles de quitosano y realizar ensayos de liberación *in vitro*.

**CAPÍTULO 2 / COMPLEJOS DE
INCLUSIÓN
DE PROGESTERONA**

CAPÍTULO 2

COMPLEJOS DE INCLUSIÓN DE PROGESTERONA

2.1. INTRODUCCIÓN

La progesterona (PGT) es una hormona natural esteroidea que desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la fisiología normal del sistema reproductivo femenino. En la Introducción de este trabajo se presentó una breve recopilación de información referente a dicha hormona. Como se explicó, se utiliza principalmente en la prevención del parto prematuro, el apoyo a la fase luteínica, en la terapia de reemplazo hormonal y en el tratamiento de la hiperplasia endometrial y el carcinoma endometrial primario.

La PGT es prácticamente insoluble en agua (7 mg/L o 22,26 μ M, a 25 °C) y se administra mediante diversas vías: oral, intramuscular y vaginal [14,17,18]. Sin embargo, como se mencionó en la Introducción, cada una presenta ciertas limitaciones, entre ellas la relacionada al empleo de aceites debido a su baja solubilidad. Por ello el primer paso para pensar en una formulación mejorada de PGT es aumentar su solubilidad acuosa, y las ciclodextrinas (CDs) son una buena herramienta para lograrlo. Varios trabajos describen la posibilidad de utilizar CDs para incluir PGT [14,56-59].

2.2. OBJETIVOS

Los objetivos específicos de este capítulo fueron:

- Realizar un estudio de Diagrama de Solubilidad de Fases de PGT con distintas CDs.
- Seleccionar los componentes y las condiciones de preparación de complejos de inclusión PGT/CDs.
- Preparar y caracterizar los complejos de inclusión.

2.3. MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1. Materiales

La PGT fue adquirida en Farmabase (Italia), pureza 99,2 %.

La β -ciclodextrina metilada al azar (RAME β -CD) con un grado de sustitución (GS) de 12 fue adquirida en Cyclolab (Hungría). La β -ciclodextrina (β -CD; Roquette, Francia) fue donada.

El agua utilizada durante todo el trabajo fue producida con un sistema de purificación Milli-Q® (Millipore, EE.UU.). El etanol (EtOH) fue de grado analítico (Cicarelli). El metanol (MeOH) fue de calidad cromatografía líquida (Merck).

El bromuro de potasio (KBr), de calidad analítica, fue adquirido en Anedra.

El cloroformo deuterado (CDCl_3) 99,8 % D utilizado para los estudios de ^1H -RMN fue adquirido en Sigma-Aldrich®.

2.3.2. Cuantificación de progesterona

Se utilizó un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para cuantificar la cantidad de PGT, modificando el desarrollado por Pereira y colaboradores [21]. Se empleó un equipo HPLC Shimadzu LC-20A, con detector de arreglo de diodos e inyector automático. La separación cromatográfica se realizó utilizando una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (250 x 4,6 mm; 5 μm de tamaño de poro) (Agilent). La temperatura de la columna se mantuvo constante a 30 °C durante todos los ensayos. La fase móvil (FM) consistió en una solución de MeOH y agua en una relación 95:5 (v:v), con un caudal de 1 mL/min. La detección se realizó mediante absorción UV a 254 nm.

La solución madre de PGT se preparó por disolución de la droga sólida en un volumen determinado de MeOH para alcanzar una concentración final de 300,0 $\mu\text{g/mL}$. Esta solución se conservó en oscuridad a 4,0 °C.

Para verificar la linealidad del método en el rango de concentración de 1,0 a 100,0 $\mu\text{g/mL}$, se prepararon soluciones de calibrado a seis niveles de concentración: 1,0; 5,0; 25,0; 50,0; 75,0 y 100,0 $\mu\text{g/mL}$ de PGT; y se inyectaron por triplicado. Las soluciones de calibrado se prepararon en el día por dilución de cantidades conocidas de la solución madre en FM.

2.3.3. Diagrama de solubilidad de fases

Los diagramas de solubilidad de fases (DSF) se obtuvieron siguiendo la metodología desarrollada por Higuchi y Connors [45]. En un recipiente color caramelo se colocó una cantidad fija de PGT (en exceso) y cantidades crecientes de CD en un solvente dado. Se utilizaron dos CDs: β -CD (0 - 2 mM) y RAME β -CD (0 - 150 mM); y dos solventes: agua ultrapura y una mezcla de H_2O :EtOH 50 % v/v. Los recipientes se almacenaron en estufa a 37 °C, con agitación orbital (100 rpm) durante 1 semana. Una vez alcanzado el equilibrio, los recipientes se centrifugaron durante 40 minutos y los sobrenadantes se filtraron con filtros de 0,22 μm para su posterior análisis por HPLC. Cada experimento se realizó por triplicado. Con los promedios y su correspondiente error se realizó un gráfico de concentración del

sustrato disuelto (PGT) en función de la concentración del *anfitrión* (CD) para obtener el DSF.

En base a los DSF obtenidos y utilizando la Ecuación 1.1 (apartado 1.3.3, Capítulo 1) se calculó la Contante de Estabilidad Aparente ($K_{1:1}$) para cada condición ensayada.

Se calculó además, utilizando la Ecuación 1.2 (apartado 1.3.3, Capítulo 1), la Eficiencia de Encapsulación (CE) propuesta por Loftsson y Brewster [35]. Esta ecuación utiliza los valores de la pendiente de la parte lineal de los DSF graficados.

2.3.4. Obtención de los complejos de inclusión

Los complejos de inclusión PGT/RAME β -CD se obtuvieron mediante el método denominado *liofilizado*. Se ensayaron diferentes protocolos realizando variaciones en el tipo de solvente utilizado (EtOH, MeOH y agua) y sus combinaciones, y en las relaciones molares entre la PGT y la RAME β -CD. Las condiciones evaluadas se muestran en la Tabla 19. Para obtener los CI se disolvió una cantidad adecuada de PGT en el correspondiente solvente orgánico (Org) y paralelamente una cantidad proporcional de la RAME β -CD en agua en las relaciones molares: 1:1; 1:5; 1:10 y 1:20 mol:mol⁶. Ambas soluciones se mezclaron y se agitaron durante 15 min con agitador magnético. Luego se colocaron en baño ultrasónico (Cole-Parmer) durante 5 min. El solvente Org se eliminó bajo presión reducida a 50 °C con un evaporador rotatorio (Yamato) y la solución obtenida se centrifugó para eliminar reactivos que no formaron complejo⁷. El sobrenadante se congeló a -80 °C y se liofilizó durante 24 hs a 1 mbar de presión.

Tabla 19. Condiciones de preparación de complejos PGT/RAME β -CD.

COMPLEJO	PGT:RAME β -CD (mol:mol)	SOLVENTE		Ac:Org (v:v)
		Ac	Org	
C1 _g	1:1	H ₂ O	-	100:0
C2 _g		H ₂ O	EtOH	50:50
C3 _g		-	MeOH	0:100
C4 _g		-	EtOH	0:100
C5 _g	1:5	H ₂ O	-	100:0
C6 _g		H ₂ O	EtOH	50:50
C7 _g		-	MeOH	0:100
C8 _g	1:10	H ₂ O	EtOH	50:50
C9 _g	1:20	H ₂ O	EtOH	50:50

⁶ En los complejos que se realizaron completamente en solvente Org, todos los reactivos se disolvieron en ese solvente, y en los complejos que se realizaron completamente en el solvente Ac, todos los reactivos se disolvieron en agua.

⁷ En los complejos en los que no se utilizó agua se eliminó el solvente Org completamente hasta sequedad, luego se agregó un volumen de agua igual al volumen de solvente Org inicial para redissolver el polvo obtenido. La solución se centrifugó y se prosiguió con el protocolo indicado.

2.3.4.1. Determinación de la eficiencia y del rendimiento de inclusión

En agua sólo se disuelve la hormona que se encuentra incluida en los complejos, mientras que en FM se disuelve tanto la hormona libre como la que se encuentra incluida. Para determinar la eficiencia de inclusión del método, se disolvió la misma cantidad del sólido obtenido luego de la liofilización en agua y en FM. Las soluciones se analizaron mediante el método desarrollado en el apartado 2.3.2 y se cuantificó la concentración de PGT en las soluciones. Con la siguiente ecuación se calculó la Eficiencia de Inclusión de la PGT (E_{PGT}):

$$E_{PGT} = \frac{C_{PGT-H_2O}}{C_{PGT-FM}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 2.1}$$

Donde:

C_{PGT-H_2O} es la concentración calculada (en $\mu\text{g/mL}$) a partir del área del pico obtenido en el HPLC correspondiente a la PGT presente en la muestra disuelta en agua.

C_{PGT-FM} es la concentración calculada (en $\mu\text{g/mL}$) a partir del área del pico obtenido en el HPLC correspondiente a la PGT presente en la muestra disuelta en FM.

Asimismo, se calculó el Rendimiento de Inclusión de la PGT (R_{PGT}) para caracterizar el método de obtención de los complejos utilizando la siguiente Ecuación:

$$R_{PGT} = \frac{m_{PGT-Lio}}{m_{O-PGT}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 2.2}$$

Donde:

$m_{PGT-Lio}$ es la masa calculada (en μg) de PGT a partir del área del pico obtenido en el HPLC del CI disuelto en FM, referida a la PGT presente en el total del CI liofilizado.

m_{O-PGT} es la masa inicial (en μg) de PGT utilizada para obtener el CI correspondiente.

2.3.5. Caracterización de los complejos PGT/CD

Para estudiar la interacción *huésped-CD* y caracterizar los CI se realizaron ensayos de calorimetría diferencial de barrido, espectroscopía infrarroja, resonancia magnética nuclear de protones, dispersión de luz dinámica y microscopía electrónica de barrido.

2.3.5.1. Calorimetría diferencial de barrido

Se pesaron aproximadamente 5 mg de muestra en cápsulas de aluminio y se llevaron a cabo ensayos de calorimetría en un analizador térmico Mettler DSC821e (Mettler Toledo). Todos los ensayos se llevaron a cabo con atmósfera controlada de nitrógeno y con una rampa de calentamiento de 10 °C/min hasta un máximo de 250 °C. Se realizaron mediciones

para cada componente puro: PGT y RAME β -CD, para la mezcla física y el complejo liofilizado en una relación molar 1:1.

2.3.5.2. Espectroscopía infrarroja

Se realizaron estudios de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) en un espectrómetro FTIR-8201 PC (Shimadzu), en el rango de frecuencia 400-4000 cm⁻¹ a una resolución de 8 cm⁻¹ y 40 escaneos por espectro. Se prepararon las muestras en discos de KBr, previamente secado en estufa a 100 °C por 24 h para asegurar que los picos correspondientes al agua no interfieran con aquellos pertenecientes a los compuestos en estudio. Se realizaron mediciones para cada componente puro (PGT y RAME β -CD), para la mezcla física y el complejo liofilizado en una relación molar 1:1. La concentración de cada componente fue del 1 % en los discos de KBr a fin de obtener espectros más claros y definidos.

2.3.5.3. Resonancia magnética nuclear

Se obtuvieron los espectros de RMN de protones (¹H-RMN) usando un espectrómetro Bruker AVANCE de 300 MHz. Las muestras (PGT y el complejo liofilizado en una relación molar 1:1) se disolvieron en CDCl₃ a 25 °C. Se utilizó como referencia interna un corrimiento químico (δ) de 7,26 ppm para el CDCl₃.

La variación de desplazamiento químico ($\Delta\delta$) de protones para la PGT, originados por el fenómeno de inclusión se calculó aplicando la siguiente ecuación:

$$\Delta\delta = \delta_{Inc} - \delta_{Lib} \quad \text{Ecuación 2.3}$$

Donde: δ_{Inc} es el corrimiento de los protones de PGT cuando se encuentra incluida y δ_{Lib} es el corrimiento de los protones de la PGT cuando se encuentra libre o no incluida.

2.3.5.4. Dispersión de luz dinámica

Las medidas de tamaño de partículas se realizaron usando dispersión de luz dinámica (DLS) en un equipo Zetasizer Nano-ZS (Malvern). El CI en una relación molar 1:5 disuelto en agua ultrapurificada y ubicado en una cubeta de poliestireno (dimensiones: 1,0 x 1,0 cm) a una temperatura de 25 °C se irradió con un láser de He-Ne ($\lambda = 633$ nm). Se fijó el índice de refracción en 1,33 y la viscosidad en 0,8872 cP. Se detectó la intensidad de la luz dispersada con un ángulo de retrodispersión de 90°. Se realizaron 11 corridas durante 10 segundos por triplicado. Los datos fueron procesados mediante el software Zetasizer versión 6.2.

2.3.5.5. Microscopía electrónica de barrido

Se realizaron observaciones microscópicas de cada componente (PGT y RAME β -CD), de la mezcla física y del complejo liofilizado en una relación molar 1:5. La obtención de micrográficas se realizó mediante observación con un microscopio electrónico de barrido de escritorio Phenom ProX equipado con un *software* Phenom ProSuite. Las observaciones se realizaron bajo el modo de imágenes de electrones retrodispersados utilizando una tensión de aceleración de 15,0 kV.

2.4. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

2.4.1. Cuantificación de progesterona

La determinación cuantitativa de PGT en las distintas muestras se realizó mediante la técnica analítica de HPLC. Con el área de los picos de elución de las distintas soluciones patrones preparadas y sus respectivas concentraciones se confeccionó la curva de calibrado presentada en la Figura 23. Cada solución patrón se midió por triplicado.

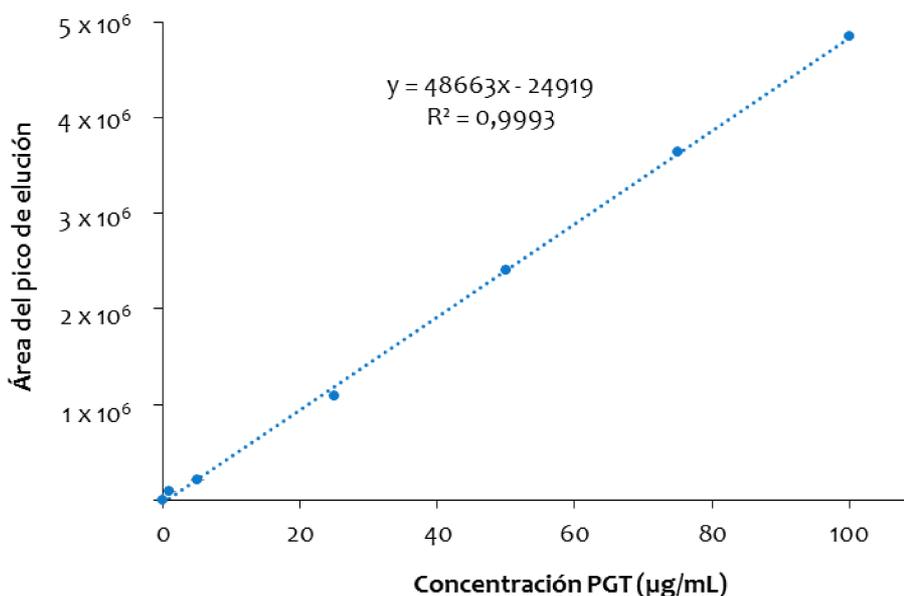


Figura 23. Curva de calibrado para la determinación cuantitativa de progesterona mediante HPLC.

Los datos experimentales se ajustaron con un modelo lineal mediante el método de cuadrados mínimos. La ecuación de la recta de ajuste fue: $y = a + b * x$, donde y es la respuesta correspondiente al área del pico de PGT, a es la ordenada al origen, b es la pendiente y x la concentración de analito expresada en µg/mL. Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para verificar la linealidad del método en el rango estudiado. Los

parámetros obtenidos se muestran en la Tabla 20. Los parámetros ordenada al origen y pendiente se presentan con su correspondiente incertidumbre.

Tabla 20. Parámetros estadísticos obtenidos del ajuste de las variables concentración de PGT y área de pico.

PARÁMETROS DE AJUSTE	VALOR
Ordenada al origen	$(- 25 \pm 16) \times 10^3$
Pendiente	$(487 \pm 3) \times 10^2$
R ²	0,9993
Coefficiente de correlación	0,9996
Valor de probabilidad del modelo	0,0000

El estadístico R² indica que el modelo explica un 99,93 % de la variabilidad de la respuesta. El coeficiente de correlación es igual a 0,9996, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. Dado que el valor de probabilidad del modelo es inferior a 0,05, se puede concluir que existe una relación estadísticamente significativa entre el área de pico y la concentración de PGT para un nivel de confianza del 95,0 %.

2.4.2. Diagrama de solubilidad de fases

Como se mencionó en la Introducción de este trabajo, los DSF si bien no verifican la formación de los CI, permiten describir como aumenta la solubilidad del huésped a medida que aumenta la concentración de CD [34]. En este trabajo, siguiendo el método de Higuchi y Connors [45], se obtuvieron los DSF de la PGT con distintas CDs (β -CD y RAME β -CD) en dos solventes: agua ultrapura y una mezcla H₂O:EtOH 50 % v/v, y se calcularon las constantes de estabilidad de los complejos PGT/CD en cada condición. Los DSF para la β -CD y la RAME β -CD se presentan en la Figura 24 y 25, respectivamente. En la bibliografía se reporta que los complejos más comúnmente formados entre la PGT y las CDs son del tipo 1:1 [130].

El DSF de la PGT con β -CD en agua a 37 °C (Figura 24) mostró un comportamiento del tipo B_s, lo que sugiere la formación de complejos de solubilidad limitada en agua, según la clasificación de Higuchi y Connors [45]. Esto coincide con lo reportado por Uekama y colaboradores [60] y Lahiani-Skiba y colaboradores [56]. La porción lineal refleja un aumento de la solubilidad aparente de la PGT a 37 °C, la cual alcanza una meseta que representa el límite de solubilidad del complejo. A concentraciones mayores a estas, la solubilidad comienza a disminuir debido a la precipitación del complejo.

Los DSF de la PGT con la RAME β -CD a 37 °C (Figura 25) presentaron curvas típicas del tipo A_L. Los diagramas muestran que la solubilidad de la PGT se incrementa linealmente con la concentración de la RAME β -CD durante todo el rango de concentraciones de CD estudiado, a través de la formación de complejos solubles. Hasta la fecha no se hallaron trabajos que

reporten el comportamiento de la PGT con la RAME β -CD. No obstante, otros autores han estudiado sistemas similares. Lahiani-Skiba y colaboradores [56] evaluaron el comportamiento de la PGT con una CD trimetilada (en el rango de 0 y 300 mM), y Luppi y colaboradores [64] estudiaron el comportamiento de la PGT con una CD dimetilada (en el rango de 0 a 16 mM). Ambos autores obtuvieron perfiles del tipo A_L . Por su parte Ma y colaboradores [131] obtuvieron perfiles A_L al estudiar la epoxyprogesterona con RAME β -CD (en el rango de 0 y 100 mM).

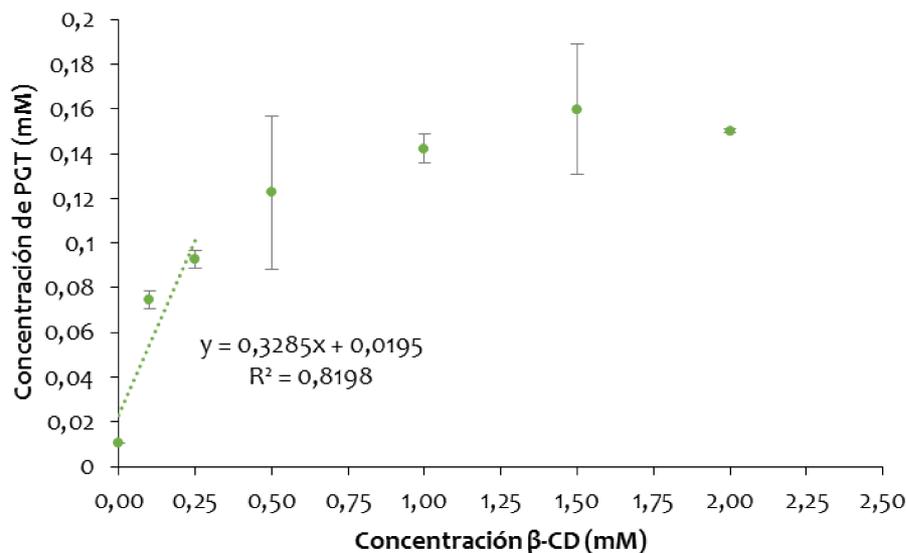


Figura 24. Diagrama de solubilidad de fases de PGT con β -CD en agua.

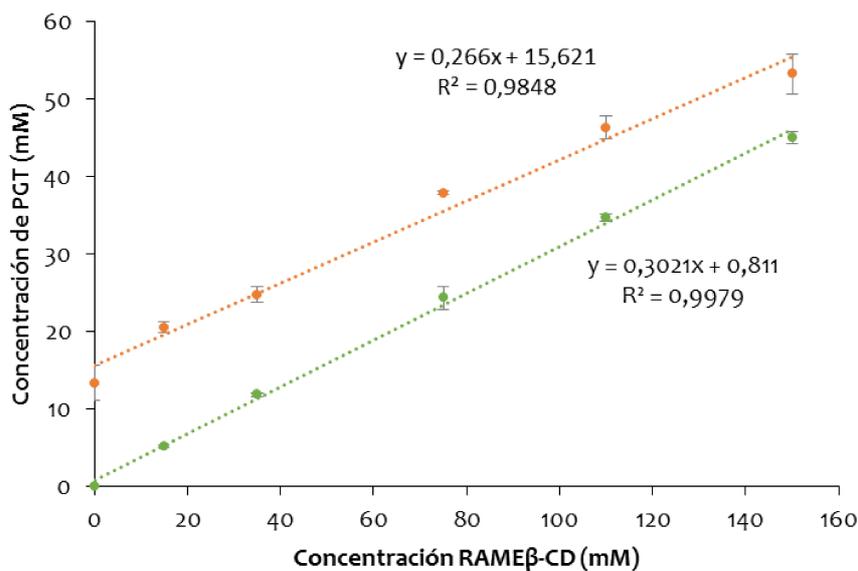


Figura 25. Diagrama de solubilidad de fases de PGT con RAME β -CD: en verde en agua y en naranja en H₂O:EtOH 50 % v/v.

El efecto disolvente obtenido mezclando un solvente orgánico con agua ocurre por un cambio en el coeficiente de actividad del soluto en la solución. La adición de un cosolvente orgánico al agua hace que el ambiente de la mezcla sea menos polar y más favorable para la disolución de un soluto hidrofóbico como la PGT. En general, cuanto más hidrófobo es el soluto, mayor el efecto disolvente producido por un cosolvente orgánico que es menos polar que el agua [35]. Es por eso que la S_o aparente aumenta en el caso del ensayo realizado en H₂O:EtOH en comparación con el realizado solamente en agua, desplazando la curva de la PGT vs RAME β -CD hacia arriba (Figura 25).

Los perfiles obtenidos en este trabajo coinciden con el hecho de que las CDs solubles en agua (RAME β -CD, solubilidad acuosa >500 mg/mL) forman perfiles de solubilidad de fases del tipo A, y que las CDs naturales menos solubles (β -CD, solubilidad acuosa = 18,5 mg/mL) forman perfiles del tipo B [46].

Se demostró en diversos trabajos que los valores de las constantes de estabilidad varían en función del método utilizado para su determinación, probablemente debido a diferencias en las condiciones experimentales utilizadas en cada uno [130,132,133]. En este trabajo se obtuvo la Constante de Estabilidad Aparente ($K_{1:1}$) de la PGT con cada CD a partir de la porción lineal de los DSF utilizando la Ecuación 1.1 (Capítulo 1). Muchas veces, las moléculas de fármaco pueden formar dímeros, trímeros y oligómeros solubles en agua, que son incapaces de formar CI con CDs [35]. En estas situaciones, la ordenada al origen de la curva no coincide con el valor de S_o dando como resultado valores de constantes con errores considerables [134]. De este modo, se calcularon las constantes utilizando la S_o práctica, solubilidad correspondiente a la ordenada al origen de la curva ajustada; y la S_o teórica reportada en la bibliografía (Tabla 21).

Tabla 21. Valores de las Constantes de Estabilidad Aparente $K_{1:1}$ teóricas y prácticas para la PGT a 37 °C y de las Eficiencias de Encapsulación CE.

DSF	CD	SOLVENTE (v:v)		S_o teórica (mM)	$K_{1:1}$ teórica (M ⁻¹)	S_o práctica (mM)	$K_{1:1}$ práctica (M ⁻¹)	CE
		H ₂ O	EtOH					
1g	β -CD	100	-	0,007 [130]	21976,41	0,0106	46256,79±3614,41	0,489±0,035
2g	RAME β -CD	100	-	0,007 [130]	19445,76	0,0058	74526,09±3326,72	0,433±0,004
3g		50	50	27,5 [130]	13,18	13,36	27,13±8,16	0,362±0,036

Asimismo se calculó la Eficiencia de Encapsulación (CE) utilizando la Ecuación 1.2 (Capítulo 1). Los valores de las $K_{1:1}$ y las CE calculadas se presentan en la Tabla 21.

El valor de la constante $K_{1:1}$ práctica para la RAME β -CD en agua indicó una fuerte afinidad de la PGT con la CD, como lo reportaron otros autores en casos similares [56,64,131]. Este comportamiento se debe a la alta hidrofobicidad de la PGT (coeficiente de reparto en un

sistema octanol-agua $P_{\text{oct}}=7410$) [135]. Asimismo, la $K_{1:1}$ práctica obtenida para la RAME β -CD en agua ($74526,09 \text{ M}^{-1}$) fue mucho mayor que la obtenida para la mezcla $\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}$ ($27,13 \text{ M}^{-1}$). Esto se puede explicar según lo descrito por Loftsson y Brewster [35], quienes demostraron que a medida que aumenta la porción orgánica del medio de inclusión, la constante aparente disminuye ya que la polaridad del medio decrece. En la Tabla 22 se presentan valores de constantes para sistemas similares reportados en la bibliografía.

Tabla 22. Valores de $K_{1:1}$ reportados por otros autores.

HUÉSPED	CD	MEDIO	S_0 práctica (mM)	$K_{1:1}$ (M^{-1})	REFERENCIA
PGT (25 °C)	β -CD	H_2O	0,053	13300	Uekama y col. [60]
PGT (30 °C)	β -CD	H_2O	NI	24705	Liu y col. [61]
E-PGT (35 °C)	RAME β -CD	H_2O	0,043	13379	Ma y col. [125]
PGT (37 °C)	DM- β -CD	H_2O	NI	64508	Luppi y col. [64]
PGT (37°C)	TM- β -CD	H_2O	0,035	18654	Lahiani-Skiba y col. [56]

E-PGT= 16, 17 α -epoxyprogesterona; DM- β -CD= dimetil- β -CD, TM- β -CD= trimetil- β -CD; NI= no informa

El valor de la constante aparente práctica para la β -CD ($46256,79 \text{ M}^{-1}$) fue del orden de la obtenida por Uekama y Liu (Tabla 22). Este valor indicó que la β -CD es también muy eficaz para formar complejos PGT/CD estables. Sin embargo, la diferencia en la interacción de la PGT observada entre la CD natural y su derivado metilado se podría explicar teniendo en cuenta las diferentes solubilidades que presentan estas CDs ($18,5 \text{ mg/mL}$ y $>500 \text{ mg/mL}$, respectivamente [137]). El mejor desempeño para formar complejos que posee la RAME β -CD puede ser atribuido a sus grupos metilos, que incrementan la posibilidad de unión del fármaco al aumentar la naturaleza hidrofóbica de la cavidad [132]. El valor de la constante es afectado por la temperatura. En este caso se trabajó a 37 °C para evaluar el comportamiento de la PGT en las diferentes condiciones tomando como referencia los trabajos reportados [56,64].

Para ambas CDs, en las determinaciones realizadas en agua, se obtuvieron constantes del orden de las reportadas en la bibliografía (Tabla 22). Tal como se observa en la Tabla 21, los valores de las $K_{1:1}$ son afectados por el valor de solubilidad que se utiliza para su cálculo. Por esto, Loftsson y Brewster [35], propusieron el cálculo de CE, que relaciona la concentración de CDs formando complejos con la concentración de CDs libres. Este parámetro se independiza del valor de la solubilidad y resulta así más adecuado para la determinación del efecto solubilizante de las CDs [35]. Para los tres casos estudiados se obtuvieron valores de CE cercanos al promedio típico reportado en medios acuosos ($CE_{\text{promedio}} \sim 0,3$) [35]. Los valores de CE obtenidos para las CDs en agua (β -CD= $0,489$ y

RAME β -CD=0,433) resultaron ligeramente mayores al obtenido en la mezcla H₂O:EtOH (0,362). De los resultados de CE se desprende que para ambas CDs en agua una de cada tres moléculas de CD que están en solución forma un complejo soluble en agua, mientras que para la RAME β -CD en H₂O:EtOH una de cada cuatro moléculas de CD que están en solución forma un complejo soluble en agua. Estos resultados coinciden con lo reportado por Loftsson y colaboradores [138]. Lo presentado anteriormente indicaría que en agua hay menor cantidad de CDs libres y mayor número de CDs formando complejo con la PGT que en H₂O:EtOH.

2.4.3. Obtención de los complejos de inclusión

Si bien los resultados en la determinación de las constantes indican que la formación de los complejos de PGT es favorable tanto con la β -CD como con su derivado, se utilizó la RAME β -CD para obtener y caracterizar los CI. La decisión se basa en que la CD modificada presenta una mayor solubilidad en agua con respecto a la CD natural (>500 mg/mL y 18,5 mg/mL, respectivamente [137]), además forma CI solubles del tipo A_L en los DSF en el rango de concentración estudiado.

Los complejos se obtuvieron mediante el método de *liofilización*. El protocolo base consistió en disolver RAME β -CD en un solvente acuoso y la PGT en un solvente orgánico, mezclar las soluciones, eliminar el solvente orgánico y finalmente liofilizar la mezcla para obtener un producto sólido. Se realizaron experimentos utilizando únicamente agua, para estudiar el efecto de un medio polar en la eficiencia de inclusión de la hormona. Además, se evaluaron como medios para la preparación de complejos: EtOH y MeOH. En estos solventes orgánicos, la solubilidad de la hormona es mayor y puede haber una competencia entre el medio y la cavidad hidrofóbica de la CD; sin embargo al mismo tiempo la mayor solubilidad permite tener más PGT disponible para formar complejos. Loftsson y colaboradores [35] propusieron que la adición de cosolventes puede mejorar las eficiencias, por lo que también se evaluó la mezcla H₂O:EtOH. Si bien la mayoría de los trabajos reportan relaciones molares 1:1 o 1:2 (PGT:CD), se realizaron experimentos con relaciones mayores con el objetivo de estudiar su efecto en el equilibrio de formación de los CI. Además se reportó la posible formación de estructuras distintas a los CI que podrían favorecer igualmente la solubilidad de la hormona [130].

Mediante las Ecuación 2.1 y 2.2 se calcularon las Eficiencias de Inclusión (E_{PGT}) y los Rendimientos de Inclusión (R_{PGT}) de la PGT, valores que se presentan en la Tabla 23. Cabe destacar que en general en la bibliografía no se reportan valores de eficiencias y mucho

menos de rendimientos. Sin embargo, son útiles para evaluar el método de inclusión y permiten, de alguna manera, realizar estimaciones en caso de querer escalar el proceso.

Tabla 23. Eficiencias de Inclusión (E_{PGT}) y Rendimiento de Inclusión (R_{PGT}) para los complejos de PGT.

COMPLEJO	PGT:RAME β -CD (mol:mol)	SOLVENTE		Ac:Org (v:v)	E_{PGT} (%)	R_{PGT} (%)
		Ac	Org			
C1 _g	1:1	H ₂ O	-	100:0	>99	32,47
C2 _g		H ₂ O	EtOH	50:50	95,23	47,95
C3 _g		-	MeOH	0:100	98,17	56,39
C4 _g		-	EtOH	0:100	91,10	54,80
C5 _g	1:5	H ₂ O	-	100:0	90,40	46,38
C6 _g		H ₂ O	EtOH	50:50	97,49	75,78
C7 _g		-	MeOH	0:100	>99	31,83
C8 _g	1:10	H ₂ O	EtOH	50:50	98,68	77,50
C9 _g	1:20	H ₂ O	EtOH	50:50	86,74	91,33

Las Eficiencias de Inclusión para todos los protocolos estudiados fueron mayores al 86 %, lo que indica que mediante el uso de la RAME β -CD se prepararon complejos con los que se aumentó la solubilidad acuosa de la hormona.

Los CI correspondientes a la relación molar 1:1 presentaron altas eficiencias de inclusión (>90 %), resultando la mayor la correspondiente al complejo preparado íntegramente en agua (C1_g). Los cuatro medios de preparación de complejos utilizados presentan distintas polaridades (agua > H₂O:EtOH-50:50 > MeOH > EtOH) (constantes dieléctricas $\epsilon=78,5; 55; 33$ y $24,3$; respectivamente). El agregado de un cosolvente como el etanol reduce la polaridad del medio y a la vez permite disponer de mayor cantidad de moléculas de PGT solubles disponibles para formar CI [10,35]. Sin embargo, la tendencia del fármaco a ingresar en la cavidad de las CDs disminuye ($K_{1:1}$ agua \gg $K_{1:1}$ H₂O:EtOH) con la disminución de la polaridad de los medios [35]. Es por ello que se observaron Eficiencias de Inclusión decrecientes: H₂O (>99 %), H₂O:EtOH (95,23 %) y EtOH (91,10 %). A pesar de estos resultados, los cuatro protocolos produjeron Rendimientos de Inclusión menores al 60 %. Valores de rendimientos bajos fueron reportados en sistemas similares (complejos 1:1 mol:mol PGT/trimetil β -CD) por Lahiani-Skiba y colaboradores [56]. Como se explicó más arriba, la polaridad del medio aumenta la cantidad de PGT soluble, por lo que moléculas de PGT que no formaron complejos de inclusión con las CDs durante la preparación, pudieron ser “arrastradas” hasta el producto liofilizado. El Rendimiento de Inclusión se determina disolviendo el liofilizado en fase móvil, de esta manera se cuantifica tanto la PGT en los complejos formados como la PGT “arrastrada”. Esto podría explicar el crecimiento de los rendimientos: agua (32,47 %); H₂O:EtOH (47,95 %) y EtOH (54,80 %), a medida que disminuye la polaridad.

Al compararse los complejos realizados en la mezcla H₂O:EtOH 50 % (C_{2g}, C_{6g}, C_{8g} y C_{9g}) se observa que a medida que se incrementó la relación molar PGT: RAME β -CD, aumentó la eficiencia de inclusión (excepto para el caso del C_{9g}). Es claro que, a mayor concentración de CD, el equilibrio $CD + PGT \leftrightarrow CI$ se ve más desplazado a la formación de los complejos, lo que se traduce en una mayor eficiencia de inclusión (C_{2g} = 95,23 %; C_{6g} = 97,49 % y C_{8g} = 98,68 %). En tanto que el rendimiento de inclusión de estos complejos también aumentó cuando fue mayor la relación molar (C_{2g} = 47,95 %; C_{6g} = 75,78 % y C_{8g} = 77,50 %), probablemente debido a la formación de otras estructuras, como complejos de no inclusión entre la PGT y la RAME β -CD o agregados de complejos que coexisten con los CI formados. Está reportada la formación de complejos de no inclusión entre las drogas y las CDs y la formación de autoagregados capaces de solubilizar fármacos y otras moléculas hidrófobas a través de un mecanismo de tipo micelar, efecto que se ve favorecido al aumentar la concentración de CDs [130,138]. Por otro lado, los resultados distintos obtenidos para el complejo C_{9g} (relación molar 1:20) podrían explicarse por la formación de complejos menos solubles (PGT:RAME β -CD, 1:2) que se ven favorecidos por el aumento de concentración de CDs. En general, en una solución acuosa sin concentraciones extremas, el complejo 1:1 es el predominante. Sin embargo, a mayor concentración de CD se observan estequiometrías 1:2, 2:3, etc. En esos casos, cualquier incremento adicional en la concentración de CD no da como resultado un aumento en la solubilidad, sino la precipitación de complejos de inclusión menos solubles [109,139]. En los DSF realizados en este trabajo no se llegaron a evaluar relaciones tan elevadas (como el caso del complejo C_{9g}), por lo que este fenómeno no se hizo evidente. Liu y colaboradores reportaron complejos menos solubles en sistemas similares con la PGT [61].

Cabe aclarar que para el MeOH (C_{3g} y C_{7g}) se observó un comportamiento diferente: el incremento de la cantidad de CD aumentó la eficiencia, pero disminuyó el rendimiento. En este caso quizás otras propiedades del sistema, distintas a polaridad y solubilidad, afectan el proceso. Por ejemplo la temperatura de ebullición del MeOH es 65 °C, mientras que la del EtOH es 79 °C. Además, el EtOH se utilizó junto con agua mientras que el MeOH se evaluó puro.

Teniendo en cuenta los buenos resultados obtenidos de eficiencia y rendimiento, se seleccionaron como condiciones de trabajo para la preparación de los complejos las correspondientes al experimento C_{6g}. De este modo, el medio de preparación fue la mezcla H₂O:EtOH 50 % v/v y la relación molar fue 1:5 PGT: RAME β -CD. Cabe destacar que en las sucesivas síntesis de complejos 1:5 PGT: RAME β -CD realizadas para los ensayos posteriores,

se obtuvieron valores similares de eficiencias y rendimientos ($97,49 \pm 3,74$ % y $75,78 \pm 9,55$ %, respectivamente).

En la Figura 26 se muestra el aspecto físico de dos soluciones de PGT en agua, cuando la droga está libre y cuando está formando parte de los CI. Al solubilizar la misma cantidad de PGT se puede apreciar que cuando se encuentra pura la solución se satura (al excederse su límite de solubilidad), mientras que cuando está incluida en las CDs se forma una solución limpia y transparente.



Figura 26. Comparación de la solubilidad de la PGT en agua cuando está libre (izquierda) y cuando está incluida en CD (derecha).

2.4.4. Caracterización de los complejos PGT/CD

2.4.4.1. Calorimetría diferencial de barrido

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica utilizada como método de rutina para determinar rápidamente la formación de los CI, ya que permite detectar cambios en propiedades físicas y/o químicas de una sustancia o sistema en función de la temperatura, mientras se somete a la muestra a un régimen de temperaturas programado y controlado. Se basa en comparar el comportamiento térmico de los componentes puros, sus mezclas físicas y el CI preparado, para tratar de encontrar diferencias evidentes entre ellos [37].

A fin de poder verificar la formación de los CI se estudió el comportamiento térmico de los componentes puros PGT y RAME β -CD, de la mezcla física y del CI liofilizado en una relación molar 1:1. Los termogramas obtenidos se presentan en la Figura 27.

El termograma de la PGT presenta un pico de fusión característico del fármaco a $130,9$ °C, similar a lo reportado en la bibliografía [56,57,140].

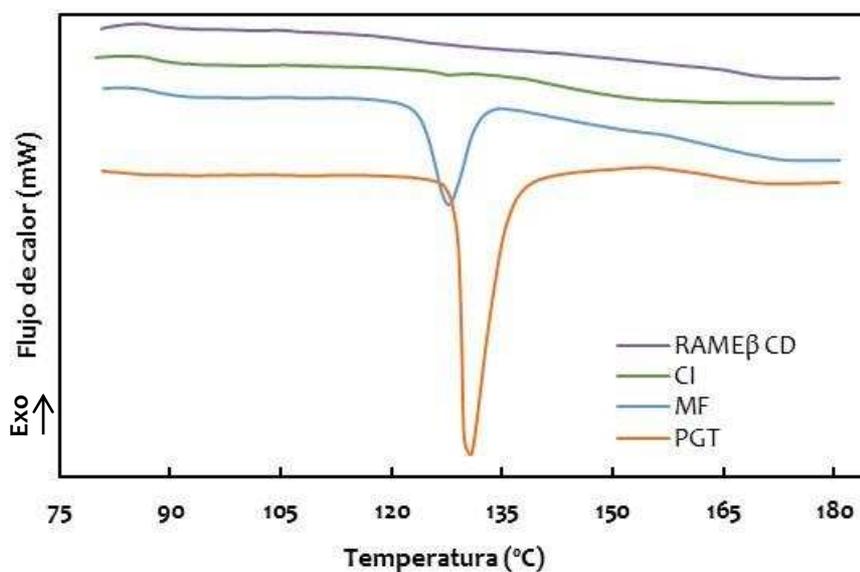


Figura 27. Termogramas obtenidos de experimentos de DSC. PGT (naranja), RAME β -CD (lila), mezcla física 1:1 (MF) (celeste) y el CI (PGT/RAME β -CD 1:1) (verde).

En el termograma del CI se observó la desaparición del pico endotérmico característico de la PGT. Este evento evidencia la formación de los CI mediante el reemplazo de las moléculas de agua y la inclusión de la PGT en la cavidad de la RAME β -CD [56,58].

En cuanto al termograma de la MF se observó un corrimiento del pico endotérmico correspondiente a la PGT a una temperatura ligeramente inferior (127,9 °C). Lahiani-Skiba y colaboradores postularon que este fenómeno podría explicarse por la existencia de una interacción muy débil a altas temperaturas entre la PGT y la CD [56].

2.4.4.2. Espectroscopía infrarroja

Se obtuvieron los espectros FT-IR de cada componente PGT y RAME β -CD, la mezcla física y el complejo liofilizado en una relación molar 1:1 (Figura 28). La Tabla 24 resume los picos característicos de cada muestra.

Los datos espectroscópicos obtenidos para la PGT coincidieron con los reportados en la bibliografía [15,56,58,140,141]. Los picos en 2943, 2908 y 2852 cm^{-1} corresponden al estiramiento del enlace C-H de grupos CH_2 y CH_3 . Los picos en 1699 y 1662 cm^{-1} corresponden a los estiramientos de los enlaces C=O de los grupos carbonilo del C20 y C3, respectivamente, mientras que el pico de 1614 cm^{-1} corresponde al estiramiento del enlace C=C de la PGT.

El espectro de la RAME β -CD también coincide con lo reportado en la bibliografía [2,114,115]. La banda intensa entre 3300-3500 cm^{-1} corresponde a la vibración de tensión del -OH, la vibración de los grupos -CH y - CH_2 aparece en la región comprendida

entre 2800-3000 cm^{-1} (2933 cm^{-1}) y en 2837 cm^{-1} se encuentran el pico correspondiente al grupo $-\text{OCH}_3$. En 1087 cm^{-1} se encuentra el pico del C-O-C y en 1047 cm^{-1} el pico correspondiente a C-O-H.

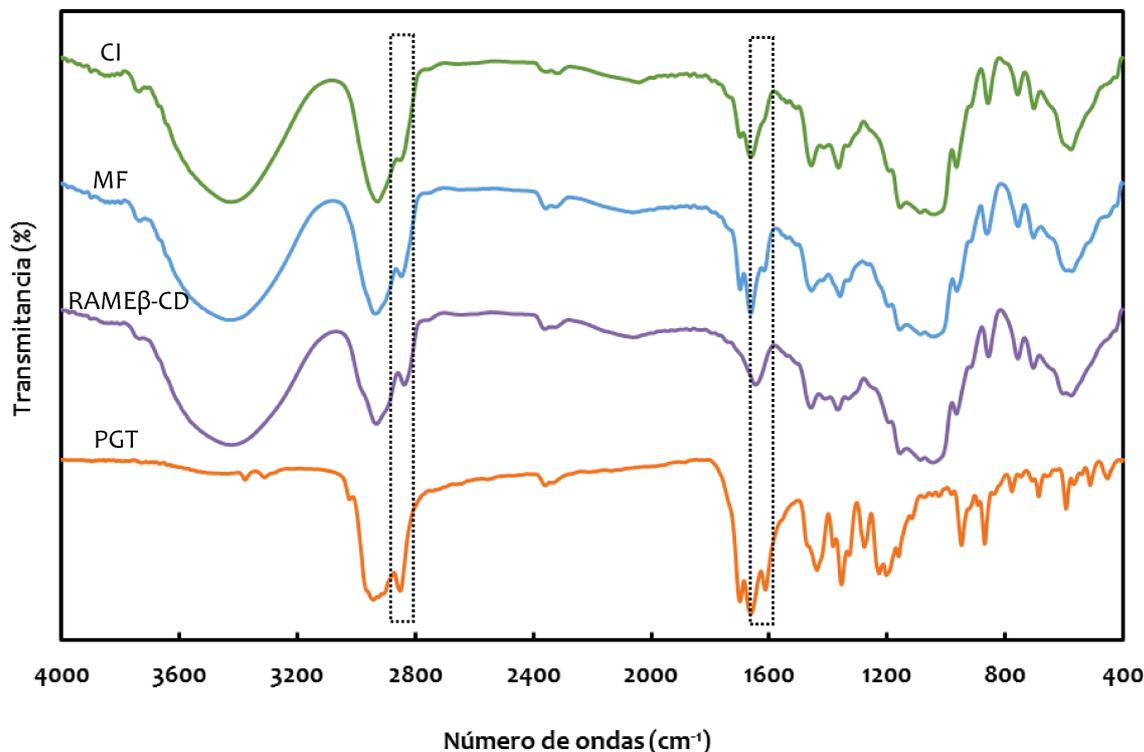


Figura 28. Espectros FT-IR de la PGT (naranja), la RAME β -CD (lila), la mezcla física 1:1 (MF) (celeste) y el complejo PGT/RAME β -CD 1:1 (CI) (verde).

Tabla 24. Frecuencias de absorción características de los espectros FT-IR de la PGT, RAME β -CD, MF y CI.

GRUPO FUNCIONAL	FRECUENCIA (cm^{-1})			
	PGT	RAME β -CD	MF	CI
O-H		3423	3425	3425
$-\text{CH}_3, -\text{CH}_2$	2943; 2908; 2852			
$-\text{CH}, -\text{CH}_3$		2933	2937	2929
$-\text{OCH}_3$		2837	2848	2852
C=O	1699; 1662		1699; 1662 (↓)	1699; 1662 (↓↓)
C=C	1614		1618	NP
C-O-C		1087	=	=
C-O-H		1045	1043	1043

↓: disminuyó en intensidad; = permaneció igual en intensidad y frecuencia; NP: no presente

El espectro de la MF fue similar a una superposición de los espectros de los compuestos puros con atenuación de los picos característicos de la PGT, lo que era esperable ya que el contenido de fármaco es cercano al 20 % p/p. Zoppetti y colaboradores reportaron una situación similar [15]. Los picos correspondientes al estiramiento de los grupos CH_2 y CH_3

(2943, 2908 y 2852 cm^{-1}) de la PGT se vieron solapados por las intensas bandas de la CD correspondientes al estiramiento de los CH, CH_2 y $-\text{OCH}_3$ (2933 y 2837 cm^{-1}), los cuales presentaron un desplazamiento a 2937 y 2848 cm^{-1} , respectivamente. Estos corrimientos podrían estar indicando la formación de enlaces puente de hidrógeno entre los hidrógenos del grupo metoxilo ($-\text{OCH}_3$) de la RAME β -CD y el oxígeno del grupo éster de la PGT. Algunos autores reportaron que, aunque son más débiles los enlaces puente de hidrógeno entre los grupos C-H (activados mediante átomos de oxígeno unidos al carbono, como es el caso de los grupos metoxilos) y O=C, estos tipos de interacciones pueden encontrarse en los CI, contribuyendo a su estabilidad estructural (además de las fuerzas de van der Waals y de los puentes de hidrógeno más fuertes O-H \cdots H) [142-144].

A diferencia de la MF, el espectro IR obtenido para el CI presentó una región de bandas levemente atenuadas alrededor de los enlaces C=O de la PGT por la inclusión en la RAME β -CD. Una posible explicación a esto es la disociación de los enlaces de hidrógeno intermoleculares de la PGT y la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares entre los grupos carbonilos de la PGT y los grupos hidroxilo de la RAME β -CD. Esta observación es consistente con la informada por varios autores [15,58,64,114]. Asimismo, el efecto observado para la MF en relación a la señal del grupo metoxilo se vio acrecentado en el CI (ya que se observó un corrimiento de 15 cm^{-1}). Además, se observó la desaparición del pico correspondiente al estiramiento C=C, sugiriendo una mayor interacción por puentes de hidrógeno con la PGT.

2.4.4.3. Resonancia magnética nuclear

La técnica de resonancia magnética nuclear de protones (^1H -RMN) permite estudiar el ambiente individual de cada núcleo atómico por medio de la cuantificación de los corrimientos químicos de varias señales de protones. Durante la formación de los complejos, el ambiente químico de algunos protones se modifica y esto da lugar a cambios en los corrimientos químicos de sus señales debido a efectos de protección o desprotección. Por ello es una técnica que posibilita caracterizar los complejos y demostrar la inclusión total o parcial en la cavidad [65,145,146].

La inclusión de la PGT en la cavidad de la RAME β -CD se evaluó por mediciones en los cambios de corrimientos químicos ($\Delta\delta$) de los protones en el complejo en relación a los componentes libres mediante la Ecuación 2.3. En la Tabla 25 se muestran las asignaciones de los corrimientos de los protones de la PGT pura y el corrimiento debido a la inclusión en la RAME β -CD obtenido en CDCl_3 . En la Figura 29 se muestra la asignación de la numeración

de los protones para cada molécula y en la Figura 30 los espectros de ^1H -RMN obtenidos para la PGT y el CI en CDCl_3 .

Tabla 25. Valores de desplazamiento químico (δ) de algunos de los protones de la PGT libre e incluida y los valores de las diferencias de corrimiento químico ($\Delta\delta$) debido a la formación del CI con la RAME β -CD.

PGT			
Protón	$\delta_{\text{Lib}}(\text{ppm})$	$\delta_{\text{Inc}}(\text{ppm})$	$\Delta\delta(\text{ppm})$
H4	5,721	5,734	0,013
CH ₃ (18)	0,655	0,664	0,009
CH ₃ (19)	1,175	1,182	0,007
CH ₃ (21)	2,112	2,121	0,009

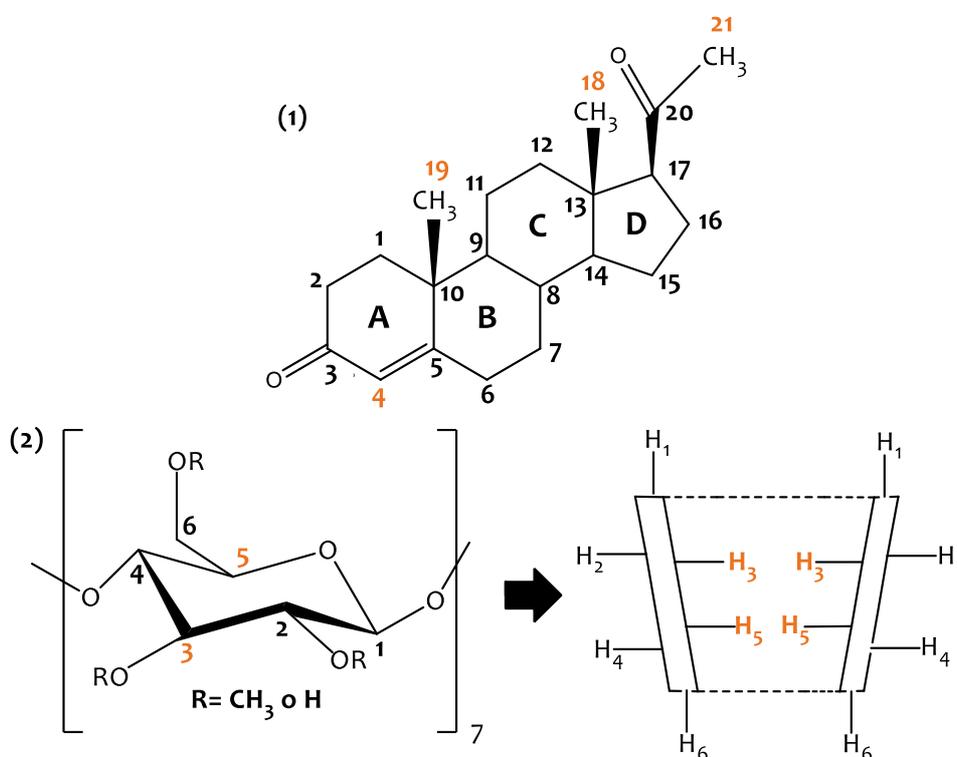


Figura 29. Estructura molecular de PGT (1) y RAME β -CD (2).

Se encuentra reportado que los protones internos H₃ y H₅ de las CDs y los protones 4, 18, 19 y 21 de la PGT (Figura 29) son los más afectados durante la inclusión en CDs [109,145,146]. Se calcularon los corrimientos químicos de la PGT en presencia y ausencia de la RAME β -CD y se pudo determinar que se produjeron cambios en las señales de los protones 4, 18, 19 y 21, lo que coincide con lo reportado en la bibliografía [60,62,146]. Sin embargo el mayor cambio se observó en el protón 4, indicando que el anillo A es el que está más implicado en la formación del CI [60].

Si bien se realizaron experimentos de ^1H -RMN para la RAME β -CD a fin de poder extraer conclusiones del comportamiento de sus protones cuando se encuentra libre y cuando se

encuentra formando un complejo, no se obtuvo un espectro bien resuelto, posiblemente debido a que no es un compuesto puro único sino una mezcla compleja de moléculas de β -CD metiladas aleatoriamente. Como resultado, sólo algunas de las señales pudieron ser identificadas sin ambigüedad. Se pudo observar que las señales de los H₃, H₅ e H₆ produjeron picos anchos producto de señales superpuestas de dichos protones. Por tal motivo, la formación de CI entre la PGT y la RAME β -CD se dedujo únicamente sobre la base de los cambios químicos del fármaco. Similares resultados fueron descriptos por otros investigadores que trabajaron con esta CD [147,148].

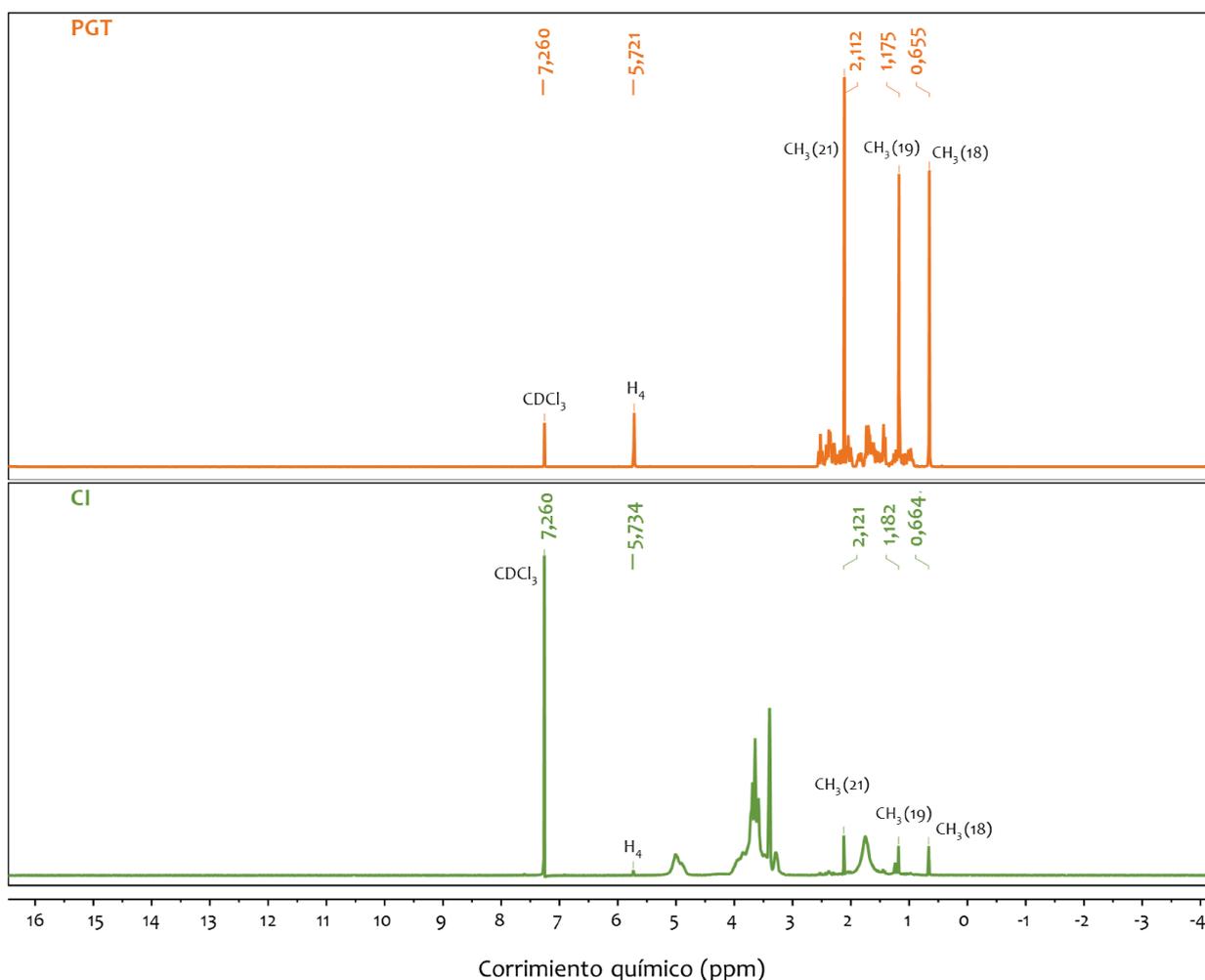


Figura 30. Espectros ¹H-RMN en CDCl₃ de la PGT (naranja) y del CI (verde).

2.4.4.4. Dispersión de luz dinámica

Se disolvió una cantidad de liofilizado en agua ultrapurificada para medir los tamaños de los CI mediante dispersión de luz dinámica (DLS) a 25 °C. También se determinaron los tamaños de la RAME β -CD en agua. En la Tabla 26 se muestran los resultados de diámetro

hidrodinámico (D_h) basado en intensidad y de índice de polidispersidad (PDI) de las muestras con sus respectivos errores.

Como se describió en el Capítulo 1, se obtuvieron dos poblaciones de diferente tamaño coexistentes en la RAME β -CD, correspondientes a la CD en forma de agregados (214,1 nm) y a la CD sin agregar (1,1 nm). Con respecto a los CI de la PGT se observaron también dos poblaciones, pero la población del Pico 1 presentó un tamaño ligeramente mayor a los agregados de la CD en agua (231,8 nm). Los valores de PDI fueron similares para ambas muestras.

Tabla 26. Resultados de diámetros hidrodinámicos (D_h) y de índice de polidispersidad (PDI).

MUESTRA	D_h (nm)		PDI
	Pico 1	Pico 2	
RAME β -CD	214,1 \pm 93,5	1,1 \pm 0,6	0,244 \pm 0,017
C6 _g	231,8 \pm 14,7	4960,7 \pm 280,0	0,199 \pm 0,011

Todos los valores presentan su correspondiente desviación estándar (\pm DS)

Se ha reportado que tanto las CDs como los CI pueden agregarse, pero en la mayoría de los casos, estos agregados permanecen pequeños [138]. En este caso, a diferencia de lo que ocurrió con los complejos del PTX donde los agregados crecieron hasta observarse macroscópicamente, los agregados formados de los CI de PGT/RAME β -CD no afectaron las propiedades ópticas de las soluciones preparadas (Figura 26). Estos resultados también explicarían las diferencias obtenidas en las caracterizaciones con respecto a los resultados de los complejos del PTX detallados en el Capítulo 1.

2.4.4.5. Microscopía electrónica de barrido

Se obtuvieron micrografías de la PGT, RAME β -CD, de la mezcla física y del CI (Figura 31) mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

La PGT presentó una morfología en forma de gránulos irregulares y la RAME β -CD en forma de partículas esféricas huecas y sus fragmentos. La mezcla física mostró una mezcla entre las partículas de PTG y de RAME β -CD, por lo que no se observaron interacciones entre ambas. En cambio, la morfología de las estructuras del CI se vio modificada, presentando placas con bordes regulares. Estructuralmente se observó una clara diferencia con los componentes aislados, lo que podría indicar la inclusión de la PGT dentro de la cavidad de la RAME β -CD.

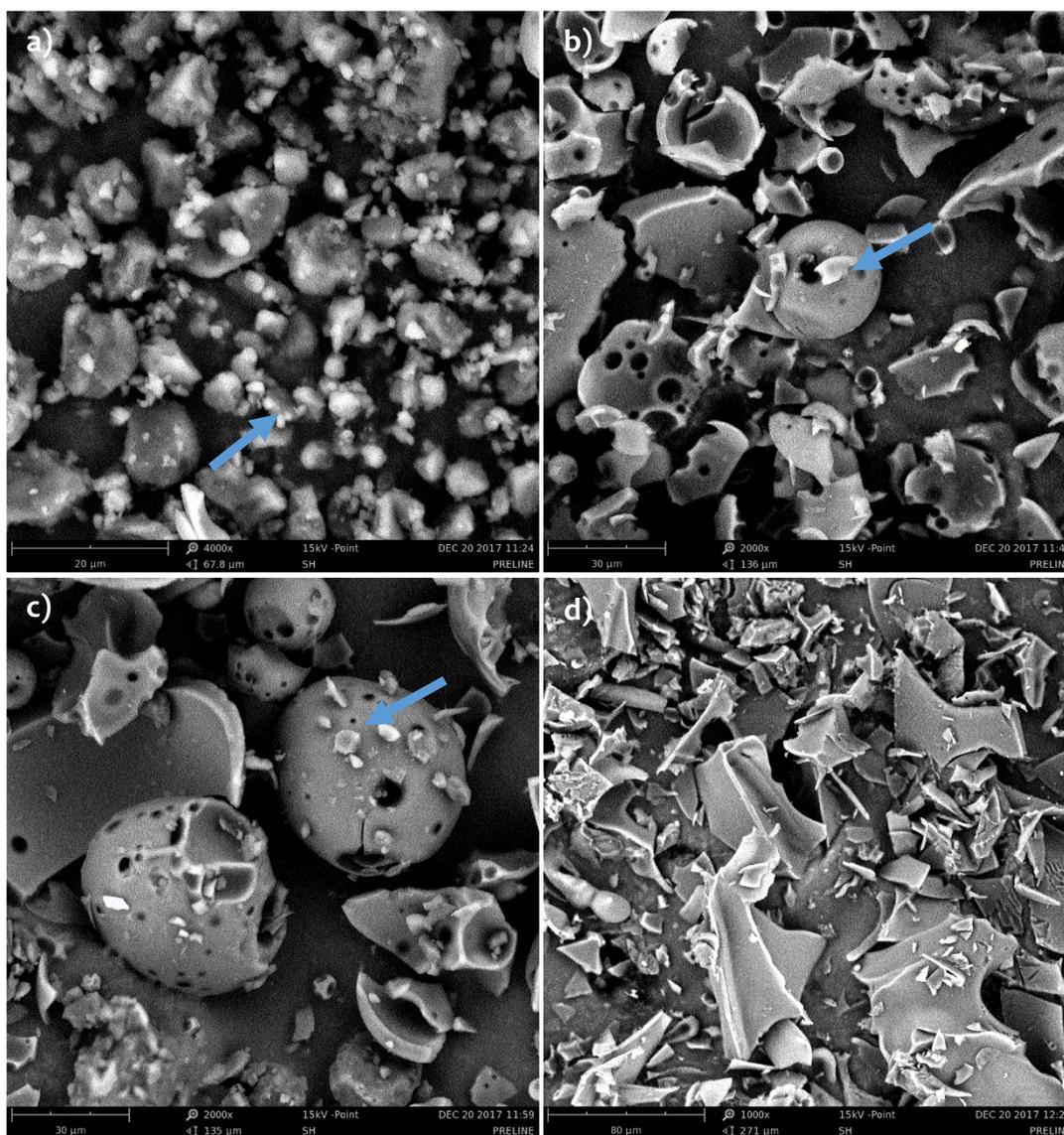


Figura 31. Micrográficas obtenidas por SEM de: **a)** PGT (4000x), **b)** RAMEβ-CD (2000x), **c)** mezcla física PGT/RAMEβ-CD (2000x) y **d)** CI PGT/RAMEβ-CD (1000x).

2.4.5. Conclusiones parciales

Los resultados obtenidos de los DSF entre la PGT y dos CDs (β -CD y RAME β -CD) en dos solventes diferentes permitieron calcular las $K_{1:1}$ y las Eficiencias de Encapsulación (CE) de cada caso.

Se ensayaron distintos protocolos de formación de complejos entre PGT y RAME β -CD y se seleccionó como solvente para la preparación la mezcla H₂O:EtOH y la relación molar 1:5 PGT:RAME β -CD. Se prepararon CI con buenos resultados de eficiencia y rendimiento. Los CI se caracterizaron utilizando las técnicas de DSC, FT-IR, ¹H-RMN, DLS y SEM.

CAPÍTULO 3 / GELES DE QUITOSANO

CAPÍTULO 3

GELES DE QUITOSANO

3.1. INTRODUCCIÓN

En capítulos anteriores se presentaron las características de la PGT y sus usos y aplicaciones en mujeres, como por ejemplo en la prevención del parto prematuro, el apoyo a la fase luteínica para la fertilización *in vitro* (FIV), en la terapia de reemplazo hormonal y en el tratamiento de la hiperplasia endometrial y el carcinoma endometrial primario. Actualmente existen diferentes opciones de formulación y administración de la PGT, por ejemplo la administración oral mediante cápsulas, pero sólo se generan bajas concentraciones endometriales del fármaco (debido al metabolismo de primer paso por el hígado). Otra forma de administración es mediante inyecciones intramusculares, que, aunque mejoran la absorción celular, provocan dolor e irritación en el lugar de la inyección, infecciones y posibles abscesos, lo que puede reducir el cumplimiento de la paciente y, por tanto, la eficacia terapéutica. La vía vaginal es otra de las opciones utilizadas y exhibe una absorción preferencial, ya que los fármacos son transportados directamente hacia el útero [17,18,41,59].

Con el advenimiento de la FIV y otros procedimientos de reproducción asistidos, la PGT vaginal volvió a ser el foco de interés, no solo por ser una alternativa a la PGT oral e intramuscular sino también por presentar una mejor biodisponibilidad local en el útero que daría como resultado un efecto endometrial local máximo y efectos sistémicos indeseables mínimos [23,149,150]. Dentro de las opciones para administrar PGT mediante esta vía se encuentran los geles vaginales. Comercialmente existen diferentes presentaciones, por ejemplo Crinone®. Este gel mostró tener una eficacia comparable a las formulaciones intramusculares, logrando una concentración endometrial de PGT estable con bajos niveles séricos, reduciendo a la vez los efectos sistémicos adversos [27,151-153]. Sin embargo, sus principales componentes son el carbopol y policarbófilo, polímeros reticulados de ácido acrílico que por poseer una alta adhesividad se acumulan en el tejido generando irritación vaginal [154]. Para evitar este efecto adverso se propone la utilización de geles conformados por quitosano (Q), un polímero lineal biodegradable y biocompatible. Estos geles son hidrofílicos por lo que el agregado de PGT a esta formulación alternativa se realizaría mediante complejos de inclusión con CDs.

3.2. OBJETIVOS

Los objetivos planteados en esta parte del trabajo de tesis fueron:

- Optimizar la preparación de geles termosensibles de Q.
- Caracterizar los geles optimizados mediante FT-IR y estudios reológicos.
- Incorporar complejos de inclusión PGT/RAME β -CD al gel optimizado.
- Caracterizar los geles optimizados con complejos PGT/RAME β -CD y compararlos con el gel comercial Crinone[®].
- Estudiar la liberación y absorción *in vitro* de PGT a través de tejido vaginal porcino.

3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1. Materiales

La PGT fue adquirida en Farmabase (Italia), pureza 99,2 %.

La RAME β -CD con un grado de sustitución (GS) de 12 fue adquirida en Cyclolab (Hungría).

El gel Crinone[®] 8 % (Merck-Serono) fue adquirido en una farmacia.

El Q fue adquirido en China Easter Group (China).

La sal β -glicerofosfato de sodio (GP) fue amablemente proporcionada por Surfactan S.A.

El ácido acético y ácido láctico fueron PA de pureza >99,5 % (Cicarelli).

El agua utilizada durante todo el trabajo fue producida con un sistema de purificación Milli-Q[®] (Millipore, EE.UU.).

La solución reguladora de fosfatos con EtOH (PBS-EtOH, 80:20 v:v, pH=7) se preparó mezclando 800 mL de PBS con 200 mL de EtOH (Cicarelli). El PBS se preparó disolviendo 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 0,2 g de KH₂PO₄, 1,44 g de Na₂HPO₄·2H₂O en 1 L de agua.

El fluido vaginal simulado (SVF, por sus siglas en inglés, pH=4,2) utilizado para realizar los ensayos de liberación fue preparado disolviendo: 3,51 g NaCl, 1,4 g de KOH, 0,222 g de Ca(OH)₂, 0,018 g de BSA, 2 g de ácido láctico, 1 g de ácido acético, 0,16 g de glicerol, 0,4 g de urea y 5 g de glucosa en 1 L de agua [155].

Los reactivos utilizados para preparar el PBS y el SVF fueron de grado analítico.

El tejido vaginal porcino, obtenido a partir de hembras de entre 5 y 6 meses de edad, fue donado por el frigorífico Figan (Santa Fe).

El diseño experimental, análisis de datos y los cálculos de la función deseabilidad se realizaron con el software Stat-Ease Design-Expert versión de prueba 7.0.0.

3.3.2. Preparación de geles de quitosano

La metodología consistió en disolver el Q y el GP en sus correspondientes solventes (ácido acético 0,15 M y agua ultrapura, respectivamente). Luego se realizó la mezcla de las soluciones en una proporción 3:1 Q:GP a la temperatura correspondiente durante un tiempo determinado para obtener las soluciones formadoras de gel.

Una vez preparadas las mezclas se evaluaron las siguientes respuestas: el pH de la solución formadora de gel (pH), el tiempo de formación del hidrogel (t_{gel}) a temperatura ambiente (TA) (25 °C) y a 37,5 °C, y la masa residual (% m_R).

El valor de pH de cada solución formadora de gel antes de que gelifique se determinó con un medidor de pH (Altronix TPX-III). Para determinar el t_{gel} se empleó el método de inversión de tubo de ensayo. Para esto, la solución formadora de gel se colocó en un tubo y se dejó reposar a TA o se sumergió en un baño térmico (37,5 °C). A distintos intervalos de tiempo, el tubo se invirtió para determinar la fluidez o no sobre las paredes del mismo durante 30 s [156]. Para la evaluación de la m_R [89], una porción de cada gel obtenido, se secó cuidadosamente con papel tissue para eliminar el exceso de agua de la superficie y se pesó. Seguidamente se la colocó en un recipiente con PBS que se mantuvo a 37,5 °C y 100 rpm de agitación en agitador orbital. Luego de 7 días los geles se retiraron de los recipientes, se secaron cuidadosamente y se volvieron a pesar.

3.3.2.1. Etapa preliminar de screening

Se realizó un diseño experimental Factorial Completo (2^4), que consistió en la ejecución de 16 experimentos de preparación de geles⁸. Los factores que se analizaron fueron: concentración de Q (C_Q), concentración de GP (C_{GP}), temperatura de mezcla (T_{mezcla}) y tiempo de mezcla de las soluciones (t_{mezcla}). Cada factor (cuantitativo) se evaluó a 2 niveles, los cuales fueron seleccionados en base a información reportada en la bibliografía y experimentos previos. Las concentraciones de Q evaluadas fueron 1,67 y 2,67 % p/p, y de GP fueron 25,0 y 35,0 % p/p. La temperatura de mezclado fue 4 y 25 °C, y el tiempo de mezclado 1 y 3 min. Todos los experimentos se realizaron en orden aleatorio para minimizar los efectos de los factores no controlados que podrían introducir errores en las mediciones. Se realizó un test estadístico ANOVA a los datos experimentales obtenidos.

⁸ El diseño factorial completo a dos niveles requiere 2^f ejecuciones, donde f es el número de factores elegidos.

3.3.2.2. Optimización

Los factores considerados significativos en la etapa de *screening* fueron utilizados para realizar un diseño Central Compuesto (DCC), el cual permitió adicionar más niveles al rango de los factores y de esta manera explorar mejor el espacio del diseño. El DCC consistió en la realización de 13 experimentos de formación de geles, de acuerdo a la combinación de las variables independientes seleccionadas, para desarrollar modelos estadísticos de cada una de las respuestas estudiadas. Todas las soluciones formadoras de gel se prepararon siguiendo la metodología descrita en el apartado anterior.

Finalmente, para optimizar simultáneamente todas las respuestas, se utilizó la función Deseabilidad (D). Todos los experimentos se realizaron en orden aleatorio para minimizar los efectos de los factores no controlados que podrían introducir errores en las mediciones.

3.3.3. Caracterización del sistema optimizado

3.3.3.1. Espectroscopía infrarroja

Se realizaron estudios de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) en un espectrómetro FTIR-8201 PC (Shimadzu), en el rango de frecuencia $400-4000\text{ cm}^{-1}$ a una resolución de 8 cm^{-1} y 40 escaneos por espectro. Se prepararon las muestras en discos de KBr previamente secado en estufa a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h para asegurar que los picos correspondientes al agua no interfieran con aquellos pertenecientes a los compuestos en estudio. Se realizaron mediciones para cada componente Q y GP, y para el gel previamente secado en estufa a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. La concentración de cada componente fue del 1 % en los discos de KBr a fin de obtener espectros más claros y definidos.

3.3.3.2. Estudios reológicos

Se realizaron estudios del comportamiento reológico de la solución formadora de gel con un reómetro Haake Rheo Stress RS80 (Thermo Fisher Scientific). Se obtuvieron valores del módulo elástico (G') y del módulo viscoso (G'') en función de la temperatura mediante mediciones oscilatorias a una frecuencia de 1 Hz. La temperatura se varió a una velocidad de $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Cada punto fue adquirido cada 28 segundos.

3.3.4. Geles de quitosano con complejos de inclusión

Se prepararon geles de Q con complejos de inclusión PGT/RAME β -CD de acuerdo a las condiciones óptimas obtenidas del estudio estadístico. En primera instancia se disolvió el Q en ácido acético 0,15 M y el GP en agua ultrapura. Luego a 0,25 g de GP se le agregó una

masa de CI de PGT/RAME β -CD de forma de agregar 0,65 mg de PGT, mezclando durante 10 s. A esa solución se le agregó 0,75 g de solución de Q y se mezcló durante 1 min. La mezcla se dejó gelificar a 37,5 °C.

3.3.4.1. Caracterización de geles de quitosano con complejos de inclusión

Los geles de Q con complejos de inclusión PGT/RAME β -CD fueron caracterizados mediante FT-IR como se describió en el apartado 3.3.3.1. También se realizaron experimentos con geles con PGT libre. Asimismo, se realizaron observaciones microscópicas de los geles de Q con y sin CI y con PGT libre, y del gel comercial Crinone[®] mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Las muestras fueron congeladas y liofilizadas antes de las observaciones.

Finalmente se determinó el comportamiento del gel de Q con CI y del gel comercial en SVF (pH=4,2). Se realizaron dos pruebas. En la primera se colocaron los geles en recipientes tipo canastas que luego fueron sumergidos en 20 mL de SVF, los cuales se mantuvieron a 37 °C. A distintos tiempos se retiraron las canastas con los geles y se pesaron, determinando los cambios en los pesos en función del tiempo. La segunda prueba consistió en seguir la técnica propuesta por Almomen y colaboradores [17]. Los geles (0,75 g) se colocaron en viales cilíndricos planos a los que se les agregó en la parte superior un volumen de SVF (0,25 mL). A distintos tiempos el líquido fue retirado con pipeta, se determinó el peso de cada dispositivo y se agregó medio fresco.

3.3.5. Experimentos de liberación *in vitro*

Los experimentos de liberación se realizaron en una celda de difusión vertical de Franz marca PermeGear Inc. (EE. UU.), con un área de difusión de 1,77 cm² y 12,0 mL de volumen de compartimiento receptor.

El tejido vaginal porcino fue donado por el frigorífico Figan de la ciudad de Santa Fe. Inmediatamente después de sacrificadas las hembras, se extrajo el tejido vaginal y se lo colocó en PBS hasta su llegada al laboratorio, donde se fraccionó y se almacenó a -80 °C hasta su utilización. El día previo al experimento, se descongeló y se separó la mucosa epitelial. El resto del tejido se descartó.

Los estudios de liberación se realizaron adaptando la técnica descrita por Monteiro Machado y colaboradores [157]. La mucosa epitelial se colocó entre ambos compartimientos de la celda con su cara luminal hacia el compartimiento donante y se dejó estabilizar durante 24 h en PBS-EtOH 80:20 (v:v). El día del experimento se reemplazó la solución del compartimiento donante por el sistema de liberación: solución de PGT,

solución de CI PGT/RAME β -CD, gel con CI o gel comercial. Las soluciones se prepararon en SVF-EtOH 80:20 (v:v). Sobre los geles se colocaron 0,25 mL de SVF para imitar las condiciones del medio vaginal y evitar que el gel se seque. En todos los casos el compartimiento donante se cubrió para evitar la evaporación de la solución. El compartimiento receptor se agitó de forma continua manteniendo la temperatura a 37,5 °C con un baño térmico. El agregado de EtOH a la mezcla del compartimiento receptor se realizó para asegurar la solubilidad de la hormona. Las concentraciones iniciales de PGT en los cuatro dispositivos fueron iguales.

Se tomaron muestras de 200 μ L de volumen a intervalos regulares de tiempo (0 - 170 h) con reemplazo del mismo volumen de medio fresco. La cantidad de PGT se cuantificó mediante HPLC como se describió anteriormente (Capítulo 2, inciso 2.3.2). Cada ensayo se realizó por triplicado.

El porcentaje de PGT permeada acumulada a través del tejido (%) se representó como función del tiempo (t).

Se compararon los perfiles de permeación utilizando los factores de diferencia (f_1) y de similitud (f_2), los cuales comparan todos los puntos de dos curvas [158]. Estos factores se calculan mediante las siguientes ecuaciones:

$$f_1 = \frac{\sum_{t=1}^n (R_t - T_t)}{\sum_{t=1}^n R_t} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 3.1}$$

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \cdot 100 \right\} \quad \text{Ecuación 3.2}$$

Donde:

n es el número de muestras.

R_t y T_t son los porcentajes de droga liberado del producto de referencia y del producto que se quiere evaluar, respectivamente, para cada tiempo t .

Dos perfiles se consideran equivalentes cuando el valor de f_1 es menor de 15 y el de f_2 se encuentra en el rango 50-100 [158].

3.4. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

3.4.1. Preparación de geles de quitosano

Una manera muy efectiva de mejorar el valor de la investigación y disminuir el tiempo de experimentación es llevar a cabo un proceso de optimización a través de la utilización de un diseño experimental. Un resultado o respuesta puede estar influenciado por una amplia

variedad de factores, por esta razón se realiza un *screening* en las etapas iniciales del diseño experimental. Una vez que se determinan cuáles son los factores que influyen de manera significativa en la respuesta, la siguiente etapa es el proceso de optimización para encontrar las condiciones que producen el mejor resultado o el resultado más cercano al deseado.

Una vez preparadas las mezclas formadoras de geles se evaluaron las siguientes respuestas: el *pH de la solución formadora de gel*, el *tiempo de formación del gel a TA* y a $37,5^{\circ}\text{C}$, y la *masa residual*. Estas respuestas fueron seleccionadas porque el objetivo es utilizar el gel como sistema de liberación de drogas. De este modo, los geles deben ser compatibles con el pH fisiológico, la solución formadora de gel debe estar en estado líquido a TA y presentar una transición al estado gel a temperatura corporal, el tiempo de esta transición no debe ser excesivo para evitar pérdida de la formulación desde el lugar de aplicación y el gel (m_R) debe permanecer en ese sitio el mayor tiempo posible.

3.4.1.1. Etapa preliminar de *screening*

El diseño factorial completo construido para determinar los principales factores involucrados en las evaluaciones de las respuestas requirió un total de 16 experimentos. Cada uno de ellos consistió en la preparación de una solución formadora de gel como se describió en el apartado 3.3.2.1. A los datos experimentales obtenidos se les realizó un ANOVA. Las combinaciones de los factores evaluados en el diseño y los resultados de los experimentos se muestran en la Tabla 27. En la Tabla 28 se muestran los valores de probabilidad obtenidos para cada factor, indicando entre paréntesis el tipo de influencia sobre la respuesta (positiva o negativa). Un factor se consideró significativo cuando su probabilidad fue menor a 0,05 y no significativo cuando su probabilidad fue mayor a 0,1.

Se observó que el *pH de la solución formadora de gel* aumentó con el incremento de la concentración de Q y de GP, y disminuyó cuando se incrementó la temperatura de la mezcla. Supper y colaboradores reportaron resultados similares en su estudio [159]. Estos autores encontraron que el aumento de la concentración de GP conducía al aumento del pH del sistema, lo que a su vez provocaba la reducción de la protonación del Q y de la repulsión electrostática intermolecular, favoreciendo la transición solución a gel. Además, el aumento de la concentración de polímero conducía a una transición más rápida, debido a un mayor número de entrecruzamientos Q-Q [159].

En cuanto a las respuestas *tiempo de formación del gel a TA* y a $37,5^{\circ}\text{C}$, se encontró que tanto el incremento de la concentración de GP como el de la temperatura de mezcla disminuían los tiempos a ambas temperaturas. Estos resultados también coinciden con los de Supper y colaboradores [159]. De la misma forma, se obtuvieron resultados similares

utilizando como entrecruzante la α -D-glucosa 1-fosfato en lugar de GP, ya que su adición a una solución de Q provocó el aumento del pH y la disminución del tiempo de transición [160].

Tabla 27. Combinaciones de los factores y respuestas obtenidas para el diseño factorial completo.

EXPERIENCIA	FACTOR				RESPUESTA			
	C _Q (% p/p)	C _{GP} (% p/p)	T _{mezcla} (°C)	t _{mezcla} (min)	pH	t _{gel a} 25 °C (min)	t _{gel a} 37,5 °C (s)	m _R (%)
1	1,67	25,0	25,0	3	6,64	20	180	81,98
2	1,67	35,0	4,0	3	6,87	90	180	78,89
3	2,67	25,0	25,0	1	6,81	60	240	51,42
4	1,67	25,0	4,0	1	6,78	90	210	86,63
5	1,67	35,0	25,0	3	6,75	40	105	57,23
6	2,67	25,0	25,0	3	6,71	45	165	87,03
7	2,67	35,0	25,0	1	6,77	18,75	150	77,59
8	2,67	35,0	4,0	3	6,94	52	150	56,49
9	2,67	35,0	25,0	3	6,76	240	90	74,54
10	1,67	35,0	4,0	1	6,86	80	150	81,87
11	1,67	25,0	25,0	1	6,76	10	210	58,88
12	1,67	35,0	25,0	1	6,71	30	150	64,61
13	1,67	25,0	4,0	3	6,79	110	240	89,7
14	2,67	35,0	4,0	1	6,84	39	165	68,26
15	2,67	25,0	4,0	1	6,83	80	180	60,08
16	2,67	25,0	4,0	3	6,83	86	240	54,95

C_Q y C_{GP} son la concentración de Q y GP respectivamente, T_{mezcla} y t_{mezcla} la temperatura y tiempo de mezcla de las soluciones de Q y GP, t_{gel} es el tiempo de formación del gel y m_R es la masa residual

Tabla 28. Resultados ANOVA del diseño factorial completo.

RESPUESTA	VALOR DE PROBABILIDAD p				
	MODELO	C _Q (% p/p)	C _{GP} (% p/p)	T _{mezcla} (°C)	t _{mezcla} (min)
pH	0,0037	0,0874 (+)	0,072 (+)	0,0006 (-)	0,6983
t _{gel a} 25 °C (min)	0,0002	0,1721	0,0147 (-)	<0,0001 (-)	0,1026
t _{gel a} 37,5 °C (s)	0,01	0,2637	0,0015 (-)	0,0024 (-)	0,1801
m _R (%)	0,0091	0,0293 (-)	0,0360 (-)	0,2861	0,2555

t_{gel} es el tiempo de formación del gel, m_R es la masa residual, C_Q y C_{GP} son la concentración de Q y GP respectivamente, T_{mezcla} la temperatura de mezcla de las soluciones de Q y GP

Para el porcentaje de masa residual, un incremento en la concentración de Q y de GP disminuyó el valor de la respuesta.

Por su parte se vio que en ningún caso el tiempo de mezcla tuvo alguna influencia significativa en el valor de las respuestas estudiadas (p>0,05).

Los valores de probabilidad obtenidos para el modelo, menores a 0,05, indicaron que fue correctamente seleccionado para relacionar los factores independientes con la respuesta.

De esta manera, la concentración de Q, la concentración GP y la temperatura de mezcla fueron los factores que resultaron significativos en estos experimentos y por consiguiente, se consideraron para la etapa de optimización en el DCC.

3.4.1.2. Optimización

El DCC consistió en 13 experimentos de formación de geles, preparados de acuerdo a la combinación de las variables independientes seleccionadas, en los siguientes rangos: concentración de Q: 1,67 - 2,67 % p/p; concentración de GP: 22,9 - 37,1 % p/p y temperatura de mezcla: 4,0 - 25,0 °C. Dado que el tiempo de mezcla no resultó un factor significativo en el rango estudiado durante la etapa de screening, éste se fijó en 1 min, el cual corresponde al valor mínimo estudiado en el diseño de selección de factores. En la Tabla 29 se muestran las combinaciones de los factores evaluados en el diseño y los resultados de los experimentos.

Tabla 29. Combinaciones de los factores y respuestas obtenidas para el DCC.

EXPERIENCIA	FACTOR			RESPUESTA			
	C _Q (% p/p)	C _{GP} (% p/p)	T _{mezcla} (°C)	pH	t _{gel a} 25 °C (min)	t _{gel a} 37,5 °C (s)	m _R (%)
1	1,80	25,0	7,08	6,76	ND	300	64,55
2	2,53	25,0	21,92	6,72	80	300	41,48
3	2,53	35,0	7,08	6,90	100	270	39,36
4	2,17	37,1	14,50	6,94	10	135	58,94
5	2,17	30,0	25,00	6,75	83	225	62,41
6	2,17	30,0	14,50	6,85	35	165	52,88
7	2,17	30,0	14,50	6,84	33	150	44,72
8	1,67	30,0	14,50	6,84	52	180	57,38
9	2,17	22,9	14,50	6,86	35	210	55,06
10	2,67	30,0	14,50	6,87	25	165	46,94
11	1,80	35,0	21,92	6,83	85	165	41,97
12	2,17	30,0	4,00	6,77	60	225	91,91
13	2,17	30,0	14,50	6,88	30	135	48,26

C_Q y C_{GP} son la concentración de Q y GP respectivamente, T_{mezcla} la temperatura de mezcla de las soluciones de Q y GP, t_{gel} es el tiempo de formación del gel, m_R es la masa residual y ND es no determinado

Luego, mediante la utilización del software Stat-Ease Design-Expert se plantearon los modelos que describen la relación entre los factores independientes y cada respuesta. Los coeficientes de cada modelo se calcularon mediante regresión múltiple con eliminación por retroceso. Este procedimiento consistió en realizar la regresión con todos los términos del modelo y luego quitar el término con el valor de probabilidad parcial más alto. Finalmente, el proceso se detuvo cuando el valor de probabilidad del siguiente término satisfizo el valor

de α especificado. Los coeficientes de cada modelo fueron validados por ANOVA. La Tabla 30 muestra los resultados del ANOVA correspondientes al ajuste de los modelos polinómicos para las cuatro respuestas estudiadas.

Los modelos seleccionados para cada respuesta fueron los que mejor explicaron la relación entre la respuesta y los factores estudiados (Tabla 30). Los valores de probabilidad de los modelos fueron menores que 0,05, por lo que los términos de cada uno resultaron significativos. Por otro lado, los valores de probabilidad de la falta de ajuste no fueron significativos ($p > 0,05$) e indicaron que los modelos elegidos ajustaron de manera satisfactoria los datos experimentales con un nivel de significancia del 95 %. El estadístico R^2 indicó en todos los casos, que los modelos explican un porcentaje mayor al 90 % de la variabilidad de la respuesta, señalando que los modelos pueden ser usados para explorar el espacio del diseño.

Tabla 30. Resultados ANOVA de los modelos ajustados.

RESPUESTA	MODELO	R ²	MODELO		FALTA DE AJUSTE	
			p	Conclusión	p	Conclusión
pH	Cuadrático reducido	0,9194	0,0046	Significativo	0,3870	No significativa
t _{gel} a 25 °C (min)	Cuadrático reducido	0,9941	0,0029	Significativo	0,1264	No significativa
t _{gel} a 37,5 °C (s)	Cúbico reducido	0,9680	0,0096	Significativo	0,3415	No significativa
m _R (%)	Cúbico reducido	0,9223	0,0042	Significativo	0,7195	No significativa

t_{gel} es el tiempo de formación del gel y m_R es la masa residual

En la Tabla 31 se muestran los valores de probabilidad y de los coeficientes para los modelos polinómicos ajustados. Se mantuvieron términos irrelevantes para ajustar el modelo jerárquico. Por esta razón, los términos jerárquicos se añadieron después de la regresión de eliminación por retroceso y se incluyeron en la ecuación final del modelo. La jerarquía del modelo mantiene las relaciones entre los factores principales, interacciones de dos factores, interacciones de tres factores, etc. A modo de ejemplo se presenta el modelo ajustado obtenido para el pH:

$$\text{pH} = 6,784 - 0,133 * C_Q - 0,019 * C_{GP} + 0,057 * T_{\text{mezcla}} + 0,012 * C_Q * C_{GP} - 0,013 * C_Q * T_{\text{mezcla}} - 1,031 \times 10^{-3} * (T_{\text{mezcla}})^2$$

Posteriormente, para determinar las configuraciones de los factores experimentales que provean el mejor valor de respuesta deseado, se llevó a cabo un procedimiento de optimización simultánea de las cuatro respuestas utilizando la función Deseabilidad. Esta función permite resumir los objetivos del análisis de una superficie de respuesta en una sola ecuación, donde a cada respuesta se le asigna un valor de deseabilidad individual d_i , entre 0 (menos deseable) y 1 (más deseable). La Deseabilidad general (D), que también varía entre 0 a 1, se determina combinando estos valores de deseabilidad individuales y cuando se

maximiza es posible obtener el conjunto óptimo de factores. Sin embargo, el objetivo del procedimiento de optimización no es obtener un valor de deseabilidad de exactamente 1, sino más bien obtener un conjunto de valores de respuesta que cumplan ciertos objetivos, especificados por una aplicación práctica dada. En este trabajo, el objetivo de la optimización fue encontrar un conjunto de condiciones experimentales que permita alcanzar los criterios que se muestran en la Tabla 32, para cada una de las respuestas individuales. Asimismo, se establecieron los límites inferiores y superiores para cada respuesta y se les asignó un nivel de importancia, dándole mayor peso al tiempo de formación del gel.

Tabla 31. Resultados ANOVA de los modelos ajustados: valor de probabilidad y de los coeficientes de cada término.

FUENTE	pH		t_{gel} a 25 °C (min)		t_{gel} a 37,5 °C (s)		m_R (%)	
	<i>p</i>	Coefficiente estimado	<i>p</i>	Coefficiente estimado	<i>p</i>	Coefficiente estimado	<i>p</i>	Coefficiente estimado
intercepto		6,784		-2207,700		5698,228		-373,116
A	0,3579	-0,133	0,0202	695,349	0,5904	-2599,332	0,006	274,050
B	0,0707	-0,019	0,0248	65,135	0,0432	-173,871	-	-
C	0,6032	0,057	0,0309	77,101	1	-312,661	-	-
AB	0,2954	0,012	0,0080	-14,491	0,1123	83,561	0,0249	-10,815
AC	0,1059	-0,013	0,0010	-19,836	0,3214	148,696	0,0115	-25,503
BC	-	-	0,0011	-1,419	0,0668	9,491	-	-
A²	-	-	-	-	-	-	-	-
B²	-	-	0,0384	-0,248	-	-	0,0520	0,138
C²	0,0011	-1,031 x 10 ⁻³	0,0019	0,331	0,0129	0,564	0,0056	0,110
ABC	-	-	-	-	0,0051	-4,778	0,0019	0,942

t_{gel} es el tiempo de formación del gel y m_R es la masa residual. A es C_Q (% p/p), B es C_{GP} (% p/p) y C es T_{mezcla} (°C)

Tabla 32. Criterios de optimización establecidos.

RESPUESTA	Criterio	Importancia	Límite menor	Límite superior	Valor experimental optimizado
pH	Maximizar	3	6,72	6,94	6,92
t_{gel} a 25 °C (min)	Maximizar	5	10	100	39
t_{gel} a 37,5 °C (s)	Minimizar	5	135	300	142
m_R (%)	Maximizar	3	39,36	64,55	63,44

t_{gel} es el tiempo de formación del gel y m_R es la masa residual

Para la respuesta valor de *pH* de la solución formadora de gel, el criterio fue maximizar a fin de obtener un pH lo más próximo posible al valor fisiológico. El criterio para el tiempo de formación del gel a 25 °C fue maximizar para retrasar la transición solución a gel a TA y obtener así tiempos de manipulación y administración adecuados; mientras que el criterio para el tiempo de formación del gel a 37,5 °C fue minimizar para evitar pérdida de la solución

hacia fuera del sitio de aplicación. La *masa residual* se maximizó para permitir que el gel permaneciera en el sitio de aplicación tanto tiempo como fuera posible y contribuya a la liberación controlada.

Las condiciones experimentales correspondientes a un máximo en la función Deseabilidad ($D = 0,761$) fueron: 2,0 % p/p para la concentración de Q, 35,0 % p/p para la concentración de GP y 8,12 °C para la temperatura de mezcla. Las superficies de respuesta obtenidas para la función Deseabilidad se muestran en la Figura 32. Estos gráficos se obtuvieron para un dado par de factores, manteniendo el otro fijo en su valor óptimo.

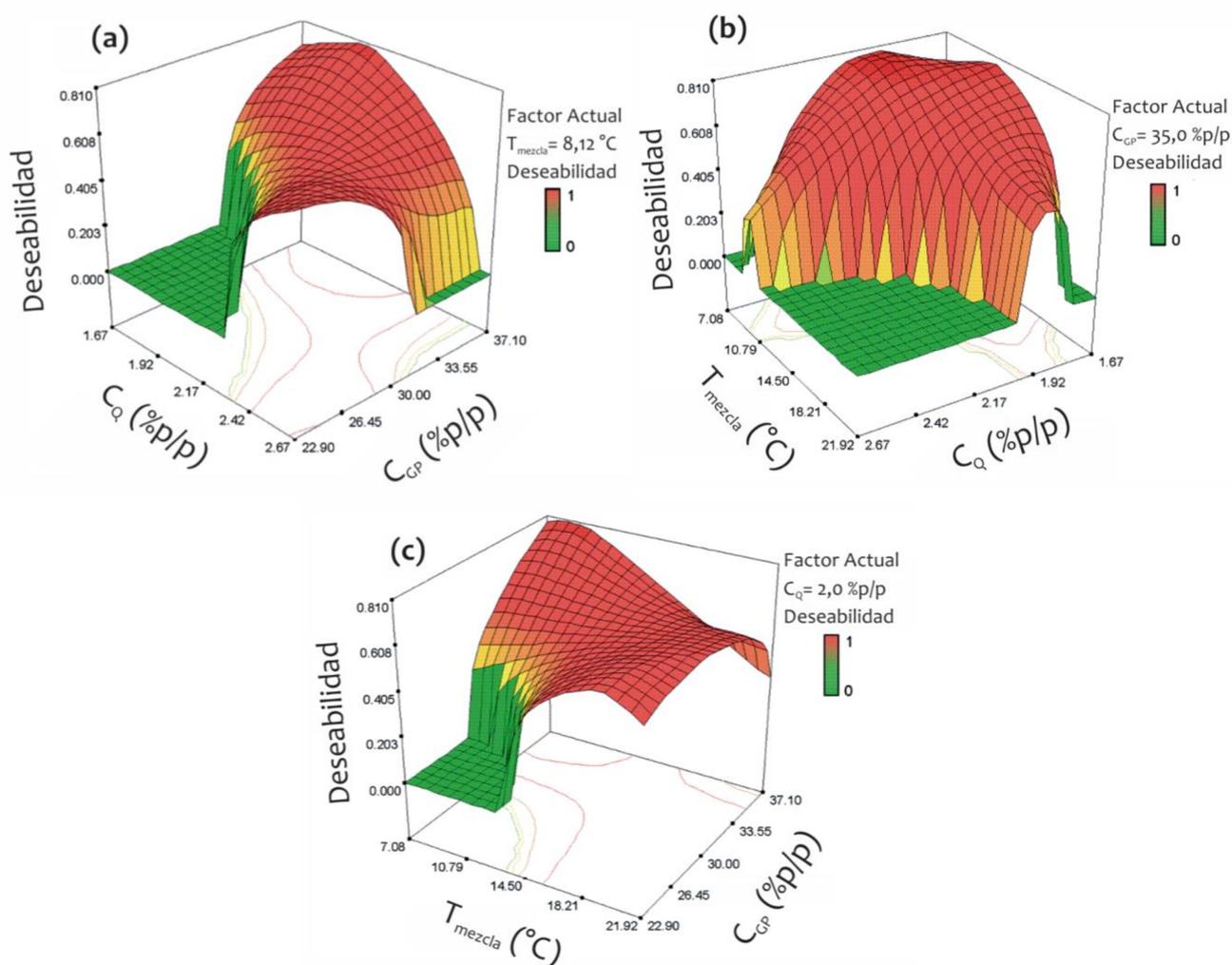


Figura 32. Superficie de respuesta correspondiente a la función deseabilidad para un par de factores dados, manteniendo en su valor óptimo a: **a)** T_{mezcla} ; **b)** C_{GP} y **c)** C_Q .

Se observó que la Deseabilidad fue elevada para una concentración de GP alta y para los niveles más bajos de concentración de Q y de temperatura de mezcla.

Los valores teóricos de respuestas correspondientes al conjunto seleccionado de condiciones fueron: 6,83 para el pH de la solución formadora de gel, 66,85 min para el

tiempo de formación de gel a 25 °C, 135,05 s para el tiempo de formación a 37,5 °C y 65,8 % para la masa residual. Estas respuestas teóricas se corroboraron experimentalmente preparando la solución formadora de gel optimizada de acuerdo con las condiciones experimentales correspondientes al máximo en la función Deseabilidad. El experimento se realizó por triplicado. En la Tabla 32 se muestran los resultados experimentales obtenidos para cada respuesta con la formulación optimizada.

Para la respuesta *pH de la solución formadora de gel*, el resultado experimental obtenido (pH=6,92) fue cercano al valor superior de la respuesta teórica (pH=6,94), de modo que el criterio de la optimización fue alcanzado.

Para el *tiempo de formación de gel a 37,5 °C* se obtuvieron valores experimentales (142 s) cercanos al límite inferior de la respuesta (135 s), por lo que el criterio de la optimización también fue alcanzado. Sin embargo, para la transición a 25 °C se obtuvieron valores experimentales (39 min) considerablemente alejados del límite superior esperado (100 min). No obstante, estos tiempos fueron diferentes ($p < 0,05$) y superiores a los obtenidos a 37,5 °C.

La diferencia obtenida entre los valores de los tiempos de formación de gel a 25 °C teóricos y los experimentales podría explicarse considerando las dificultades que surgen a la hora de determinar el punto de transición a esta temperatura. Esta transición de solución a gel conlleva mayor tiempo a temperaturas más baja y es más difícil de apreciar. Esto puede conducir a un error sistemático inherente a la medición del tiempo de formación de gel. Otra fuente de error podría ser la temperatura en la que se llevaron a cabo las mediciones, que en realidad fue una TA aproximada de 25 °C.

Finalmente, para la respuesta *porcentaje de masa residual de gel*, el resultado experimental obtenido (63,44 %) también fue cercano al valor superior de la respuesta (64,55 %), de modo que el criterio de la optimización fue alcanzado.

La Figura 33 muestra la mezcla en forma de solución cuando se encontraba a TA y en forma de gel cuando fue expuesta a 37,5 °C.

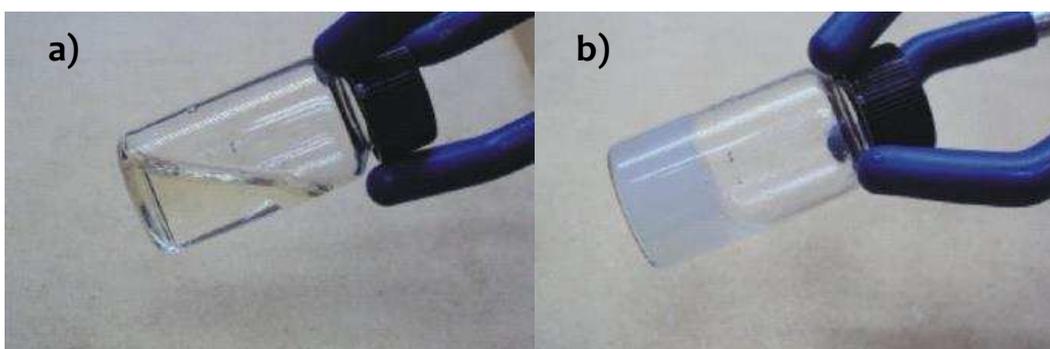


Figura 33. Solución formadora de gel (Q-GP) a: **a)** TA y **b)** 37,5 °C.

La Figura 34 muestra la masa residual como una función del tiempo para algunos ejemplos de geles seleccionados al azar del DCC.

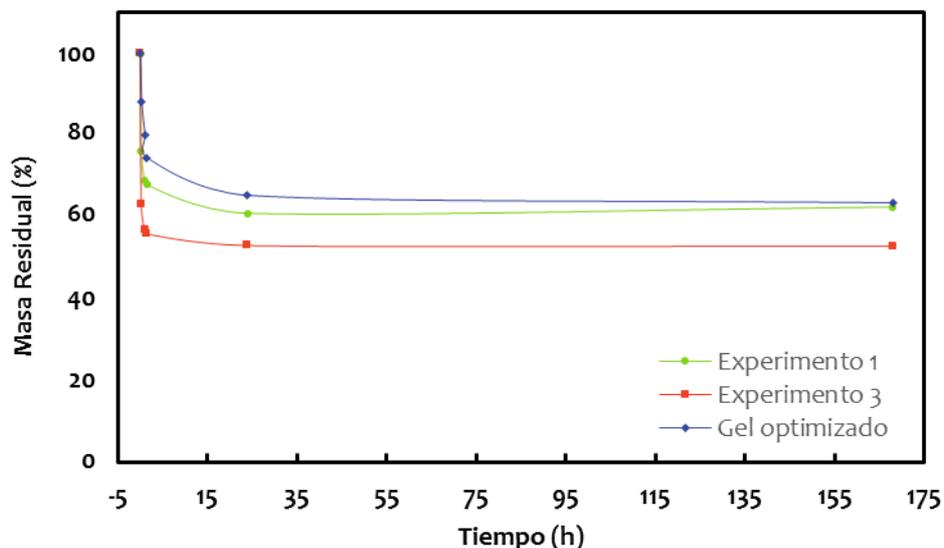


Figura 34. Masa residual en función del tiempo para ejemplos seleccionados en forma aleatoria para el Diseño Central compuesto.

Durante estudios previos y experimentos de Diseño Factorial, se observó que hasta las 24 h las curvas presentaron una caída en la masa residual. Posteriormente, la pérdida de masa se mantuvo estable. Sin embargo, para garantizar una buena estimación de la respuesta durante todo el procedimiento de optimización, el tiempo de corte para establecer la respuesta fue de 7 días (Figura 34). Los diagramas de masa residual frente al tiempo presentaron la misma forma en todos los experimentos llevados a cabo, por lo que la hipótesis fue correcta. Además, estos resultados concuerdan con los hallazgos de Ruel-Gariepy y colaboradores [89]. Estos autores informaron que se perdió al final del estudio aproximadamente el 40 % de la masa total. En este trabajo se encontró que al final de los experimentos del diseño factorial y del DCC se perdió aproximadamente un 40 y 50 % de la masa total, respectivamente.

3.4.2. Caracterización del sistema optimizado

3.4.2.1. Espectroscopía infrarroja

Se realizaron estudios de FT-IR para cada componente Q y GP, y para el gel optimizado. La concentración de cada componente fue del 1 % en los discos de KBr a fin de obtener espectros más claros y definidos. En la Figura 35 se muestran los espectros y en la Tabla 33 se resumen los picos característicos. Los recuadros con línea punteada marcan las regiones de los espectros donde los cambios fueron evidentes.

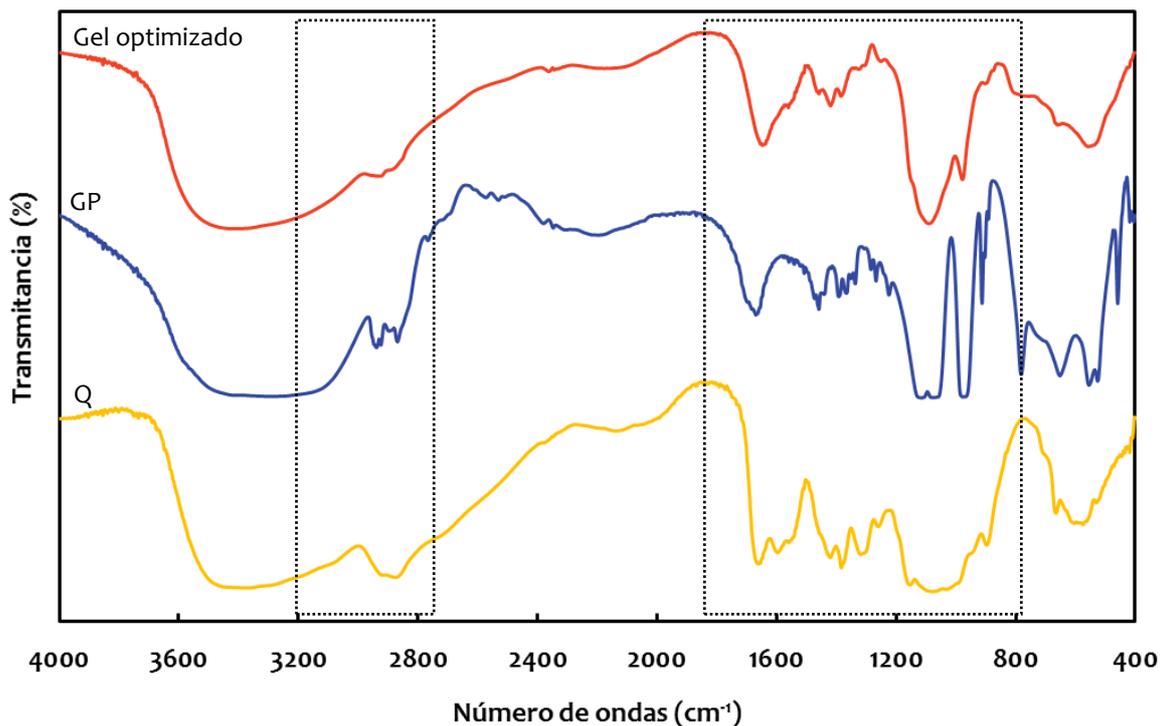


Figura 35. Espectros FT-IR del Gel optimizado (rojo), el GP (azul) y del Q (amarillo).

Tabla 33. Frecuencias de absorción características de los espectros FT-IR del Q, GP y del gel optimizado.

GRUPO FUNCIONAL	FRECUENCIA (cm ⁻¹)		
	Q	GP	Gel optimizado
O-H, N-H	3400		
-C-H asimétrico	2922		2922
-C-H simétrico	2875		2875
-C=O (amida I)	1650		1643
-NH ₂ (amida I)	1598		
-N-H- (amida II)	1560		
C-H, OH	1420		1458
-C-H (CH ₃)	1320		1419
-C-N (amida III)	1260		1325
C-O-C asimétrico	1153		
C-O	1083, 1031		
P-O-C		1050	1080
-PO ₄ ²⁻		980	980
-HPO ₄ ⁻		960	

El espectro de Q presentó una banda fuerte y ancha centrada a aproximadamente 3400 cm⁻¹ como resultado de la superposición de las vibraciones de tensión -OH y -NH. Estos grupos podrían estar implicados en la formación de puentes de hidrógeno inter y/o intramoleculares, los cuales tendrían un papel importante en el proceso de formación de

gel. Además, este espectro presentó las bandas de absorción a 1650 cm^{-1} (tensión del C=O en la amida I), 1598 cm^{-1} (flexión del grupo $-\text{NH}_2$ en la amina primaria 2-aminoglucosa no acetilada) y 1560 cm^{-1} (flexión del $-\text{NH}$ del grupo amida II). Las bandas de absorción a 1153 cm^{-1} (estiramiento asimétrico del enlace C-O-C), 1083 cm^{-1} y 1031 cm^{-1} (estiramiento del C-O) son características de la estructura del Q. Las bandas a 2922, 2875, 1420, 1320 y 1260 cm^{-1} pertenecen a vibraciones simétricas y asimétricas de los grupos $-\text{CH}$ y $-\text{OH}$ del anillo de carbohidratos [161].

En el espectro del GP se observaron: una banda a 1050 cm^{-1} correspondiente al estiramiento P-O-C alifático, una banda a 980 cm^{-1} característica del grupo $-\text{PO}_4^{2-}$ y una banda a 960 cm^{-1} que podría indicar la presencia del grupo $-\text{HPO}_4^-$.

Al analizar el espectro del gel optimizado, se observaron dos bandas del Q: a 2922 y 2875 cm^{-1} , pero prácticamente unidas en un hombro menor en comparación con el espectro del Q sólo. Además, se observó que las intensidades de los picos correspondientes a los grupos C=O, $-\text{OH}$ y $-\text{NH}$ se modificaron en el gel optimizado con respecto al polímero puro. Esto podría indicar la formación de puentes de hidrógeno entre el C=O del Q y el $-\text{OH}$ del GP, y entre el $-\text{NH}$ del Q y el $-\text{OH}$ del GP. Estos resultados coinciden con los de Zhou y colaboradores [156] y con los de Jiang y colaboradores [5]. Además, el pico relacionado al C=O mostró un ligero cambio hacia un número de onda inferior y constituyó un pico con la señal correspondiente al grupo $-\text{NH}_2$. Esto indicaría una atracción electrostática entre los grupos amino protonados del Q y los grupos fosfato del GP [162]. Los picos a 1420, 1320 y 1260 cm^{-1} correspondientes a la flexión de los grupos $-\text{OH}$ y $-\text{CH}$ y a la tensión del enlace C-N de la molécula polimérica se desplazaron a un número de onda mayor en el gel optimizado [162]. Además, hubo cambios significativos en la forma espectral en la región entre 900 a 1250 cm^{-1} , en donde se observaron los picos característicos del GP a 1080 y 980 cm^{-1} [162]. Estos cambios podrían atribuirse a la formación de enlaces entre el Q y el GP durante la transición solución a gel.

3.4.2.2. Estudios reológicos

Se realizaron estudios del comportamiento reológico de la solución formadora de gel optimizado con el objetivo de corroborar la temperatura de la transición de solución a gel. Se obtuvieron valores del módulo elástico (G') y de módulo viscoso (G'') en función de la temperatura mediante mediciones oscilatorias (Figura 36).

Las soluciones formadoras del gel optimizado se calentaron entre 5 y $50\text{ }^\circ\text{C}$. Se observó un fuerte aumento del módulo elástico (G') cerca de los $37\text{ }^\circ\text{C}$, lo que indicó la temperatura en la que ocurre la transición de solución a gel. Chenite y colaboradores reportaron

resultados similares [90]. Por otro lado, la gran diferencia entre G' y G'' indicaría la formación de un gel consistente [90], lo que resulta deseable para la finalidad del mismo.

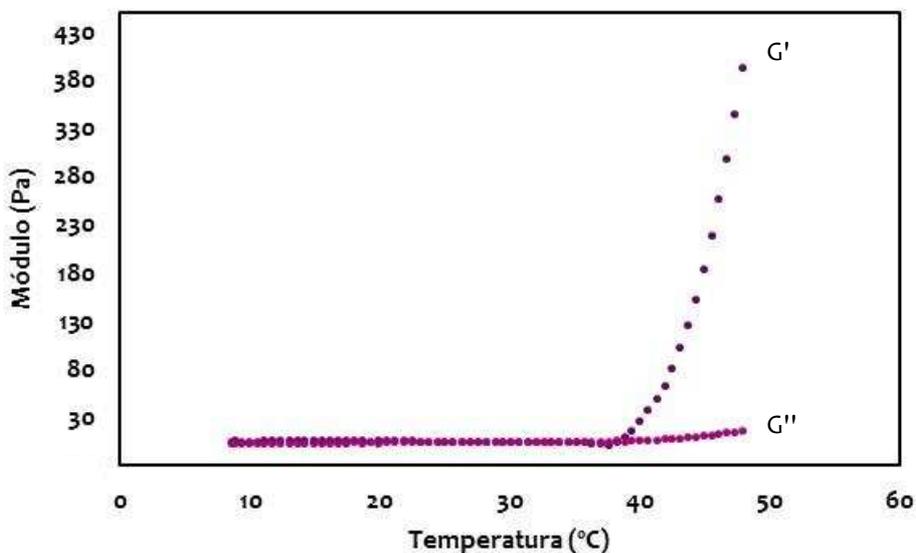


Figura 36. Módulo elástico (G') y módulo viscoso (G'') como función de la temperatura del gel optimizado.

3.4.3. Caracterización de geles de quitosano con complejos de inclusión

Se prepararon geles de Q con complejos de inclusión PGT/RAME β -CD como se describió en el apartado 3.3.4, los cuales fueron caracterizados mediante FT-IR y SEM. Con fines comparativos, también se caracterizó el gel comercial Crinone[®] por ambas técnicas. Asimismo, se evaluó el comportamiento del gel de Q con CI y del gel comercial en fluido vaginal simulado (SVF).

3.4.3.1. Espectroscopía infrarroja

Se llevaron a cabo estudios de FT-IR. La Figura 37 muestra los espectros FT-IR de los geles con PGT (Gel+PGT) y con complejo PGT/RAME β -CD (Gel+CI). A fines comparativos también se incluyeron los espectros de la PGT, del CI y del gel optimizado. En la Tabla 34 se presentan los picos característicos de cada muestra.

Los espectros del gel con PGT y con CI presentaron los picos característicos de sus componentes constituyentes, con algunas variaciones. El espectro correspondiente al gel con PGT presentó una banda fuerte y ancha en 3446 cm^{-1} como resultado de la superposición de las vibraciones de tensión -OH y -NH, como ocurría con el gel optimizado. Sin embargo, presentó un leve corrimiento, indicando posible interacción entre la PGT y el gel. Por su parte, en el gel con CI esta banda sufrió un corrimiento mayor, hacia 3465 cm^{-1} . Estos son picos implicados en la formación de puentes de hidrógeno inter y/o

intramoleculares [163]. Tanto la CD como la PGT libre pudieron haber tenido interacciones de este tipo con la molécula de Q.

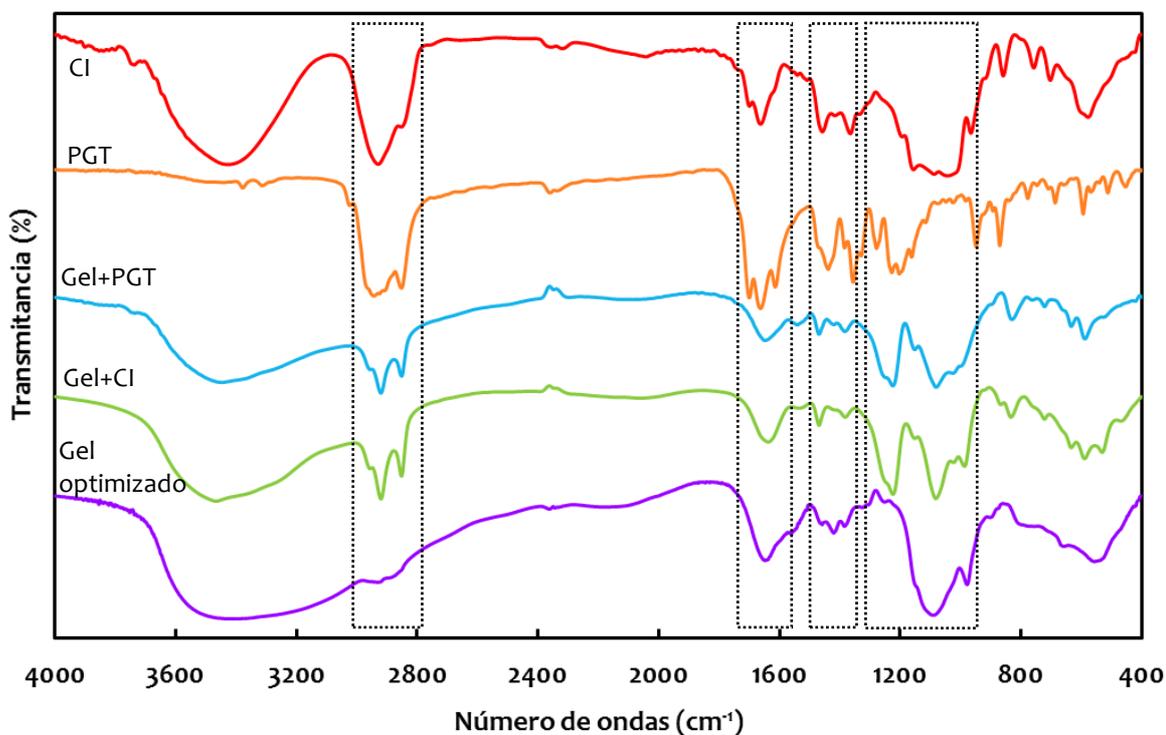


Figura 37. Espectros FT-IR del CI (rojo), de la PGT (naranja), del Gel+PGT (celeste), del Gel+CI (verde) y del Gel optimizado (lila).

Tabla 34. Frecuencias de absorción características de los espectros FT-IR de la PGT, del CI, del gel con PGT, del gel con CI y del gel optimizado.

GRUPO FUNCIONAL	FRECUENCIA (cm ⁻¹)				
	PGT	CI	Gel +PGT	Gel +CI	Gel optimizado
O-H, N-H			3446	3465	3400
-C-H asimétrico y simétrico			S; S	S; S	2929; 2885
-CH ₃ , -CH ₂	2943; 2908; 2852		2954; 2920; 2852	2956; 2920; 2852	
C=O	1699; 1662	1699; 1662 (↓↓)			
C=C	1614	NP			
-C=O (amida I)			1647	1635	1647
C-H, OH			1469	1467	1458
-C-H (CH ₃)			1419↓	1419↓↓	1419
-C-N (amida III)			1382	1380	1384
C-O-C			1224; 1026	1222↑; 1024	
P-O-C			1080	1081	1089
-PO ₄ ²⁻			997 ↓	987	977

↑: aumentó en intensidad; ↓: disminuyó en intensidad; NP: no presente; S: solapado

Las bandas de vibración del grupo -CH del Q (2929 y 2885 cm^{-1}), que se observaron en el gel optimizado, se vieron solapadas por bandas estiramiento del enlace C-H de los grupos CH_2 y CH_3 de la PGT en el gel con PGT libre. El gel con CI presentó prácticamente el mismo comportamiento en esa región del espectro, posiblemente como consecuencia del efecto de la CD y de PGT que puede liberarse de los complejos durante la disolución de los mismos para la preparación de los geles.

La banda de la amida I del gel con CI se desplazó (1635 cm^{-1}) con respecto al gel optimizado (1647 cm^{-1}) y presentó mayor intensidad en comparación al gel con PGT, indicando interacción entre el CI y el gel. Islam y colaboradores reportaron una situación similar en su trabajo [163].

En el gel con PGT se observó un corrimiento de los picos correspondientes a la flexión de los grupos -OH y -CH y a la tensión del enlace C-N de la amida III de la molécula polimérica. Sin embargo, el rasgo más sobresaliente fue la disminución del pico correspondiente al enlace C-H del grupo CH_3 , efecto que se vio mucho más acrecentado en el gel con CI, indicando una mayor interacción entre los componentes. Los grandes cambios observados en los grupos C=O, -OH y -NH del gel con CI con respecto al gel sin droga, podrían indicar la formación de puentes de hidrógeno entre el C=O del Q y los -OH de la CD, y entre el -NH del Q y los -OH de la CD.

Además, hubo cambios significativos en la forma espectral en la región en donde se observan los picos característicos del GP, tanto en el gel con PGT como el gel con CI. En ambos casos se observó que: los picos correspondientes al estiramiento P-O-C alifático presentaron corrimientos a números de ondas menores, mientras que los picos correspondientes al grupo $-\text{PO}_4^{2-}$ presentaron corrimientos a números de ondas mayores. Sin embargo, el efecto se vio más pronunciado en el gel con CI. Estos cambios podrían ser atribuidos a la formación de enlaces entre la PGT y el Q.

Además se obtuvo el espectro FT-IR del gel comercial Crinone[®], el cual se presenta en la Figura 38. Para el análisis se incluye en la figura el espectro de la PGT. Cabe destacar que este análisis no pretende ser profundo, ya que el gel presenta una matriz compleja con muchos excipientes. Se observó que el gel comercial presentó los picos característicos de la PGT, los cuales se pueden observar en los recuadros punteados de la figura, verificando la presencia de la hormona.

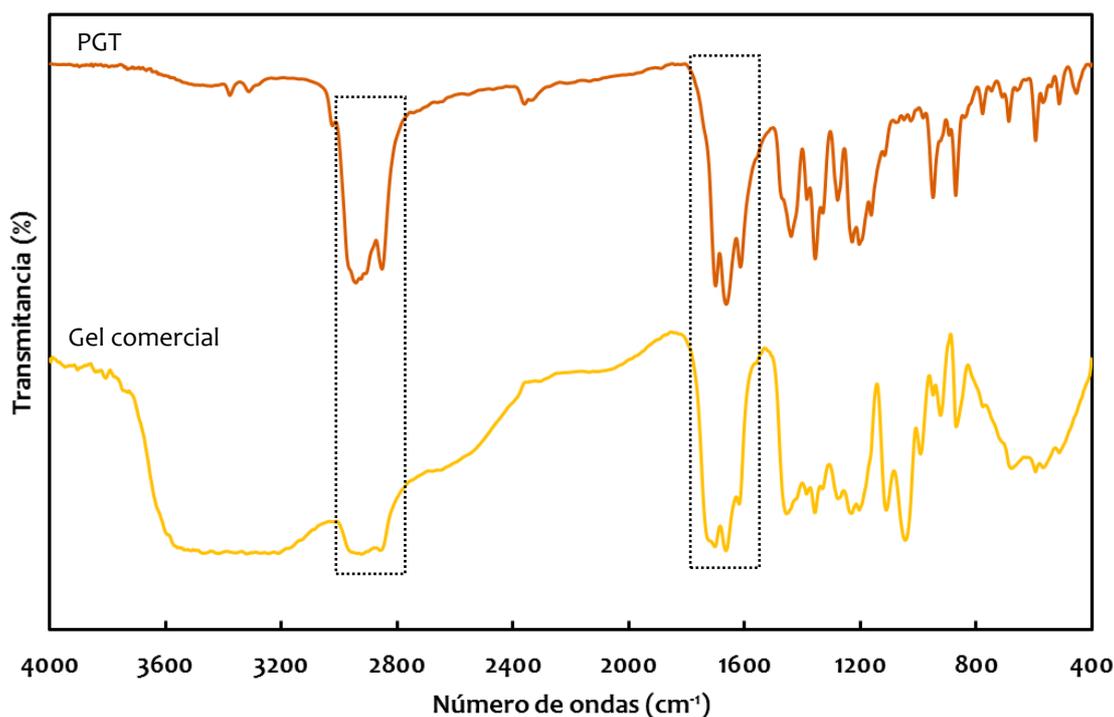


Figura 38. Espectros FT-IR de la PGT (naranja) y del Gel comercial (amarillo).

3.4.3.2. Microscopía electrónica de barrido

Se realizaron observaciones microscópicas mediante SEM del gel de Q: solo, con PGT libre y con complejo de inclusión PGT/RAME β -CD, imágenes que se muestran en la Figura 39. Las muestras fueron congeladas con nitrógeno líquido y liofilizadas para su posterior observación microscópica. Se puede observar que el gel sin droga (Figura 39, a) presentó una estructura abierta caracterizada por poros interconectados entre sí. La imagen obtenida concuerda con las reportadas por otros autores [164,165]. Por su parte, el gel con PGT libre (Figura 39, b) presentó esta misma estructura de poros interconectados. En contraste, el gel con CI (Figura 39, c y d) presentó una microestructura similar a láminas interconectadas formando poros. En ambos casos, la presencia de la droga libre o del CI no generó cambios importantes en la estructura microscópica de los geles. Además, los geles presentaron una buena consistencia macroscópica y los tiempos de formación no se modificaron con respecto a los del gel optimizado. Ni la droga libre ni el CI interfirieron en la formación de los geles.

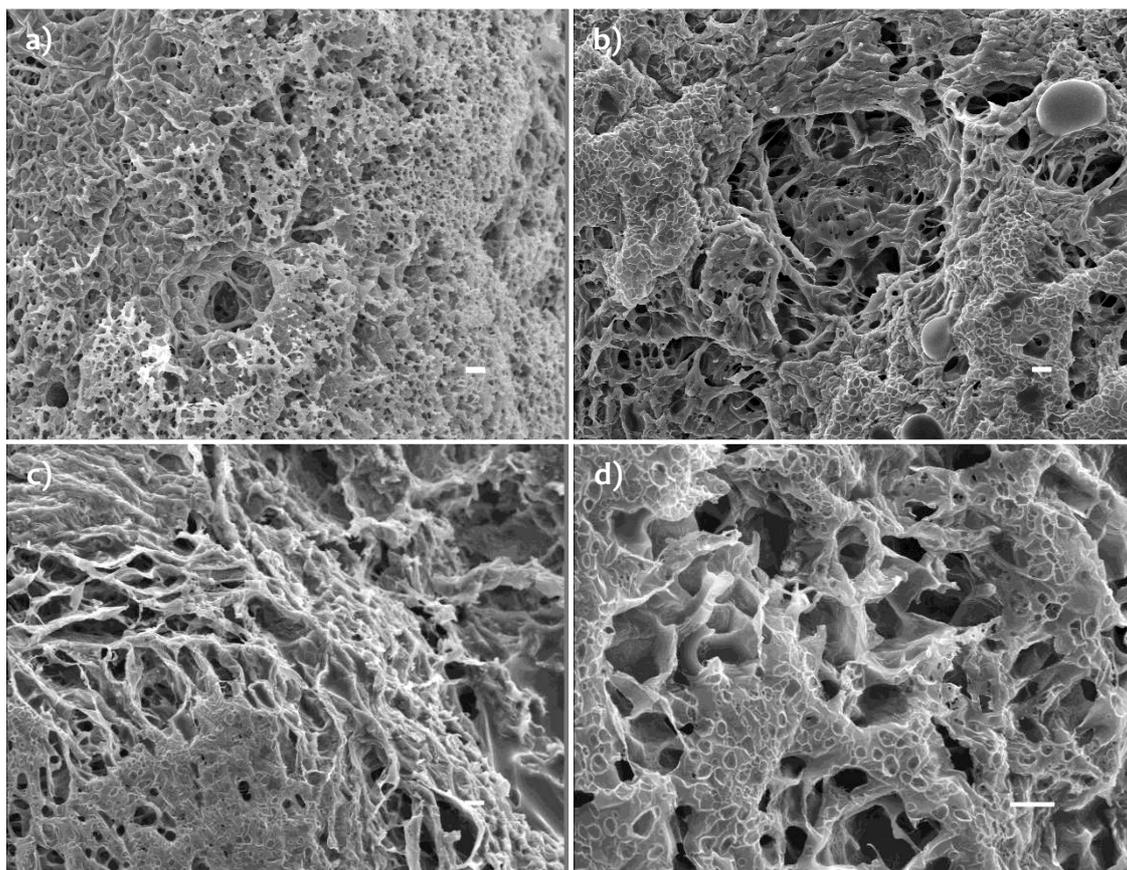


Figura 39. Micrografías de geles de Q: **a)** sin droga (400x), **b)** con PGT libre (400x), **c)** con complejo PGT/RAME β -CD (400x) y **d)** con complejo PGT/RAME β -CD (1000x).

Además, se obtuvieron las micrografías correspondientes al gel comercial Crinone[®] y se repitieron las observaciones del gel de Q con CI a fin de compararlos en las mismas condiciones (Figura 40). Estas muestras fueron congeladas a -80 °C y luego liofilizadas, previamente a su observación microscópica. El gel comercial (Figura 40, a) presentó una morfología lisa con cristales de PGT visibles e incrustados en toda la superficie, además de ausencia de poros. La ausencia de poros en la microestructura de Crinone[®] puede deberse a características propias de sus polímeros constituyentes (carbopol y policarbófilo) y de otros excipientes presentes en la formulación comercial.

La imagen del gel con CI (Figura 40, b) reveló un cambio en la morfología con respecto a la obtenida en la Figura 39 (c y d). Esta nueva imagen reveló una superficie mucho más lisa con poros internos e incrustaciones tipo agujas. Durante el proceso de liofilizado, el agua es removida por sublimación bajo vacío, generando poros en la estructura de los geles, previo congelamiento de la muestra. Sin embargo, la temperatura a la cual se lleva a cabo este proceso afecta la microarquitectura de los geles [166]. Wu y colaboradores encontraron que la temperatura de congelación antes de la liofilización afecta la morfología de hidrogeles de colágeno/Q. La interconectividad de los poros de estos hidrogeles se amplifica cuando la temperatura aumenta de -196 °C a -80 °C [167]. Ho y colaboradores

encontraron que cuando la temperatura durante el liofilizado no era lo suficientemente baja, se formaba una película superficial sobre hidrogeles de Q debido a que la solución de polímero no resistía adecuadamente la tensión causada por la evaporación del disolvente en la interface hidrogel-aire [165]. Esto podría explicar las diferencias obtenidas entre los geles de Q con CI liofilizados, ya que las Figura 39 c y d fueron obtenidas congelando previamente a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ mientras que la Figura 40 b fue obtenida congelando previamente a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Con respecto a las incrustaciones se presume que corresponden a un comportamiento de la CD que es debido al procesamiento llevado a cabo en esta nueva adquisición de imágenes. La gran diferencia observada entre el gel comercial y el gel con CI desarrollado, lleva a pensar en la factibilidad del gel de Q al reducir la cantidad de PGT e incorporarla de manera soluble y por tanto más disponible.

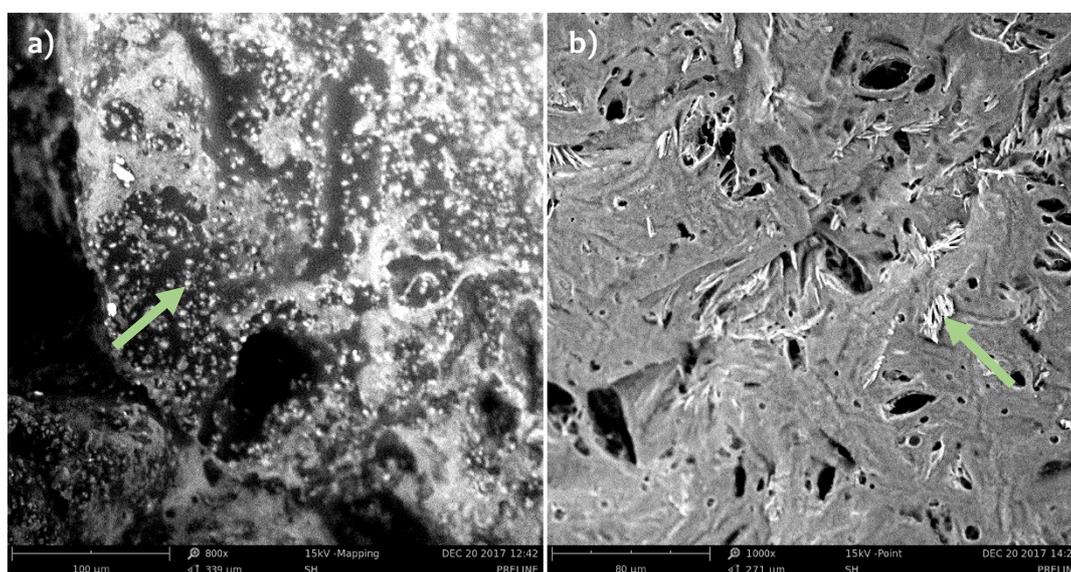


Figura 40. Micrografías obtenidas por SEM de: **a)** Gel comercial Crinone® (800x) y **b)** Gel de Q con CI PGT/RAME β -CD (1000x).

3.4.3.3. Comportamiento de geles en fluido vaginal simulado

Se colocaron los geles en SVF a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, a fin de estudiar su comportamiento en medio ácido similar a las condiciones *in vivo*. En la prueba realizada colocando los geles en los recipientes tipo canastas, se pudo observar que a los 30 minutos de comenzado el ensayo, el gel comercial se había degradado completamente, como se muestra en la Figura 41 (derecha), mientras que el gel de Q con CI mostró mayor resistencia a la degradación en el mismo tiempo. Si bien en las condiciones fisiológicas los geles no estarían expuestos a tanto volumen de fluido vaginal, se pudo comprobar la mayor resistencia de los geles de Q a las condiciones ácidas del medio.



Figura 41. Dispositivos utilizados para estudiar la degradación de los geles Q+CI y Crinone® en SVF.

En la segunda prueba realizada, siguiendo la técnica descrita por Almomen y colaboradores [17], no se pudieron obtener resultados concluyentes con respecto a la degradación de los geles. Este es un experimento que simula mejor las condiciones que ocurren *in vivo* y las que se utilizaron *in vitro*, en comparación con el ensayo anterior, ya que solo parte de la superficie del gel tiene contacto con un pequeño volumen del fluido ácido. No obstante, la extracción del medio entre pesadas, generó resultados dispares. Como se observó en el ensayo de las canastas, el gel comercial se deshace, por lo que durante la extracción del líquido se puede arrastrar mayor o menor cantidad de gel, introduciendo mucha variabilidad entre ensayos. Por este motivo, esta técnica no sería la más adecuada para evaluar la degradación del gel en el tiempo. Aun así, para ambos geles se observó una tendencia a la disminución de peso en el tiempo, mayor para el gel comercial. En la Figura 42 se muestra a modo de ejemplo el sistema utilizado para este ensayo.



Figura 42. Dispositivo utilizado para evaluar el comportamiento del gel Crinone® en SVF siguiendo la técnica de Almomen y col., 2015.

3.4.4. Experimentos de liberación *in vitro*

Los estudios de liberación *in vitro* se utilizan para caracterizar la liberación de los fármacos desde sus sistemas de transporte. Se realizaron estudios de liberación a través de mucosa vaginal porcina en celdas de difusión de Franz con cuatro sistemas diferentes en los compartimientos donantes: una solución de PGT, una solución de CI PGT/RAME β -CD, un gel de Q con CI y el gel comercial Crinone[®]. Se tomaron muestras a intervalos regulares de tiempo del compartimiento receptor y se cuantificó la cantidad de PGT mediante HPLC.

En la Figura 43 se muestra uno de los fragmentos de tejido vaginal utilizados para los experimentos de liberación, donde se pueden observar los anillos cervicales característicos de la cara luminal del tejido. En la Figura 44 se muestra la celda de Franz utilizada en los experimentos.



Figura 43. Fragmento de tejido vaginal porcino.



Figura 44. Fotografía de la celda de Franz utilizada para el estudio de liberación.

Se graficó el porcentaje de PGT permeada a través del tejido y acumulada (%) en función del tiempo (t). Los perfiles de liberación de PGT a través del tejido vaginal de cerdo a lo largo del tiempo para los sistemas ensayados se muestran en las Figura 45 y 46. Se produjo

un aumento relativamente constante de la liberación durante todo el ensayo para los sistemas evaluados.

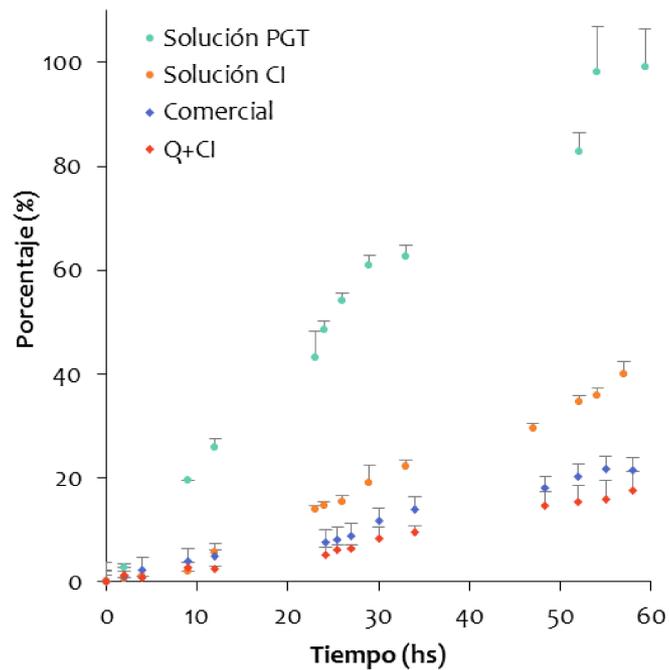


Figura 45. Liberación de PGT en tejido. Con círculos se representan las soluciones (en celeste la de PGT y en naranja la del CI) y con rombos los geles (en azul el comercial y en rojo el de Q con CI).

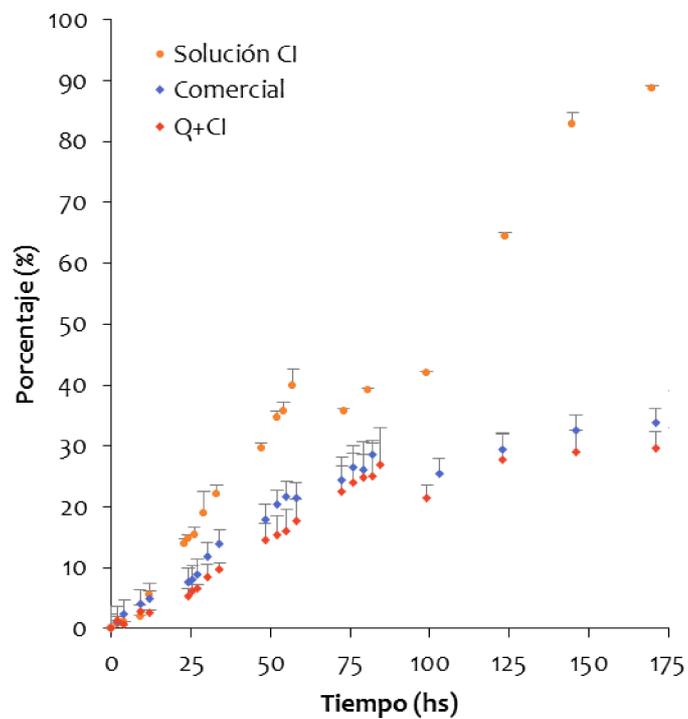


Figura 46. Liberación de PGT en tejido. Con círculos se representan las soluciones y con rombos los geles.

La velocidad de permeación de la PGT en solución fue mucho mayor a la solución de CI y a la de los geles, alcanzando el 100 % a las 60 horas de comenzado el ensayo (Figura 45). A las 24 horas, 49 % de la PGT inicial permeó a través del tejido porcino.

El transporte de drogas a través de la mucosa vaginal se logra por un mecanismo de múltiples vías similar a las otras membranas biológicas [157]. Se presume que la difusión de la mayoría de los fármacos a través de los tejidos biológicos se produce a través de dos mecanismos: el *paracelular*, es decir a través de las uniones de las células epiteliales adyacentes mediante difusión pasiva; y *transcelular*, a través de las membranas de las células epiteliales mediante difusión pasiva, transporte mediado por *carriers* o endocitosis [168-170]. Se encontró que los compuestos hidrofílicos se absorben a través de la ruta *paracelular*, y las tasas de difusión del fármaco están inversamente relacionadas con su tamaño molecular. Son las moléculas pequeñas las capaces de atravesar los diferentes tipos de uniones entre las células epiteliales adyacentes. Por el contrario, los fármacos liposolubles, como la PGT, se absorben por la ruta *transcelular*, mediante difusión pasiva a través de las células epiteliales, por un gradiente de concentración según la Ley de Fick. Las tasas de difusión se correlacionan con sus coeficientes de reparto y están inversamente relacionadas con su peso molecular [168,169,171,172]. Se encuentra reportado que cuanto mayor es el logaritmo del coeficiente de reparto, mayor es la afinidad por las membranas lipídicas y, por lo tanto, el pasaje a través de ellas mediante difusión pasiva ocurre mucho más rápidamente. Este valor debe estar comprendido entre 3 y 6, y si es demasiado elevado, el fármaco permanecerá en la membrana lipídica y nunca migrará nuevamente al entorno acuoso subyacente [168]. La PGT presenta un valor de $\log P_{oct} = 3,87$ ($P_{oct} = 7410$ [135]), lo que explicaría la rápida difusión que presentó a través del tejido vaginal, en comparación con los otros tres sistemas.

La PGT de la solución de CI presentó una velocidad de permeación disminuida con respecto a la solución de PGT libre (Figura 45). A las 24 horas sólo permeó el 15 % de la PGT inicial y al fin del ensayo (170 horas) llegó a difundir el 89 % de PGT (Figura 46). Se calcularon los factores de diferencia (f_1) y similitud (f_2) para los perfiles de liberación de las soluciones de PGT y CI. Debido a que f_1 fue mayor a 15 y f_2 menor a 50 ($f_1 = 59,6$ y $f_2 = 19,9$), se encontró que los perfiles de permeación fueron diferentes entre las soluciones. Se encuentra reportado que las moléculas de CDs hidrofílicas y sus complejos pueden atravesar las biomembranas lipofílicas con considerable dificultad si existen facilitadores de la permeación, mientras que la permeación de las CDs lipofílicas es prácticamente insignificante [173]. Además, si el complejo se encuentra en estrecha aproximación a una membrana biológica lipófila, el tejido actúa como “sumidero” y el fármaco se libera del CI.

Esto ocurre debido a que el equilibrio $CD + D \leftrightarrow CI$ se desplaza hacia la izquierda a medida que el fármaco penetra en las membranas con las que tiene mayor afinidad (Figura 47) [174,175]. Este mecanismo podría explicar el retardo en la permeación de la PGT en el sistema con solución de CI PGT/RAME β -CD, con respecto a la solución de PGT libre.

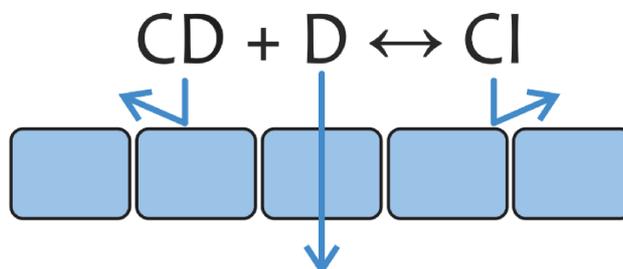


Figura 47. Absorción selectiva en tejidos facilitada por disociación de complejos de inclusión (adaptado de Stella y col., 1999).

La velocidad de difusión desde los geles aumentó lentamente de manera sostenida. Sin embargo, la velocidad de difusión del gel comercial fue ligeramente mayor, siendo el porcentaje de difusión a las 24 horas de 8 % con respecto al 5 % del gel con CI (Figura 46). Al final del ensayo, sólo había difundido un 33 % y 29 % de PGT en el dispositivo con gel comercial y con gel con CI, respectivamente. Se calcularon los factores de diferencia (f_1) y similitud (f_2) para los perfiles de liberación de los geles (comercial y Q con CI). Se encontró que los perfiles de permeación de ambos geles fueron similares, ya que f_1 presentó un valor menor a 15 y f_2 un valor mayor a 50 ($f_1 = 12,0$ y $f_2 = 69,9$). A la vez, ambos geles presentaron una difusión menor a la presentada con la solución de CI, como resultado de la presencia de la matriz polimérica de ambos. Se sabe que los hidrogeles, cuando se colocan en un ambiente acuoso, se hinchan y retienen grandes volúmenes de agua en su estructura, al tiempo que liberan las drogas contenidas en su interior cuando estas se solubilizan y difunden a través de la matriz polimérica [172,176]. La liberación de fármaco entonces depende de la velocidad de dos procesos que se producen simultáneamente: la migración de agua en la matriz y la difusión del fármaco en el medio a través de la capa de gel [176]. Esto podría explicar la menor velocidad de difusión presentada en los geles con respecto a la solución de CI.

Por otro lado, se realizó como análisis adicional la determinación de la cantidad de PGT remanente en el gel ubicado en el compartimento dador y en el tejido luego de finalizado el ensayo. Se encontró que en el gel comercial había permanecido un 2,8 % de la PGT colocada inicialmente, mientras que en el gel con CI había un 15,1 %. Por su parte, la PGT remanente en el tejido, también fue menor en el ensayo con el gel comercial en comparación con el gel

con CI. Esto sugiere que los componentes del gel comercial (excipientes o el mismo polímero) modifican la difusión de la PGT, haciendo que sea ligeramente más rápida.

Cabe destacar que todas estas observaciones no se realizaron teniendo en cuenta los cambios cíclicos que ocurren en el epitelio vaginal (engrosamiento y afinamiento del tejido) durante el ciclo menstrual, los cuales ejercen efectos profundos sobre la absorción vaginal [157,168,172]. Es por eso que estas observaciones preliminares deben complementarse y verificarse con ensayos *in vivo* futuros, que proporcionarán datos más reales del comportamiento de la PGT en el organismo completo. Asimismo, como las formulaciones vaginales que son tóxicas o no compatibles con el epitelio vaginal pueden causar irritación local y se asocian con una mayor inflamación y tasas de infección, complicaciones y, por lo tanto, aumento de costos de tratamiento [17,157], sería de mucha utilidad determinar la influencia del sistema desarrollado sobre la integridad de la mucosa y flora normal vaginal y sus propiedades preferenciales reales por sobre el producto comercial. La disolución del fármaco en el líquido vaginal y la penetración epitelial son los dos pasos claves para que un fármaco se absorba a través de la vagina. Como resultado, todos los factores asociados con la fisiología vaginal y el perfil de la formulación influirán en gran medida en el éxito de la administración del fármaco al objetivo [171].

3.4.5. Conclusiones parciales

Mediante el diseño de experimentos se logró optimizar la preparación de geles de Q. Los criterios de optimización planteados se cumplieron logrando preparar una formulación que presenta una transición a gel (pH=6,92) en 142 segundos (2,37 min) a una temperatura de 37,5 °C y con un porcentaje del 63,44 % de masa residual *in vitro* luego de 7 días de inmersión en solución reguladora. El tiempo de transición de solución a gel a TA fue mucho mayor que el tiempo requerido a 37,5 °C. La optimización realizada en este trabajo permite controlar todo el proceso, es decir la preparación de soluciones formadoras de geles y de la formación de gel *in situ*. Además, se caracterizaron los geles optimizados mediante FT-IR y por mediciones reológicas, obteniendo nuevas evidencias de que la optimización fue alcanzada con éxito.

Se lograron incorporar complejos de inclusión PGT/RAME β -CD a geles de Q, los cuales se caracterizaron mediante FT-IR y por el estudio microscópico en SEM. Se verificó que la incorporación de los CI no modificó las características micro y macroscópicas de los geles, así como tampoco modificó los tiempos de formación con respecto a los geles optimizados previamente. Se evaluó el comportamiento de los geles en fluido vaginal simulado. Se

encontró que los geles de Q con CI resistieron en mayor medida que el gel comercial a la degradación en este medio.

Se evaluó la difusión *in vitro* a través de tejido vaginal porcino de PGT desde soluciones de la hormona libre e incluida en CI y desde geles de Q con CI. Se encontró que los geles con CI presentaron difusiones sostenidas en el tiempo similares a las exhibidas por el gel comercial actualmente utilizado. Se plantea el uso de geles de Q con CI PGT/RAME β -CD como una alternativa viable al gel comercial Crinone[®], que permitiría evitar el uso de polímeros que causan irritación y malestar en las usuarias.

CONCLUSIONES /

CONCLUSIONES

Capítulo 1: Complejos de Inclusión de Paclitaxel:

Se obtuvieron los DSF entre PTX y RAME β -CD en tres solventes diferentes (PBS:EtOH, H₂O:EtOH y agua). Se calcularon las constantes $K_{1:1}$ y las Eficiencias de Encapsulación, obteniendo mejores resultados en PBS:EtOH.

Se ensayaron distintos protocolos de formación de complejos entre PTX y RAME β -CD en PBS:EtOH. Se calcularon las Eficiencias de Inclusión, obteniendo valores menores al 50 %. Se caracterizaron los CI obtenidos y se verificó la inclusión del PTX en la cavidad de la CD. Además, se observaron agregados de gran tamaño de los CI PTX/RAME β -CD, que afectaron su determinación cuantitativa mediante HPLC.

Se prepararon CI en H₂O:EtOH entre PTX y RAME β -CD en distintas relaciones molares. Se obtuvieron Eficiencias de Inclusión mayores a las obtenidas en el medio PBS:EtOH. Se verificó nuevamente la formación de agregados entre los complejos.

Con el objetivo de mantener buenas Eficiencias de Inclusión y disminuir la formación de agregados, se prepararon CI en tres solventes diferentes (EtOH, MeOH o agua) y con aditivos disgregantes o disrupción mecánica (ácido cítrico, PVP o sonicación). Las eficiencias de los CI fueron dispares, sin embargo, se logró reducir el tamaño de los agregados. En las condiciones en las que se obtuvieron agregados más pequeños, se podrían ensayar distintas alternativas (como por ejemplo: modificar las relaciones de solventes, las relaciones molares entre los reactivos, momento en el que se incorpora el antiagregante, cantidad de antiagregante, entre otras), para intentar mejorar las Eficiencias de Inclusión y luego incorporan los complejos en geles de quitosano y realizar ensayos de liberación.

Capítulo 2: Complejos de Inclusión de Progesterona:

Se obtuvieron los DSF entre la PGT y dos CDs (β -CD y RAME β -CD) en dos solventes diferentes (agua y H₂O:EtOH). Se calcularon las constantes $K_{1:1}$ y las Eficiencias de Encapsulación de cada caso.

Se ensayaron distintos protocolos de formación de complejos entre PGT y RAME β -CD variando relaciones molares entre los reactivos y solventes utilizados. Se calcularon las Eficiencias de Inclusión y Rendimientos de Inclusión. Se seleccionó como solvente para la preparación la mezcla H₂O:EtOH y la relación molar 1:5 PGT:RAME β -CD. Se caracterizaron los CI y se verificó la inclusión de la PGT en de la cavidad de la CD.

Capítulo 3: Geles de Quitosano:

Mediante el diseño de experimentos se optimizó la preparación de geles de Q. La formulación optimizada presentó una transición a gel (pH=6,92) en 2,37 min a una temperatura de 37,5 °C y con un porcentaje del 63,44 % de masa residual *in vitro* luego de 7 días de inmersión en solución reguladora. El tiempo de transición de solución a gel a temperatura ambiente fue mucho mayor que el tiempo requerido a 37,5 °C. Los geles optimizados se caracterizaron, verificando su optimización.

Se incorporaron complejos de inclusión PGT/RAME β -CD a geles de Q y se caracterizaron. La incorporación de los CI no modificó las características micro y macroscópicas de los geles, ni los tiempos de formación con respecto a los geles optimizados previamente. Los geles de Q con CI resistieron en mayor medida que el gel comercial a la degradación en fluido vaginal simulado.

Se evaluó la difusión *in vitro* a través de tejido vaginal porcino de PGT desde soluciones de la hormona libre e incluida en CI y desde geles de Q con CI. Los geles con CI presentaron difusiones sostenidas en el tiempo similares a las exhibidas por el gel comercial. Se plantea el uso de geles de Q con CI PGT/RAME β -CD como una alternativa viable al gel comercial Crinone[®], que permitiría evitar el uso de polímeros que causan irritación y malestar en las usuarias.

/BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- [1] E Bernabeu, M Cagel, E Lagomarsino, M Moretton, DA Chiappetta (2017) Paclitaxel: What has been done and the challenges remain ahead. *Int J Pharm* 526 (1-2):474-495.
- [2] YJ Ye, Y Wang, KY Lou, YZ Chen, R Chen, F Gao (2015) The preparation, characterization, and pharmacokinetic studies of chitosan nanoparticles loaded with paclitaxel/dimethyl- β -cyclodextrin inclusion complexes. *Int J Nanomed* 10:4309-4319.
- [3] R Panchagnula (1998) Pharmaceutical aspects of paclitaxel. *Int J Pharm* 172 (1):1-15.
- [4] W Bouquet, W Ceelen, B Fritzingier, P Pattyn, M Peeters, JP Remon, C Vervaet (2007) Paclitaxel/ β -cyclodextrin complexes for hyperthermic peritoneal perfusion-Formulation and stability. *Eur J Pharm Biopharm* 66 (3):391-397.
- [5] Y Jiang, X Meng, Z Wu, X Qi (2016) Modified chitosan thermosensitive hydrogel enables sustained and efficient anti-tumor therapy via intratumoral injection. *Carbohydr Polym* 144:245-253.
- [6] JJ Centelles, S Imperial (2010) Paclitaxel: descubrimiento, propiedades y uso clínico. *Offarm: Farm Soc* 29 (4):68-75.
- [7] KW Fong, JW Leung, Y Li, W Wang, L Feng, W Ma, D Liu, Z Songyang, J Chen (2013) MTR120/KIAA1383, a novel microtubule-associated protein, promotes microtubule stability and ensures cytokinesis. *J Cell Sci* 126 (3):825-837.
- [8] PB Schiff, J Fant, SB Horwitz (1979) Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 277 (5698):665-667.
- [9] AK Singla, A Garg, D Aggarwal (2002) Paclitaxel and its formulations. *Int J Pharm* 235 (1):179-192.
- [10] S Kalepu, V Nekkanti (2015) Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. *Acta Pharm Sin B* 5 (5):442-453.
- [11] M Shah, V Shah, A Ghosh, Z Zhang, T Minko (2015) Molecular inclusion complexes of β -cyclodextrin derivatives enhance aqueous solubility and cellular internalization of paclitaxel: Preformulation and in vitro assessments. *J Pharm Pharmacol (Los Angel)* 2 (2):8.
- [12] RCF Cheung, TB Ng, JH Wong, WY Chan (2015) Chitosan: an update on potential biomedical and pharmaceutical applications. *Mar Drugs* 13 (8):5156-5186.
- [13] MS Surapaneni, SK Das, NG Das (2012) Designing Paclitaxel drug delivery systems aimed at improved patient outcomes: current status and challenges. *ISRN Pharmacol* 2012:623139.

- [14] C Scavone, A Colomba Bonagura, S Fiorentino, D Cimmaruta, R Cenami, M Torella, T Fossati, F Rossi (2016) Efficacy and safety profile of diclofenac/cyclodextrin and progesterone/cyclodextrin formulations: a review of the literature data. *Drugs in R&D* 16 (2):129-140.
- [15] G Zoppetti, N Puppini, F Ospitali, A Fini (2007) Solid state characterization of progesterone in a freeze dried 1: 2 progesterone/HPBCD mixture. *J Pharm Sci* 96 (7):1729-1736.
- [16] I Nandi, M Bateson, M Bari, HN Joshi (2003) Synergistic effect of PEG-400 and cyclodextrin to enhance solubility of progesterone. *AAPS Pharm Sci Tech* 4 (1):1-5.
- [17] A Almomen, S Cho, C-H Yang, Z Li, EA Jarboe, CM Peterson, KM Huh, MM Janát-Amsbury (2015) Thermosensitive progesterone hydrogel: A safe and effective new formulation for vaginal application. *Pharm Res* 32 (7):2266-2279.
- [18] B Cometti (2015) Pharmaceutical and clinical development of a novel progesterone formulation. *Acta Obstet Gynecol Scand* 94 (S161):28-37.
- [19] RC Tuckey (2005) Progesterone synthesis by the human placenta. *Placenta* 26 (4):273-281.
- [20] AW Norman, G Litwack (1997), *Hormones*, Academic Press, Filadelfia, Pensilvania.
- [21] G Pereira, J Marchetti, M Bentley (2000) A rapid method for determination of progesterone by reversed-phase liquid chromatography from aqueous media. *Anal Lett* 33 (5):881-889.
- [22] C Valenta, CE Kast, I Harich, A Bernkop-Schnürch (2001) Development and in vitro evaluation of a mucoadhesive vaginal delivery system for progesterone. *J Control Release* 77 (3):323-332.
- [23] D de Ziegler, R Fanchin (2000) Progesterone and progestins: applications in gynecology. *Steroids* 65 (10):671-679.
- [24] N Khan, KS Richter, TL Newsome, EJ Blake, VI Yankov (2009) Matched-samples comparison of intramuscular versus vaginal progesterone for luteal phase support after in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 91 (6):2445-2450.
- [25] AY Zaman, S Coskun, AA Alsanie, KA Awartani (2017) Intramuscular progesterone (Gestone) versus vaginal progesterone suppository (Cyclogest) for luteal phase support in cycles of in vitro fertilization–embryo transfer: patient preference and drug efficacy. *Fert Res Pract* 3 (1):17.
- [26] F Acarturk (2009) Mucoadhesive vaginal drug delivery systems. *Recent Pat Drug Deliv Formul* 3 (3):193-205.

- [27] L Michnova, J Dostal, M Kudela, P Hamal, K Langova (2017) Vaginal use of micronized progesterone for luteal support. A randomized study comparing Utrogestan® and Crinone® 8%. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc* 161 (1):86-91.
- [28] AS Penzias, MM Alper (2003) Luteal support with vaginal micronized progesterone gel in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 6 (3):287-295.
- [29] SJ Choi (2017) Use of progesterone supplement therapy for prevention of preterm birth: review of literatures. *Obstet Gynecol Sci* 60 (5):405-420.
- [30] M El-Gharib, T El-Hawary (2013) Matched sample comparison of intramuscular versus vaginal micronized progesterone for prevention of preterm birth. *J Matern-Fetal Neonatal Med* 26 (7):716-719.
- [31] AN Beltsos, MD Sanchez, KJ Doody, MR Bush, AD Domar, MG Collins (2014) Patients' administration preferences: progesterone vaginal insert (Endometrin®) compared to intramuscular progesterone for Luteal phase support. *Reprod Health* 11 (1):78.
- [32] J Das Neves, M Bahia (2006) Gels as vaginal drug delivery systems. *Int J Pharm* 318 (1):1-14.
- [33] Merck-Serono (2011) Folleto Crinone® 8%.
- [34] M Messner, SV Kurkov, P Jansook, T Loftsson (2010) Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles. *Int J Pharm* 387 (1):199-208.
- [35] T Loftsson, ME Brewster (2012) Cyclodextrins as functional excipients: methods to enhance complexation efficiency. *J Pharm Sci* 101 (9):3019-3032.
- [36] EM Del Valle (2004) Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem* 39 (9):1033-1046.
- [37] V Chaudhary, J Patel (2013) Cyclodextrin inclusion complex to enhance solubility of poorly water soluble drugs: A review. *Int J Phar Sci Res* 4 (1):68.
- [38] SK Chordiya MA (2012) Cyclodextrin In Drug Delivery: A Review. *Res Rev J Pharm Pharm Sci* 1 (1):19-29.
- [39] N Sharma, A Baldi (2014) Exploring versatile applications of cyclodextrins: an overview. *Drug Deliv* 23 (3):729-747.
- [40] P Mura (2015) Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review. *J Pharm Biomed Anal* 113:226-238.
- [41] A Choudhury, S Das, M Kar (2011) A review on novelty and potentiality of vaginal drug delivery. *Int J Pharm Tech Res* 3 (2):1033-1044.
- [42] D Duchêne, A Bochot (2016) Thirty years with cyclodextrins. *Int J Pharm* 514 (1):58-72.

- [43] J Biernacka, K Betlejewska-Kielak, J Witowska-Jarosz, E Kłosińska-Szmurło, AP Mazurek (2014) Mass spectrometry and molecular modeling studies on the inclusion complexes between alendronate and β -cyclodextrin. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 78 (1-4):437-443.
- [44] JC Miranda, TEA Martins, F Veiga, HG Ferraz (2011) Cyclodextrins and ternary complexes: technology to improve solubility of poorly soluble drugs. *Braz J Pharm Sci* 47 (4):665-681.
- [45] T Higuchi, A Connors (1965) Phase-solubility techniques. *Adv Chemical Inst* 4:117-212.
- [46] SS Jambhekar, P Breen (2016) Cyclodextrins in pharmaceutical formulations I: structure and physicochemical properties, formation of complexes, and types of complex. *Drug Discov Today* 21 (2):356-362.
- [47] ME Brewster, T Loftsson (2007) Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv Drug Del Rev* 59 (7):645-666.
- [48] US Sharma, SV Balasubramanian, RM Straubinger (1995) Pharmaceutical and physical properties of paclitaxel (Taxol) complexes with cyclodextrins. *J Pharm Sci* 84 (10):1223-1230.
- [49] S Alcaro, CA Ventura, D Paolino, D Battaglia, F Ortuso, L Cattel, G Puglisi, M Fresta (2002) Preparation, characterization, molecular modeling and in vitro activity of paclitaxel-cyclodextrin complexes. *Bioorg Med Chem Lett* 12 (12):1637-1641.
- [50] A Zarrabi, M Vossoughi (2015) Paclitaxel/ β -CD-g-PG inclusion complex: an insight into complexation thermodynamics and guest solubility. *J Mol Liq* 208:145-150.
- [51] M Agüeros, L Ruiz-Gatón, C Vauthier, K Bouchemal, S Espuelas, G Ponchel, J Irache (2009) Combined hydroxypropyl- β -cyclodextrin and poly (anhydride) nanoparticles improve the oral permeability of paclitaxel. *Eur J Pharm Sci* 38 (4):405-413.
- [52] M Agüeros, V Zabaleta, S Espuelas, M Campanero, J Irache (2010) Increased oral bioavailability of paclitaxel by its encapsulation through complex formation with cyclodextrins in poly (anhydride) nanoparticles. *J Control Release* 145 (1):2-8.
- [53] SG Choi, SE Lee, BS Kang, CL Ng, E Davaa, JS Park (2014) Thermosensitive and mucoadhesive sol-gel composites of paclitaxel/dimethyl- β -cyclodextrin for buccal delivery. *PLoS One* 9 (10):e109090.
- [54] Y Liu, GS Chen, Y Chen, DX Cao, ZQ Ge, YJ Yuan (2004) Inclusion complexes of paclitaxel and oligo (ethylenediamino) bridged bis (β -cyclodextrin) s: solubilization and antitumor activity. *Bioorg Med Chem* 12 (22):5767-5775.

- [55] J Jing, A Szarpak-Jankowska, R Guillot, I Pignot-Paintrand, C Picart, R Auzély-Velty (2013) Cyclodextrin/paclitaxel complex in biodegradable capsules for breast cancer treatment. *Chem Mater* 25 (19):3867-3873.
- [56] M Lahiani-Skiba, C Barbot, F Bounoure, S Joudieh, M Skiba (2006) Solubility and dissolution rate of progesterone-cyclodextrin-polymer systems. *Drug Dev Ind Pharm* 32 (9):1043-1058.
- [57] G Zoppetti, N Puppini, M Pizzutti, A Fini, T Giovani, S Comini (2007) Water soluble progesterone-hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex for injectable formulations. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 57 (1-4):283-288.
- [58] T Cerchiara, B Luppi, F Bigucci, V Zecchi (2003) Effect of chitosan on progesterone release from hydroxypropyl- β -cyclodextrin complexes. *Int J Pharm* 258 (1-2):209-215.
- [59] G Lockwood, G Griesinger, B Cometti, E Centers (2014) Subcutaneous progesterone versus vaginal progesterone gel for luteal phase support in in vitro fertilization: a noninferiority randomized controlled study. *Fertil Steril* 101 (1):112-119.e113.
- [60] K Uekama, T Fujinaga, F Hirayama, M Otagiri, M Yamasaki (1982) Inclusion complexations of steroid hormones with cyclodextrins in water and in solid phase. *Int J Pharm* 10 (1):1-15.
- [61] FY Liu, DO Kildsig, AK Mitra (1990) Beta-cyclodextrin/steroid complexation: effect of steroid structure on association equilibria. *Pharm Res* 7 (8):869-873.
- [62] G Torri, S Bertini, T Giavana, M Guerrini, N Puppini, G Zoppetti (2007) Inclusion complex characterization between progesterone and hydroxypropyl- β -cyclodextrin in aqueous solution by NMR study. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 57 (1-4):317-321.
- [63] N Schipper, W Hermens, S Romeyn, J Verhoef, F Merkus (1990) Nasal absorption of 17-beta-estradiol and progesterone from a dimethyl-cyclodextrin inclusion formulation in rats. *Int J Pharm* 64 (1):61-66.
- [64] B Luppi, T Cerchiara, F Bigucci, D Caponio, V Zecchi (2005) Bovine serum albumin nanospheres carrying progesterone inclusion complexes. *Drug Deliv* 12 (5):281-287.
- [65] E Memişoğlu, A Bochot, M Şen, D Duchêne, AA Hıncal (2003) Non-surfactant nanospheres of progesterone inclusion complexes with amphiphilic β -cyclodextrins. *Int J Pharm* 251 (1):143-153.
- [66] AM Da Silveira, G Ponchel, F Puisieux, D Duchêne (1998) Combined poly (isobutylcyanoacrylate) and cyclodextrins nanoparticles for enhancing the encapsulation of lipophilic drugs. *Pharm Res* 15 (7):1051-1055.

- [67] R Cavalli, E Peira, O Caputo, MR Gasco (1999) Solid lipid nanoparticles as carriers of hydrocortisone and progesterone complexes with β -cyclodextrins. *Int J Pharm* 182 (1):59-69.
- [68] A Muxika, A Etxabide, J Uranga, P Guerrero, K de la Caba (2017) Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. *Int J Biol Macromol* 105 (Pt 2):1358-1368.
- [69] N Bhattarai, J Gunn, M Zhang (2010) Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv Drug Del Rev* 62 (1):83-99.
- [70] Z Ma, A Garrido-Maestu, KC Jeong (2017) Application, mode of action, and in vivo activity of chitosan and its micro-and nanoparticles as antimicrobial agents: A review. *Carbohydr Polym* 176:257-265.
- [71] L Liu, Q Gao, X Lu, H Zhou (2016) In situ forming hydrogels based on chitosan for drug delivery and tissue regeneration. *Asian J Pharm Sci* 11 (6):673-683.
- [72] MN Ravi Kumar (2000) A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym* 46 (1):1-27.
- [73] S Islam, MR Bhuiyan, M Islam (2017) Chitin and chitosan: structure, properties and applications in biomedical engineering. *J Polym Environ* 25 (3):854-866.
- [74] S Pokhrel, PN Yadav, R Adhikari (2016) Applications of Chitin and Chitosan in Industry and Medical Science: A Review. *Nepal J Sci Tech* 16 (1):99-104.
- [75] J Li, DJ Mooney (2016) Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nat Rev Mat* 1:16071.
- [76] H Ibrahim, E El-Zairy (2015), Chapter 4. Chitosan as a Biomaterial-Structure, Properties, and Electrospun Nanofibers, En: *Concepts, Compounds and the Alternatives of Antibacterials*, (Ed: V Bobbarala), InTech.
- [77] L Mengatto, JA Luna, MI Cabrera (2011) Use of chitosan membranes to mimic human epidermis for the development of an estradiol delivery system. *J Pharm Innov* 6 (4):241-248.
- [78] L Mengatto, MI Cabrera, JA Luna (2012) Response surface method applied to optimization of estradiol permeation in chitosan membranes. *Bull Mater Sci* 35 (3):481-487.
- [79] IM Helbling, CA Busatto, SA Fioramonti, JI Pesoa, L Santiago, DA Estenoz, JA Luna (2018) Preparation of TPP-crosslinked chitosan microparticles by spray drying for the controlled delivery of progesterone intended for estrus synchronization in cattle. *Pharm Res* 35 (3):66.

- [80] ML Pesoa JI, Rico MJ, Rozados V, Scharovsky OG, Luna J. (2017) Sistema termosensible gel/microparticulas para liberación de paclitaxel como tratamiento adyuvante. *XII Simposio Argentino de Polímeros - SAP 2017*, Córdoba, 18-20 de Octubre p. 96.
- [81] ML Pesoa JI, Rico MJ, Rozados V, Scharovsky OG, Luna J. (2017) Sistema termosensible gel/microparticulas para liberación de paclitaxel como tratamiento intratumoral. *XII Simposio Argentino de Polímeros - SAP 2017*, Córdoba, 18-20 de Octubre p. 95.
- [82] CY Yu, XC Zhang, F-Z Zhou, XZ Zhang, SX Cheng, RX Zhuo (2008) Sustained release of antineoplastic drugs from chitosan-reinforced alginate microparticle drug delivery systems. *Int J Pharm* 357 (1):15-21.
- [83] EM Ahmed (2015) Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *J Adv Res* 6 (2):105-121.
- [84] S Simões, A Figueiras, F Veiga (2012) Modular hydrogels for drug delivery. *J Biomater Nanobiotechnol* 3 (02):185.
- [85] G Cirillo, T Spataro, M Curcio, UG Spizzirri, FP Nicoletta, N Picci, F Iemma (2015) Tunable thermo-responsive hydrogels: synthesis, structural analysis and drug release studies. *Mater Sci Eng C* 48:499-510.
- [86] CM Caramella, S Rossi, F Ferrari, MC Bonferoni, G Sandri (2015) Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery. *Adv Drug Del Rev* 92:39-52.
- [87] HT Ta, CR Dass, DE Dunstan (2008) Injectable chitosan hydrogels for localised cancer therapy. *J Control Release* 126 (3):205-216.
- [88] L Mengatto, MG Ferreyra, A Rubiolo, I Rintoul, J Luna (2013) Hydrophilic and hydrophobic interactions in cross-linked chitosan membranes. *Mater Chem Phys* 139 (1):181-186.
- [89] E Ruel-Gariepy, A Chenite, C Chaput, S Guirguis, JC Leroux (2000) Characterization of thermosensitive chitosan gels for the sustained delivery of drugs. *Int J Pharm* 203 (1):89-98.
- [90] A Chenite, M Buschmann, D Wang, C Chaput, N Kandani (2001) Rheological characterisation of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions. *Carbohydr Polym* 46 (1):39-47.
- [91] J Cho, MC Heuzey, A Bégin, PJ Carreau (2006) Chitosan and glycerophosphate concentration dependence of solution behaviour and gel point using small amplitude oscillatory rheometry. *Food Hydrocoll* 20 (6):936-945.

- [92] S Kim, SK Nishimoto, JD Bumgardner, WO Haggard, MW Gaber, Y Yang (2010) A chitosan/ β -glycerophosphate thermo-sensitive gel for the delivery of ellagic acid for the treatment of brain cancer. *Biomaterials* 31 (14):4157-4166.
- [93] Y Peng, J Li, J Li, Y Fei, J Dong, W Pan (2013) Optimization of thermosensitive chitosan hydrogels for the sustained delivery of venlafaxine hydrochloride. *Int J Pharm* 441 (1):482-490.
- [94] LN Mengatto, JI Pessoa, NS Velázquez, JA Luna (2016) Application of simultaneous multiple response optimization in the preparation of thermosensitive chitosan/glycerophosphate hydrogels. *Iran Polym J* 25 (11):897-906.
- [95] DC Montgomery (2005), *Diseño y análisis de experimentos*, Limusa Wiley, México.
- [96] R Leardi (2009) Experimental design in chemistry: a tutorial. *Anal Chim Acta* 652 (1):161-172.
- [97] LV Candiotti, MM De Zan, MS Cámara, HC Goicoechea (2014) Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta* 124:123-138.
- [98] B Louage, O De Wever, WE Hennink, BG De Geest (2017) Developments and future clinical outlook of taxane nanomedicines. *J Control Release* 253:137-152.
- [99] SH Lee, SD Yoo, K-H Lee (1999) Rapid and sensitive determination of paclitaxel in mouse plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 724 (2):357-363.
- [100] H Kumagai, W MacNaughtan, IA Farhat, JR Mitchell (2002) The influence of carrageenan on molecular mobility in low moisture amorphous sugars. *Carbohydr Polym* 48 (4):341-349.
- [101] IJ Van Den Dries, D van Dusschoten, MA Hemminga (1998) Mobility in Maltose-Water Glasses Studied with ^1H NMR. *The Journal of Physical Chemistry B* 102 (51):10483-10489.
- [102] IJ Van Den Dries, D Van Dusschoten, MA Hemminga, E Van Der Linden (2000) Effects of water content and molecular weight on spin probe and water mobility in malto-oligomer glasses. *J Phys Chem B* 104 (44):10126-10132.
- [103] RR Ruan, PL Chen (1998), Chapter 1. Nuclear Magnetic Resonance Techniques, En: *Water in foods and biological materials. A Nuclear Magnetic Resonance Approach*, CRC Press, Estados Unidos.
- [104] RR Ruan, PL Chen (1998), Chapter 2. Aspects of water in food and biological systems, En: *Water in foods and biological materials. A Nuclear Magnetic Resonance Approach*, CRC Press, Estados Unidos.

- [105] RR Ruan, PL Chen (1998), Chapter 3. Rapid determination of moisture contents in food and biological materials, En: *Water in foods and biological materials. A Nuclear Magnetic Resonance Approach*, CRC Press, Estados Unidos.
- [106] A Abragam (1961), *The principles of nuclear magnetism*, Oxford University Press, Estados Unidos.
- [107] H Hamada, K Ishihara, N Masuoka, K Mikuni, N Nakajima (2006) Enhancement of water-solubility and bioactivity of paclitaxel using modified cyclodextrins. *J Biosci Bioeng* 102 (4):369-371.
- [108] Cyclolab Ltd. (2017) Effect of inorganic salts on the inclusion complex formation and solubilizing potency of cyclodextrins. *Cyclodextrins News* 31 (5):1-11.
- [109] KH Frömring, J Szejtli (1993), Chapter 4. Cyclodextrin Inclusion Complexes Cyclodextrins in pharmacy, En: *Cyclodextrins in pharmacy*, Springer Science & Business Media, p. 45-82.
- [110] TR Devi, S Gayathri (2010) FTIR and FT-Raman spectral analysis of paclitaxel drugs. *Int J Pharm Sci Rev Res* 2 (2):106-110.
- [111] JG Hiremath, NS Khamar, SG Palavalli, CG Rudani, R Aitha, P Mura (2013) Paclitaxel loaded carrier based biodegradable polymeric implants: preparation and in vitro characterization. *Saudi Pharm J* 21 (1):85-91.
- [112] AV Zarrabi, M.; Shokrgozar, M.A. (2012) An Investigation into Inclusion Complexation of Paclitaxel and β -CD-g-PG: The Novel Approach to Nanomedicine Formulation. *Proceedings of the 4th International Conference on Nanostructures (ICNS4)*:762-764.
- [113] Q Pei, X Hu, L Wang, S Liu, X Jing, Z Xie (2017) Cyclodextrin/Paclitaxel Dimer Assembling Vesicles: Reversible Morphology Transition and Cargo Delivery. *ACS Appl Mater Interfaces* 9 (32):26740-26748.
- [114] C Nicolescu, C Arama, CM Monciu (2010) Preparation and characterization of inclusion complexes between repaglinide and β -cyclodextrin, 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and randomly methylated β -cyclodextrin. *Farmacia* 58 (1):78-88.
- [115] PS Santos, LK Souza, TS Araújo, JVR Medeiros, SC Nunes, RA Carvalho, AC Pais, FJ Veiga, LC Nunes, A Figueiras (2017) Methyl- β -cyclodextrin Inclusion Complex with β -Caryophyllene: Preparation, Characterization, and Improvement of Pharmacological Activities. *ACS Omega* 2 (12):9080-9094.
- [116] X Song, Y Wen, JI Zhu, F Zhao, ZX Zhang, J Li (2016) Thermoresponsive Delivery of Paclitaxel by β -Cyclodextrin-Based Poly (N-isopropylacrylamide) Star Polymer via Inclusion Complexation. *Biomacromolecules* 17 (12):3957-3963.

-
- [117] IJ Van Den Dries, NA Besseling, D Van Dusschoten, MA Hemminga, E Van Der Linden (2000) Relation between a Transition in Molecular Mobility and Collapse Phenomena in Glucose-Water Systems. *J Phys Chem B* 104 (39):9260-9266.
- [118] E Sabadini, T Cosgrove, F do Carmo Egídio (2006) Solubility of cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins) in H₂O and D₂O: a comparative study. *Carbohydr Res* 341 (2):270-274.
- [119] N Tabary, A Mahieu, JF Willart, E Dudognon, F Danède, M Descamps, M Bacquet, B Martel (2011) Characterization of the hidden glass transition of amorphous cyclomaltoheptaose. *Carbohydr Res* 346 (14):2193-2199.
- [120] M Messner, SV Kurkov, R Flavià-Piera, ME Brewster, T Loftsson (2011) Self-assembly of cyclodextrins: the effect of the guest molecule. *Int J Pharm* 408 (1):235-247.
- [121] A Ryzhakov, T Do Thi, J Stappaerts, L Bertolletti, K Kimpe, ARS Couto, P Saokham, G Van den Mooter, P Augustijns, GW Somsen (2016) Self-assembly of cyclodextrins and their complexes in aqueous solutions. *J Pharm Sci* 105 (9):2556-2569.
- [122] P Jansook, N Ogawa, T Loftsson (2018) Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *Int J Pharm* 535 (1-2):272-284.
- [123] RJ Glisoni, DA Chiappetta, AG Moglioni, A Sosnik (2012) Novel 1-indanone thiosemicarbazone antiviral candidates: aqueous solubilization and physical stabilization by means of cyclodextrins. *Pharm Res* 29 (3):739-755.
- [124] SA Lorenz, PM Bigwarfe, SV Balasubramanian, GJ Fetterly, RM Straubinger, TD Wood (2002) Noncovalent dimerization of paclitaxel in solution: evidence from electrospray ionization mass spectrometry. *J Pharm Sci* 91 (9):2057-2066.
- [125] G González-Gaitano, P Rodriguez, J Isasi, M Fuentes, G Tardajos, M Sánchez (2002) The aggregation of cyclodextrins as studied by photon correlation spectroscopy. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 44 (1-4):101-105.
- [126] PN LoNostro, W Barry, P Baglioni (2003), Polypseudorotaxanes from β -cyclodextrin: The role of bulk water structure in self-assembly, En: *Self-assembly*, (Ed: BH Robinson), IOS Press, p. 160-174.
- [127] I Puskás, TC Czifra, É Fenyvesi, L Szente (2013) Aggregation behavior of cyclodextrin and cholesterol in simulated human cerebrospinal fluid. *Bioact Carbohydr Dietary Fibre* 2 (2):157-163.
- [128] Y He, P Fu, X Shen, H Gao (2008) Cyclodextrin-based aggregates and characterization by microscopy. *Micron* 39 (5):495-516.
- [129] I Puskás, M Schrott, M Malanga, L Szente (2013) Characterization and control of the aggregation behavior of cyclodextrins. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 75 (3-4):269-276.
-

-
- [130] Y Shakalisava, F Regan (2006) Determination of association constants of inclusion complexes of steroid hormones and cyclodextrins from their electrophoretic mobility. *Electrophoresis* 27 (15):3048-3056.
- [131] B Ma, Y Shen, Z Fan, Y Zheng, H Sun, J Luo, M Wang (2011) Characterization of the inclusion complex of 16, 17 α -epoxyprogesterone with randomly methylated β -cyclodextrin in aqueous solution and in the solid state. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 69 (1-2):273-280.
- [132] M Cirri, F Maestrelli, S Orlandini, S Furlanetto, S Pinzauti, P Mura (2005) Determination of stability constant values of flurbiprofen–cyclodextrin complexes using different techniques. *J Pharm Biomed Anal* 37 (5):995-1002.
- [133] Y Dotsikas, YL Loukas (2003) Efficient determination and evaluation of model cyclodextrin complex binding constants by electrospray mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 14 (10):1123-1129.
- [134] T Loftsson, D Hreinsdóttir, M Másson (2005) Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. *Int J Pharm* 302 (1):18-28.
- [135] H Tomida, T Yotsuyanagi, K Ikeda (1978) Solubilization of steroid hormones by polyoxyethylene lauryl ether. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 26 (9):2832-2837.
- [136] IM Helbling, JC Ibarra, JA Luna (2014) The optimization of an intravaginal ring releasing progesterone using a mathematical model. *Pharm Res* 31 (3):795-808.
- [137] A Popielec, T Loftsson (2017) Effects of cyclodextrins on the chemical stability of drugs. *Int J Pharm* 531 (2):532-542.
- [138] T Loftsson, D Hreinsdóttir, M Másson (2007) The complexation efficiency. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 57 (1-4):545-552.
- [139] KH Frömmling, J Szejtli (1993), Chapter 5. Preparation and Characterization of Cyclodextrin Complexes Cyclodextrins in pharmacy, En: *Cyclodextrins in pharmacy*, Springer Science & Business Media, p. 83-104.
- [140] L Li, W Li, J Sun, H Zhang, J Gao, F Guo, X Yang, X Zhang, Y Li, A Zheng (2018) Preparation and Evaluation of Progesterone Nanocrystals to Decrease Muscle Irritation and Improve Bioavailability. *AAPS Pharm Sci Tech*:1-10.
- [141] Q Liu, XY Wang, H Zhang (2007) Solvent effects on infrared spectra of progesterone in CHCl₃/cyclo-C₆H₁₂ binary solvent systems. *Spectrochim Acta A: Mol Biomol Spectrosc* 66 (1):202-207.
- [142] W Saenger, T Steiner (1998) Cyclodextrin inclusion complexes: host–guest interactions and hydrogen-bonding networks. *Acta Crystallogr Sect A* 54 (6):798-805.
-

- [143] T Steiner (2003) C-H...O hydrogen bonding in crystals. *Crystallography reviews* 9 (2-3):177-228.
- [144] LG Liu, QX. (2002) The Driving Forces in the Inclusion Complexation of Cyclodextrins. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 42:1-14.
- [145] P Salústio, G Feio, J Figueirinhas, J Pinto, HC Marques (2009) The influence of the preparation methods on the inclusion of model drugs in a β -cyclodextrin cavity. *Eur J Pharm Biopharm* 71 (2):377-386.
- [146] G Zoppetti (2011) Evaluation of Host/Guest Cyclodextrin Complex by NMR in Drug Product Development. En: *Structure-activity Relationship Studies in Drug Development by NMR Spectroscopy: Volume 1*, (Ed: Atta-ur-Rahman, MI Choudhary), Bentham Books, p. 156-183.
- [147] J Jablan, T Weitner, M Gabričević, M Jug (2011) Stability and structure of inclusion complexes of zaleplon with natural and modified cyclodextrins. *Croat Chem Acta* 84 (2):169-178.
- [148] A García, D Leonardi, MO Salazar, MC Lamas (2014) Modified β -cyclodextrin inclusion complex to improve the physicochemical properties of albendazole. Complete in vitro evaluation and characterization. *PLoS One* 9 (2):e88234.
- [149] E Cicinelli, D De Ziegler, C Bulletti, MG Matteo, LM Schonauer, P Galantino (2000) Direct transport of progesterone from vagina to uterus. *Obstet Gynecol* 95 (3):403-406.
- [150] A Tavaniotou, J Smitz, C Bourgain, P Devroey (2000) Comparison between different routes of progesterone administration as luteal phase support in infertility treatments. *Hum Reprod Update* 6 (2):139-148.
- [151] KM Silverberg, TC Vaughn, LJ Hansard, NZ Burger, T Minter (2012) Vaginal (Crinone 8%) gel vs. intramuscular progesterone in oil for luteal phase support in in vitro fertilization: a large prospective trial. *Fertil Steril* 97 (2):344-348.
- [152] A Moini, F Zafarani, B Eslami, M Sadeghi, Z Kamyabi, N Jahangiri (2011) Comparing intramuscular progesterone, vaginal progesterone and 17-hydroxyprogesterone caproate in IVF and ICSI cycle. *Iran J Reprod Med* 9 (2):119-124.
- [153] Y Wang, Y He, X Zhao, X Ji, Y Hong, Y Wang, Q Zhu, B Xu, Y Sun (2015) Crinone gel for luteal phase support in frozen-thawed embryo transfer cycles: a prospective randomized clinical trial in the Chinese population. *PLoS One* 10 (7):e0133027.
- [154] JH Check (2009) Luteal phase support in assisted reproductive technology treatment: focus on endometrin®(progesterone) vaginal insert. *Ther Clin Risk Manag* 5:403-407.

- [155] MR Marques, R Loebenberg, M Almukainzi (2011) Simulated biological fluids with possible application in dissolution testing. *Dissolut Technol* 18 (3):15-28.
- [156] HY Zhou, XG Chen, M Kong, CS Liu (2009) Preparation of chitosan-based thermosensitive hydrogels for drug delivery. *J Appl Polym Sci* 112 (3):1509-1515.
- [157] R Monteiro Machado, A Palmeira-de-Oliveira, C Gaspar, J Martinez-de-Oliveira, R Palmeira-de-Oliveira (2015) Studies and methodologies on vaginal drug permeation. *Adv Drug Del Rev* 92:14-26.
- [158] S Cascone (2017) Modeling and comparison of release profiles: Effect of the dissolution method. *Eur J Pharm Sci* 106:352-361.
- [159] S Supper, N Anton, N Seidel, M Riemenschnitter, C Curdy, T Vandamme (2014) Thermosensitive chitosan/glycerophosphate-based hydrogel and its derivatives in pharmaceutical and biomedical applications. *Expert Opin Drug Deliv* 11 (2):249-267.
- [160] X Chen, X Li, Y Zhou, X Wang, Y Zhang, Y Fan, Y Huang, Y Liu (2012) Chitosan-based thermosensitive hydrogel as a promising ocular drug delivery system: preparation, characterization, and in vivo evaluation. *J Biomater Appl* 27 (4):391-402.
- [161] J Ostrowska-Czubenko, M Gierszewska-Drużyńska (2009) Effect of ionic crosslinking on the water state in hydrogel chitosan membranes. *Carbohydr Polym* 77 (3):590-598.
- [162] Z Modrzejewska, A Skwarczyńska, W Maniukiewicz, TE Douglas (2014) Mechanism of formation of thermosensitive chitosan chloride gels. *Prog Chem Appl Chitin Deriv* 19:125-134.
- [163] A Islam, M Riaz, T Yasin (2013) Structural and viscoelastic properties of chitosan-based hydrogel and its drug delivery application. *Int J Biol Macromol* 59:119-124.
- [164] FM Goycoolea, ME Fernández-Valle, I Aranaz, Á Heras (2011) pH- and Temperature-Sensitive Chitosan Hydrogels: Swelling and MRI Studies. *Macromol Chem Phys* 212 (9):887-895.
- [165] MH Ho, PY Kuo, HJ Hsieh, TY Hsien, LT Hou, JY Lai, DM Wang (2004) Preparation of porous scaffolds by using freeze-extraction and freeze-gelation methods. *Biomaterials* 25 (1):129-138.
- [166] FF Dehghani, Ali (2016), Chapter 5. Hydrogel Architecture, En: *Gels Handbook: Fundamentals, Properties, Applications (In 3 Volumes)*, (Ed: UK Demirci, Ali), World Scientific, p. 81-130.
- [167] X Wu, L Black, G Santacana-Laffitte, CW Patrick (2007) Preparation and assessment of glutaraldehyde-crosslinked collagen-chitosan hydrogels for adipose tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 81 (1):59-65.

- [168] AM Hillery (2005), Chapter 1. Drug Delivery: The Basic Concepts, En: *Drug delivery and targeting: for pharmacists and pharmaceutical scientists*, (Ed: AM Hillery, AW Lloyd, J Swarbrick), CRC Press, p. 1-42.
- [169] VM Ndesendo, V Pillay, YE Choonara, LC du Toit, E Buchmann, LC Meyer, RA Khan, U Rosin (2010) Investigation of the physicochemical and physicomechanical properties of a novel intravaginal bioadhesive polymeric device in the pig model. *AAPS PharmSciTech* 11 (2):793-808.
- [170] SJ Wu, JR Robinson (1996), Vaginal epithelial models, En: *Models for Assessing Drug Absorption and Metabolism. Pharmaceutical Biotechnology*, (Ed: RTS Borchardt, P.L.; Wilson, G.), Springer, Boston, MA, p. 409-424.
- [171] VV Kale, A Ubgade (2013) Vaginal Mucosa—A Promising Site for Drug Therapy. *British J Pharm Res* 3 (4):983-1000.
- [172] A Hussain, F Ahsan (2005) The vagina as a route for systemic drug delivery. *J Control Release* 103 (2):301-313.
- [173] T Loftsson, M Masson (2001) Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. *Int J Pharm* 225 (1-2):15-30.
- [174] VJ Stella, VM Rao, EA Zannou, V Zia (1999) Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. *Adv Drug Del Rev* 36 (1):3-16.
- [175] S Shimpi, B Chauhan, P Shimpi (2005) Cyclodextrins: application in different routes of drug administration. *Acta pharmaceutica* 55 (2):139-156.
- [176] A Miro, F Ungaro, F Quaglia (2011) Chapter 4. Cyclodextrins as Smart Excipients in Polymeric Drug Delivery Systems. En: *Cyclodextrins in Pharmaceuticals, Cosmetics, and Biomedicine: Current and Future Industrial Applications*, (Ed: E Bilensoy), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, p. 65-89.

/ANEXO

ANEXO

1. RAME β -CD

La nomenclatura elegida para los grupos de la RAME β -CD fue:

- 1) 6-OH: Grupos hidroxilos primarios en C6, son los reaccionan preferentemente al ataque electrofílico.
- 2) 2-OH: Grupos hidroxilos secundarios en C2, son los grupos donante en la conformación de puentes hidrógeno.
- 3) 3-OH: Grupos hidroxilos secundarios en C3, son hidroxilos aceptores y son los menos reactivos.
- 4) 6-CH₂: Grupo -CH₂ en C6.
- 5) 6-OCH₃: Grupo metilo sustituyente en C6.
- 6) 2-OCH₃: Grupo metilo sustituyente en C2.
- 7) 3-OCH₃: Grupo metilo sustituyente en C3.

La β -CD nativa tiene 70 hidrógenos (C₄₂H₇₀O₃₅). Por otro lado, la RAME β -CD, al tener un grado de sustitución (GS) de 12,6, tiene sustituidos por grupos metilos: los 7 protones de los 6-OH y 5,6 protones de los 2-OH por CD. De esta manera, 7 protones se reemplazan por 21 protones de los 6-OCH₃ y 5,6 protones por 16,8 protones de los 2-OCH₃. Por lo tanto, se considera que la RAME β -CD liofilizada tiene 95,2 H en total (Figura 48).

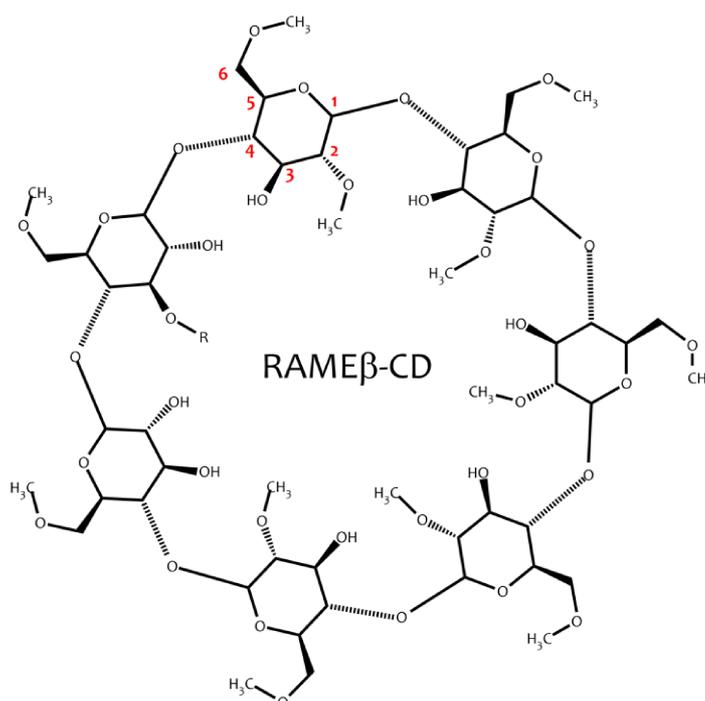


Figura 48. Estructura química de la RAME β -CD, GS=12,6. R puede ser H o CH₃.

En la Tabla 35 se muestra la clasificación, cuantificación teórica (%) y cuantificación experimental (% señal de RMNp) de los protones por unidad de CD liofilizada. La intensidad de señal (A) es proporcional a la cantidad de protones y permitió cuantificar dicha cantidad para cada una de las poblaciones de protones: 78,18 % de protones rígidos, 21,41 % de protones menos rígidos y 0,41 % de protones móviles. Si bien la fracción de protones móviles es mínima, su término se mantuvo dado que permitía un mejor ajuste de la curva experimental de decaimiento con la Ecuación 1.4. No obstante, en el análisis la contribución de esta población de protones se sumó a la de los protones menos rígidos y se obtuvo un porcentaje total de 21,82 %. Esto fue realizado debido a que el valor de T_2 fue menor a la unidad de milisegundo ($0,018 \text{ ms} = 18 \mu\text{s}$).

Tabla 35. Clasificación y cuantificación de protones teóricos y experimentales de la RAME β -CD liofilizada.

PROTONES RÍGIDOS	CANTIDAD	CUANTIFICACIÓN TEÓRICA (%)	CUANTIFICACIÓN EXPERIMENTAL (%)
Unidos a glucosa	35	36,76	
De los metilenos	14	14,71	
De los hidroxilos en 3	7	7,35	
De los hidroxilos en 2	1,4	1,47	
De los metilos en 2	16,8	17,64	
Total	74,2	77,93	78,18
PROTONES MENOS RÍGIDOS	CANTIDAD	CUANTIFICACIÓN TEÓRICA (%)	CUANTIFICACIÓN EXPERIMENTAL (%)
De los metilos en 6	21	22,06	
Total	21	22,06	21,82

En la Tabla 36 se muestra la clasificación, cuantificación teórica (%) y cuantificación experimental (% señal de RMNp) de los protones por unidad de CD sin liofilizar. La intensidad de señal permitió diferenciar y cuantificar las siguientes poblaciones de protones: 81,41 % de protones rígidos, 16,89 % de protones menos rígidos y 1,70 % de protones móviles. Para la fracción de protones móviles se tuvo la misma consideración que la CD liofilizada, es decir que se sumó a la de los protones menos rígidos y se obtuvo un porcentaje total de 21,82 %. Esto se realizó ya que el valor de T_2 fue menor a la unidad de milisegundo ($0,013 \text{ ms} = 13 \mu\text{s}$).

En este caso, la fracción de protones rígidos es mayor, ya que en la CD sin liofilizar se encuentran moléculas de agua tanto en su cavidad como en el exterior, que ayudan a que tenga una estructura más rígida.

Tabla 36. Clasificación y cuantificación de protones teóricos y experimentales de la RAME β -CD sin liofilizar.

PROTONES RÍGIDOS	CANTIDAD	CUANTIFICACIÓN TEÓRICA (%)	CUANTIFICACIÓN EXPERIMENTAL (%)
Unidos a glucosa	35	30,59	
De los metilenos	14	12,24	
De los hidroxilos en 3	7	6,12	
De los hidroxilos en 2	1,4	1,22	
De los metilos en 2	16,8	14,69	
6 moléculas de agua en cavidad	12	10,49	
3,6 moléculas de agua en exterior	7,2	6,29	
Total	93,4	81,64	81,41
PROTONES MENOS RÍGIDOS	CANTIDAD	CUANTIFICACIÓN TEÓRICA (%)	CUANTIFICACIÓN EXPERIMENTAL (%)
De los metilos en 6	21	18,36	
Total	21	18,36	18,59

2. MEZCLA FÍSICA

En el caso de las MF se tuvo como consideración que no existía interacción entre el PTX y la CD. Por esto se sumaron los protones rígidos y menos rígidos de ambos componentes puros para calcular la proporción de cada fracción. La intensidad de señal (A) es proporcional a la cantidad de protones y permitió cuantificar dicha cantidad para cada una de las poblaciones de protones. La proporción de protones móviles en todas las mezclas analizadas estuvo entre 0,5-4,3 % con valores de T_2 entre 8,3-25 μ s. Debido a la menor cantidad en comparación con las otras poblaciones y a los valores de T_2 , se realizó la misma consideración que para los componentes puros, y esta fracción móvil se sumó a la fracción de protones menos rígidos. En las Tabla 37 a 40 se muestra la clasificación, cuantificación teórica (%) y cuantificación experimental (% señal de RMNp) de los protones para las distintas MF.

Tabla 37. Clasificación y cuantificación de protones teóricos y experimentales de la MF 1:10.

PROTONES RÍGIDOS	CANTIDAD	CUANTIFICACIÓN TEÓRICA (%)	CUANTIFICACIÓN EXPERIMENTAL (%)
De 10 CD	742	73,98	
De 1 PTX	41	4,09	
Total	783	78,07	51,69
PROTONES MENOS RÍGIDOS	CANTIDAD	CUANTIFICACIÓN TEÓRICA (%)	CUANTIFICACIÓN EXPERIMENTAL (%)
De 10 CD	210	20,93	
De 1 PTX	10	1,00	
Total	220	21,93	48,31

Tabla 38. Clasificación y cuantificación de protones teóricos y experimentales de la MF 1:15.

PROTONES RÍGIDOS	CANTIDAD	CUANTIFICACIÓN TEÓRICA (%)	CUANTIFICACIÓN EXPERIMENTAL (%)
De 15 CD	1113	75,5	
De 1 PTX	41	2,78	
Total	1154	78,03	71,12
PROTONES MENOS RÍGIDOS	CANTIDAD	CUANTIFICACIÓN TEÓRICA (%)	CUANTIFICACIÓN EXPERIMENTAL (%)
De 15 CD	315	21,29	
De 1 PTX	10	0,68	
Total	325	21,97	28,88

Tabla 39. Clasificación y cuantificación de protones teóricos y experimentales de la MF 1:20.

PROTONES RÍGIDOS	CANTIDAD	CUANTIFICACIÓN TEÓRICA (%)	CUANTIFICACIÓN EXPERIMENTAL (%)
De 20 CD	1484	75,90	
De 1 PTX	41	2,10	
Total	1525	78,00	70,78
PROTONES MENOS RÍGIDOS	CANTIDAD	CUANTIFICACIÓN TEÓRICA (%)	CUANTIFICACIÓN EXPERIMENTAL (%)
De 20 CD	420	21,48	
De 1 PTX	10	0,52	
Total	430	22,00	29,22

Tabla 40. Clasificación y cuantificación de protones teóricos y experimentales de la MF 1:30.

PROTONES RÍGIDOS	CANTIDAD	CUANTIFICACIÓN TEÓRICA (%)	CUANTIFICACIÓN EXPERIMENTAL (%)
De 30 CD	2226	76,57	
De 1 PTX	41	1,41	
Total	2267	77,98	43,94
PROTONES MENOS RÍGIDOS	CANTIDAD	CUANTIFICACIÓN TEÓRICA (%)	CUANTIFICACIÓN EXPERIMENTAL (%)
De 30 CD	630	21,68	
De 1 PTX	10	0,34	
Total	640	22,02	56,06

3. COMPLEJOS DE INCLUSIÓN

En el caso de los CI se tuvo como consideración que al incluirse el PTX en la cavidad, sus protones pierden movilidad y por esto solo quedan como componentes de la fracción menos rígida los protones pertenecientes a esta fracción de la CD. Todos los protones del PTX se consideran rígidos y se suman a los protones rígidos de la CD. La intensidad de señal (A) es proporcional a la cantidad de protones y permitió cuantificar dicha cantidad para cada una de las poblaciones de protones. Debido a la menor cantidad de protones móviles en comparación con las otras poblaciones y a los valores de T_2 entre 14-21 μ s se realizó la

misma consideración que para las muestras anteriores y esta fracción móvil se sumó a la fracción de protones menos rígidos. En las Tabla 41 a 45 se muestra la clasificación, cuantificación teórica (%) y cuantificación experimental (% señal de RMNp) de los protones para todos los CI.

Tabla 41. Clasificación y cuantificación de protones teóricos y experimentales de la CI 1:10.

PROTONES RÍGIDOS	CANTIDAD	CUANTIFICACIÓN TEÓRICA (%)	CUANTIFICACIÓN EXPERIMENTAL (%)
De 10 CD	742	73,98	
De 1 PTX	51	5,09	
Total	793	79,06	66,22
PROTONES MENOS RÍGIDOS	CANTIDAD	CUANTIFICACIÓN TEÓRICA (%)	CUANTIFICACIÓN EXPERIMENTAL (%)
De 10 CD	210		
Total	210	20,94	33,78

Tabla 42. Clasificación y cuantificación de protones teóricos y experimentales de la CI 1:15.

PROTONES RÍGIDOS	CANTIDAD	CUANTIFICACIÓN TEÓRICA (%)	CUANTIFICACIÓN EXPERIMENTAL (%)
De 15 CD	1113	75,26	
De 1 PTX	51	3,45	
Total	1164	78,71	66,77
PROTONES MENOS RÍGIDOS	CANTIDAD	CUANTIFICACIÓN TEÓRICA (%)	CUANTIFICACIÓN EXPERIMENTAL (%)
De 15 CD	315		
Total	315	21,29	33,23

Tabla 43. Clasificación y cuantificación de protones teóricos y experimentales de la CI 1:20.

PROTONES RÍGIDOS	CANTIDAD	CUANTIFICACIÓN TEÓRICA (%)	CUANTIFICACIÓN EXPERIMENTAL (%)
De 20 CD	1484	75,90	
De 1 PTX	51	2,62	
Total	1535	78,52	78,92
PROTONES MENOS RÍGIDOS	CANTIDAD	CUANTIFICACIÓN TEÓRICA (%)	CUANTIFICACIÓN EXPERIMENTAL (%)
De 20 CD	420		
Total	420	21,48	21,08

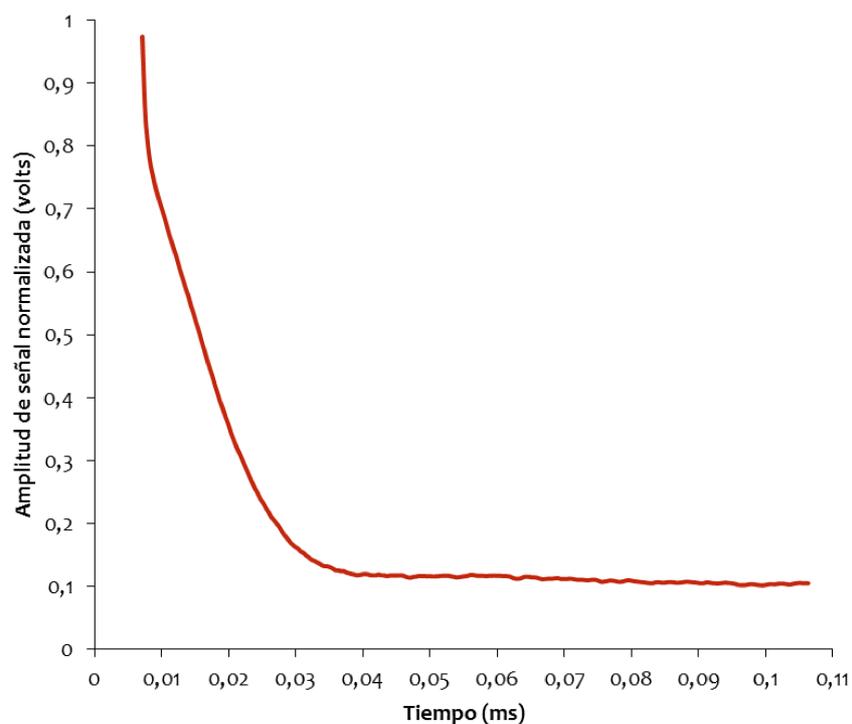
Tabla 44. Clasificación y cuantificación de protones teóricos y experimentales de la CI 1:30.

PROTONES RÍGIDOS	CANTIDAD	CUANTIFICACIÓN TEÓRICA (%)	CUANTIFICACIÓN EXPERIMENTAL (%)
De 30 CD	2226	76,58	
De 1 PTX	51	1,75	
Total	2277	78,33	80,00
PROTONES MENOS RÍGIDOS	CANTIDAD	CUANTIFICACIÓN TEÓRICA (%)	CUANTIFICACIÓN EXPERIMENTAL (%)
De 30 CD	630		
Total	630	21,67	20,00

Tabla 45. Clasificación y cuantificación de protones teóricos y experimentales de la CI 1:40.

PROTONES RÍGIDOS	CANTIDAD	CUANTIFICACIÓN TEÓRICA (%)	CUANTIFICACIÓN EXPERIMENTAL (%)
De 40 CD	2968	76,91	
De 1 PTX	51	1,32	
Total	3019	78,23	82,01
PROTONES MENOS RÍGIDOS	CANTIDAD	CUANTIFICACIÓN TEÓRICA (%)	CUANTIFICACIÓN EXPERIMENTAL (%)
De 40 CD	840		
Total	840	21,77	17,99

A modo de ejemplo se muestra en la Figura 49 la curva de decaimiento de inducción libre (FID) de CI 1:20.

**Figura 49.** Curva de decaimiento del CI 1:20.