

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

**Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**



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

**Matrices de quitosano para la liberación controlada de  
fluoruro de sodio**

**Tesista: Lic. Federico Adrian Fookes**

**Director de Tesis: Dr. Julio Alberto Luna**

**Co-director de Tesis: Dr. Alfredo Rigalli**

**Laboratorio de Química Fina - Instituto de Desarrollo  
Tecnológico para la Industria Química (INTEC) - Facultad  
de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB) - Universidad  
Nacional del Litoral (UNL)**

**-2019-**



# Agradecimientos

# Agradecimientos

Un trabajo como el realizado en esta tesis no es un hecho individual, sino colectivo, es por esto que es necesario agradecer a todas las personas e instituciones que colaboraron en este proceso.

En primer lugar quiero agradecer al estado nacional, por brindar el soporte y apoyo a través de sus instituciones para llevar a cabo un trabajo como el realizado en esta tesis.

A Julio, por acompañarme a lo largo de todo este tiempo y compartir discusiones y puntos de vista sobre diversos temas.

A Alfredo, por su siempre atenta e inmediata colaboración y por mostrarme nuevas áreas del conocimiento.

A Leti, a quien si tuviese que hacer una lista detallada de los motivos para agradecerle, este documento tendría unas cuantas páginas más.

A la Universidad Nacional del Litoral y la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas por haberme albergado en tantos años de estudio y ser ambas un ámbito donde el pensamiento ebulle.

A todas las personas que trabajan en el INTEC por darme su compañía a lo largo de todo este trayecto.

Al laboratorio de Biología Ósea de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Rosario donde me han instruido, ayudado y soportado mientras realizaba los ensayos en animales.

A mi familia, una red de contención y apoyo que me acompaña en todas las emociones.

A Nati, Juan y Pablo por hacer de la cotidianeidad laboral una experiencia entrañable.

A Luciano, Elan, Fede, Andrea, Yura, Vicky y Nacho por brindarme su amistad y sus saberes.

A la “mesa pergolera” donde me confirmaron que se puede hacer ciencia, debatir cualquier tema y pasarla bien.

A mis amigos que fui cosechando en todos los lugares por donde anduve y siempre ofrecen su oído y ayuda para lo que les pida.

A Nati, Leti, Lore, Vidu y Mati.



# Publicaciones

## Publicaciones

- Controlled fluoride release for osteoporosis treatment using orally administered chitosan hydrogels (2019). Federico A. Fookes; Luciano N. Mengatto; Alfredo Rigalli; Julio A. Luna. *J Drug Deliv Sci Tec.* 51:268-275.



**Índice de  
contenidos**

# Índice de contenidos

<b>Agradecimientos</b> .....	ii
<b>Publicaciones</b> .....	iv
<b>Índice de contenidos</b> .....	vii
<b>Abreviaturas y símbolos</b> .....	xiii
<b>Resumen</b> .....	xvi
<b>Abstract</b> .....	xx
<b>Introducción</b> .....	1
1. Introducción .....	2
2. Sistemas de liberación de fármacos.....	2
2.1 Mecanismos de control de la liberación de fármacos .....	4
2.2 Sistemas multiparticulados de liberación de fármacos.....	5
3. Quitosano .....	5
3.1 Solubilidad del CS .....	6
3.2 Biodegradación del CS .....	7
3.3 Propiedades biológicas del CS .....	7
3.4 Aplicaciones biomédicas del CS.....	7
4. Lecho fluido .....	9
4.1 Descripción del fenómeno .....	9
4.2 Propiedades de un lecho fluidizado.....	10
4.3 Cálculo de la velocidad del aire .....	11
4.4 Regímenes de fluidificación .....	13
4.5 Tipos de lecho fluido .....	14

4.6 Recubrimientos de partículas con lecho fluido .....	16
5. Hidrogel quitosano – glicerofosfato .....	17
5.1 Aplicaciones de hidrogeles CS/GP en liberación controlada .....	19
6. Fluoruro de Sodio como droga modelo .....	19
7. Modelos cinéticos de liberación de API .....	22
8. Análisis estadístico de los datos .....	24
Objetivo general.....	26
Objetivos específicos.....	26
<b>Capítulo 1- Micropartículas de Quitosano .....</b>	<b>27</b>
1.1 Introducción .....	29
1.2 Objetivos .....	29
1.3 Materiales y métodos.....	30
1.3.1 Materiales.....	30
1.3.1.1 Lecho fluido .....	30
1.3.2 Condiciones del proceso .....	31
1.3.3 Obtención de partículas mediante lecho fluido .....	32
1.3.3.1 Inclusión de NaF mediante la tecnología de lecho fluidizado .....	32
1.3.3.2 Elaboración de partículas con diferente concentración de ácido acético .....	33
1.3.3.3 Obtención de partículas de CS y fluoruro a partir de diferentes granulometrías de CS ..	33
1.3.3.4 Recubrimientos sobre partículas de C-f.....	34
1.3.3.4.1 Recubrimiento con PVP .....	34
1.3.3.4.2 Recubrimiento con EUDRAGIT® RS30D .....	35
1.3.3.4.2.1 Recubrimiento por lecho fluido .....	35
1.3.3.4.2.2 Recubrimiento por inmersión .....	37



1.3.4 Caracterización de las partículas.....	37
1.3.4.1 Cálculo de rendimiento de proceso y eficiencia de entrapamiento del NaF.....	37
1.3.4.1.1 Determinación de la concentración de fluoruro.....	37
1.3.4.2 Determinación del contenido de materia seca.....	38
1.3.4.3 Dispersión de tamaños .....	38
1.3.4.4 Cálculo de la densidad de partículas.....	39
1.3.4.5 Espectroscopía infrarroja .....	39
1.3.4.6 Microscopía electrónica de barrido .....	39
1.3.5 Ensayos de liberación in vitro.....	40
1.4 Resultados y conclusiones .....	41
1.4.1 Determinación de las condiciones del proceso.....	41
1.4.2 Obtención de las partículas de CS-f.....	42
1.4.3 Efecto de la incorporación de ácido acético en las partículas de CS-f.....	43
1.4.4 Partículas CS-f, AA10 y AA15.....	43
1.4.4.1 Caracterización del proceso.....	43
1.4.4.2 Distribución de tamaño de las partículas.....	44
1.4.4.3 Análisis de espectroscopia infrarroja.....	45
1.4.4.4 Ensayo de liberación de fluoruro.....	47
1.4.5 Efecto de la distribución de tamaño del CS .....	49
1.4.5.1 Caracterización de las partículas .....	50
1.4.5.1.1 Rendimiento del proceso .....	50
1.4.5.1.2 Distribución de tamaño de las partículas .....	50
1.4.5.2 Ensayo de liberación de fluoruro.....	51
1.4.5.1.3 Microscopía electrónica de barrido .....	52

1.4.6 Partículas recubiertas con PVP .....	55
1.4.6.1 Caracterización del proceso.....	56
1.4.6.2 Distribución de tamaño de las partículas.....	56
1.4.6.3 Análisis de FTIR.....	57
1.4.6.4 Microscopía electrónica de barrido .....	58
1.4.6.5 Ensayo de liberación de fluoruro.....	59
1.4.7 Partículas recubiertas con EUDRAGIT® RS30D .....	60
1.4.7.1 Caracterización de las partículas recubiertas por lecho fluidizado.....	61
1.4.7.1.1 Rendimiento del proceso .....	61
1.4.7.1.2 Microscopía electrónica de barrido .....	61
1.4.7.1.3 Ensayo de liberación de fluoruro .....	63
1.4.7.2 Caracterización de partículas recubiertas por inmersión.....	64
1.4.7.2.1 Concentración del principio activo en las partículas .....	64
1.4.7.2.2 Distribución de tamaño de las partículas .....	65
1.4.7.2.3 Microscopía electrónica de barrido .....	66
1.4.7.2.4 Análisis de FTIR.....	67
1.4.7.2.5 Ensayo de liberación de fluoruro .....	69
1.5 Conclusiones parciales .....	73
<b>Capítulo 2 – Hidrogeles de CS-GP .....</b>	<b>74</b>
2.1 Introducción .....	76
2.2 Objetivos .....	76
2.3 Materiales y métodos.....	76
2.3.1 Materiales.....	76
2.3.2 Métodos.....	77

2.3.2.1 Preparación de los geles de CS-GP.....	77
2.3.2.2 Estabilidad de los geles a diferentes pH.....	78
2.3.2.3 Estudios de espectroscopía infrarroja.....	78
2.3.2.4 Ensayos de liberación.....	78
2.3.2.5 Microscopía electrónica de barrido .....	79
2.3.2.6 Mediciones reológicas .....	79
2.3.2.7 Difracción de rayos X.....	79
2.3.2.8 Determinación del contenido de sodio en muestras acuosas .....	80
2.4 Resultados .....	81
2.4.1 Estabilidad de los geles a diferentes pH .....	81
2.4.2 Estudios de espectroscopia infrarroja .....	83
2.4.3 Mediciones reológicas .....	84
2.4.4 Microscopía electrónica de barrido.....	88
2.4.5 Estudios de difracción de rayos X.....	89
2.4.6 Ensayos de liberación del principio activo.....	90
2.4.7 Cinética de la liberación in vitro .....	93
2.4.8 Cinética de migración de GP .....	95
2.5 Conclusiones parciales .....	97
<b>Capítulo 3 – Evaluación in vivo de los hidrogeles CS/GP/NaF .....</b>	<b>99</b>
3.1 Introducción .....	101
3.2 Objetivos .....	101
3.3 Materiales y métodos.....	102
3.3.1 Estudios in vivo .....	102
3.3.2 Excreción urinaria y fecal de fluoruro .....	103

3.3.2 Fluoremia.....	103
3.3.3 Determinación de contenido de fluoruro en muestras biológicas .....	103
3.3.4 Glucemia .....	104
3.3.5 Insulinemia.....	104
3.3.6 Fosfatemia.....	105
3.4 Resultados.....	106
3.4.1 Farmacocinética del fluoruro .....	106
3.4.2 Excreción urinaria y fecal de fluoruro .....	107
3.4.5 Insulinemia y glucemia .....	109
3.4.6 Fosfatemia.....	111
3.5 Conclusiones parciales .....	112
<b>Conclusiones.....</b>	<b>114</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>118</b>



**Abreviaturas  
y símbolos**

## Abreviaturas y símbolos

AA	=	Ácido acético
AIC	=	Aikike Information Criteria
API	=	active pharmaceutical ingredient
$A_r$	=	número de Arquímedes
CS	=	quitosano
D	=	concentración de F en estómago e intestino
$D_0$	=	dosis inicial de fluoruro
$d_p^*$	=	diámetro de partícula adimensional
DRX	=	microscopía electrónica de barrido
EDS	=	espectroscopía de rayos X por energía dispersiva
F	=	concentración plasmática de F
$F_0$	=	dosis única de fluoruro de sodio
FTIR	=	espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
$G'$	=	módulo de almacenamiento
$G''$	=	módulo de pérdida
GP	=	glicerofosfato de sodio
$k_1$	=	constante de proporcionalidad
$k_e$	=	constante de depuración plasmática
$k_g$	=	constantes de velocidad de absorción gástrica
$k_i$	=	constantes de velocidad de absorción intestinal
$k_o$	=	constante de velocidad de absorción ósea
$k_0$	=	constante cinética del modelo de orden cero
$k_p$	=	constante de liberación del modelo de Korsmeyer-Peppas
$k_u$	=	constante de velocidad debida a la eliminación por vía urinaria
n	=	exponente de liberación del modelo de Korsmeyer-Peppas
$\eta^*$	=	viscosidad compleja
$n_p$	=	número de observaciones de la ecuación de AIC
$\emptyset$	=	factor de forma
p	=	número de parámetros que utiliza un modelo
$P_{bag}$	=	presión en la parte superior del lecho
$P_{bed}$	=	presión de aire en la base
PVP	=	polivinilpirrolidona
$Q_\infty$	=	cantidad de droga liberada al finalizar el ensayo
$Q_{aire}$	=	caudal de aire de fluidificación
$Q_t$	=	cantidad de droga liberada a tiempo t
SSR	=	suma de cuadrados de los residuos
TGI	=	tracto gastrointestinal

- $U$  = *velocidad del aire en el lecho*  
 $U_{mf}$  = *velocidad de fluidificación mínima*  
 $U_t$  = *velocidad de aire máxima o terminal*  
 $U_t^*$  = *velocidad terminal adimensional*



# Resumen



# Resumen

La administración oral de fármacos suele ser la vía más conveniente y preferida por las personas. Para producir su acción terapéutica característica, un principio activo debe alcanzar la concentración adecuada en el sitio donde actúa, esto está gobernado no solo por las características del fármaco (solubilidad, cinética de disolución, estabilidad) sino también por la absorción, biodistribución y por las propiedades de la matriz que lo contiene.

El quitosano es un polisacárido natural, biodegradable y biocompatible. Posee propiedades biológicas particulares como alta mucoadhesión, mejora en la cicatrización de heridas y la hemostasia además de tener actividad como antibacteriano, antifúngico y antiviral. Es por esto que ha sido propuesto para una gran variedad de aplicaciones biomédicas, entre ellas la formulación de matrices para la liberación controlada de un amplio número de fármacos para diversos usos como el tratamiento de cáncer, antiinflamatorios y analgésicos entre otros.

La osteoporosis es una enfermedad que se caracteriza por la pérdida de masa ósea y un deterioro en la microestructura de los huesos. El fluoruro de sodio es utilizado desde hace décadas en los tratamientos de osteoporosis, sin embargo, existen trabajos que discuten el potencial efecto negativo del fluoruro como desórdenes hormonales y fluorosis esquelética y dental cuando es aplicado en altas dosis o de manera crónica.

Debido a sus propiedades, el quitosano es una alternativa promisoriosa para la formulación de matrices para la liberación sostenida de fluoruro de sodio que permitan disminuir sus efectos adversos.

En el primer capítulo de esta tesis (*Micropartículas de quitosano*), se utilizó la tecnología de lecho fluido para la elaboración de micropartículas portadoras de fluoruro de sodio basadas en quitosano. En primer instancia se determinaron las condiciones de proceso que permitieran manipular este polímero en un equipo de lecho fluidizado para luego incorporar el principio activo. Se estudiaron diversas alternativas de formulación como la inclusión de un ácido débil (ácido acético) y el pretratamiento del polímero antes de la inclusión del fluoruro de sodio.

A excepción de las partículas con un rango de tamaño entre 0 y 75  $\mu\text{m}$ , en todos los casos se logró una correcta manipulación del quitosano en el lecho fluido con rendimientos de proceso mayores al 80 %. Todas las partículas mostraron una rápida liberación del fluoruro

(más del 60 % en los primeros 15 minutos). Basado en los resultados de los estudios de FTIR y SEM se pudo inferir que la rápida liberación se debe a una baja o nula interacción del quitosano con el fluoruro y a que este último se depositó en la superficie de las partículas formando cristales.

Además, se aplicaron recubrimientos poliméricos (polivinilpirrolidona y Eudragit® RS 30D) sobre la superficie de las partículas mediante la tecnología de lecho fluidizado y por inmersión. Cuando el recubrimiento fue aplicado mediante la tecnología de lecho fluido, las partículas obtenidas para ambos polímeros mostraron perfiles de liberación similares a las no recubiertas. Por otro lado las partículas recubiertas por inmersión con Eudragit® RS 30D mostraron una liberación más atenuada y dependiente del tiempo de exposición al polímero. Los ensayos del SEM mostraron que al aplicarse el recubrimiento por inmersión se obtuvo una capa de mayor espesor que modera la liberación.

En el capítulo 2 (*Hidrogeles de CS-GP*) se abarcó el estudio de geles de quitosano y glicerofosfato de sodio para la liberación de fluoruro. En primera instancia se ensayó la estabilidad de los hidrogeles con y sin fluoruro en soluciones tampón de pH 2 a 7. Los resultados mostraron que éstos son estables por más de 24 h en el rango de pH comprendido entre 4 y 7. Luego se realizaron caracterizaciones de los hidrogeles por técnicas como SEM, FTIR, DRX y mediciones reológicas. Se observó que la estructura de los geles luego de ser acondicionados en agua queda conformada solo por quitosano debido a la migración del glicerofosfato al medio. Además, no se detectaron interacciones entre el polímero y el fluoruro. Por otro lado, la liberación del fluoruro a partir de estos hidrogeles mostró ser sostenida durante 6 h en el rango de pH estudiado (de 4 a 7) y que la cinética de este fenómeno se encuentra gobernada por procesos difusivos y de relajación de las cadenas poliméricas.

En el capítulo 3 (*Evaluación in vivo de los hidrogeles CS/GP/NaF*) se compararon los efectos de la dosificación en ratas Sprague–Dawley de fluoruro entrampado en un hidrogel o en una solución acuosa. Se estudiaron parámetros como la variación de fluoremia, fosfatemia, insulinemia y las excreciones urinarias y fecales de fluoruro. Cuando el principio activo fue suministrado en un hidrogel se observó la disminución en los picos de fluoremia presentes a las 3 h luego de la dosificación del fluoruro en una solución acuosa. Además, se observó que la incorporación del fluoruro en un hidrogel disminuye los efectos adversos relacionados a este

principio activo como el aumento de la fosfatemia y la glucemia y disminución de la insulínemia.

The image features a complex, repeating geometric pattern of interlocking shapes, possibly resembling a woven or crystalline structure, rendered in black lines on a white background. This pattern covers the entire page. In the center, there is a white rectangular box with a thin black border. Inside this box, the word "Abstract" is written in a bold, black, sans-serif font.

# Abstract

# Abstract

Oral administration of drugs is usually the most convenient and preferred route by patients. In order to produce its therapeutic action, an active pharmaceutical ingredient should reach an adequate concentration at the action site. This is not only governed by the drugs properties (solubility, dissolution kinetics, stability) but also by the absorption, biodistribution and the properties of the matrix in which is included.

Chitosan (CS) is a natural biodegradable and biocompatible polysaccharide. This polymer has particular biological properties such as high mucoadhesion, improvement in wound healing and hemostasis. In addition, it has also been proved to have antibacterial, antifungal and antiviral activity. For this reason, chitosan has been proposed for a wide diversity of biomedical applications including the elaboration of controlled release platforms for cancer treatment drugs, anti-inflammatory and analgesics among others.

Osteoporosis is a disease characterized by bone loss and microstructural deterioration of bone tissue. Sodium fluoride has been used for several decades in osteoporosis treatment. However, it has shown to have some negative effect such as hormonal disorders, skeletal and dental fluorosis when used chronically or in high doses.

Due to its properties, chitosan is a good candidate for the elaboration of sodium fluoride controlled release matrices that can reduce its adverse effects.

In the first chapter of this thesis (*Chitosan microparticles*), fluid bed was used for the elaboration of chitosan based sodium fluoride containing microparticles. Initially, fluid bed process conditions that allowed manipulating this polymer and the sodium fluoride inclusion were determined. Formulation alternatives such as the addition of a weak acid (acetic acid) and polymer pre-treatment were also studied.

With the exception of particles with a size range between 0 and 75  $\mu\text{m}$ , fluid bed technology was adequate for chitosan manipulation and process efficiencies greater than 80 % were reached. All particles showed a rapid release of fluoride (more than 60% in the first 15 minutes). Based on FTIR and SEM studies results it was possible to infer that the burst effect showed in the fluoride release could be related to either low or non-existent chitosan-fluoride interaction and to deposition of sodium fluoride as crystals at the microparticles surface.

In addition, polymeric coatings (polyvinylpyrrolidone and Eudragit® RS 30D) were applied to the particles surface by both fluid bed technology and immersion. When the coating was done by fluid bed, the resulting coated particles also showed a burst release. On the other hand, Eudragit® RS 30D coating applied by immersion slowed the fluoride release and this effect was dependent of the immersion time. SEM assays results showed that immersion coating was thicker than fluid bed coating. Changes in coating layer thickness may explain the moderation in the release rate.

In the second chapter (***CS-GP hydrogels***) hydrogels of chitosan and sodium glycerophosphate were studied as a fluoride controlled release system. First, stability assays of hydrogels with or without fluoride were carried out in a pH range from 2 to 7. These gels showed to be macroscopically stable for at least 24 h at pH between 4 and 7. Later, rheological measurements, SEM, FTIR and DRX techniques were used for hydrogels characterization. It was observed that hydrogel structure after being conditioned for 24 h in water was composed only by chitosan due to the glycerophosphate migration to the media. In addition, interactions between chitosan and fluoride were not detected. Fluoride release from hydrogels showed to be sustained for at least 6 h in the pH range studied (from 4 to 7) and the kinetics mechanism was governed by polymeric chains relaxation and diffusive processes.

In chapter 3 (***In vivo evaluation of CS/GP/NaF hydrogels***) *in vivo* studies were performed to contrast the effect in Sprague-Dawley rats of fluoride administration by a CS-glycerophosphate and a sodium fluoride water solution. Variation of fluoremia, glycemia, insulinemia, phosphatemia and urinary and fecal excretions of fluoride were studied. When fluoride was administered in a hydrogel, fluoremia peaks presented after 3 h of fluoride water solution were diminished. Furthermore, obtained results showed that when fluoride is included in a hydrogel, adverse effects related to high doses of this drug such as the increase of glycemia and phosphatemia and the decrease of insulinemia were diminished.



# Introducción

## ***1. Introducción***

La administración oral de los fármacos es generalmente la vía más conveniente y preferida por las personas, ya que es poco invasiva, segura y menos costosa. Muchos principios activos farmacéuticos (API por las siglas en inglés de “*active pharmaceutical ingredient*”) pueden ser administrados oralmente como líquidos, cápsulas y comprimidos. De todos modos, poseen algunas limitaciones ya que el API debe atravesar entornos con diferentes condiciones fisicoquímicas que pueden modificar la acción fisiológica esperada. Al administrarse por esta vía la absorción puede presentarse tanto en la boca como en cualquier otra región del sistema gastrointestinal. Sin embargo, la mayoría de los API son absorbidos en intestino delgado para luego atravesar la pared intestinal y ser transportados por el torrente sanguíneo hasta el sitio objetivo [1].

Para producir sus acciones terapéuticas características, un API debe alcanzar concentraciones adecuadas en los sitios donde actúa. Las concentraciones logradas, a pesar de estar en función de la dosis del producto administrado, también dependen de la absorción, distribución, biotransformación y excreción del API.

Una vez administrada la forma farmacéutica, el API sufre diferentes procesos hasta llegar a disolverse en el fluido del tracto gastrointestinal (TGI) para posteriormente, ser absorbido y luego atravesar la pared intestinal y ser transportado por el torrente sanguíneo hasta el sitio objetivo.

## ***2. Sistemas de liberación de fármacos***

La investigación en el área de las ciencias farmacéuticas ha puesto cada vez más énfasis en la formulación de nuevas formas farmacéuticas que mejoren las prestaciones de APIs ya existentes. Esto en parte se ve potenciado por la dificultad en el desarrollo y aprobación de nuevos fármacos [2].

Dentro de los objetivos buscados en los desarrollos de nuevas formulaciones farmacéuticas se destacan:



- Proteger los principios activos de las condiciones ambientales (humedad, temperatura, radiación) y los entornos a los que son expuestos (pH, degradación enzimática, interacciones físico-químicas, etc).
- Reducir o eliminar los efectos adversos propios del API.
- Disminuir la cantidad de API administrado mejorando la eficiencia de cada dosis.
- Mejorar la experiencia del paciente mediante la reducción del número de tomas por día o el carácter invasivo de la forma farmacéutica empleada [3].

Un sistema ideal de transporte de fármacos asegura que el API se encuentre disponible en el sitio de acción correspondiente con una concentración por encima de la mínima efectiva y por debajo de la mínima concentración tóxica (ventana terapéutica) durante un período de tiempo deseable [4]. Los sistemas de liberación controlada de fármacos se diseñan para cumplir con una o varias de estas características.

Según los perfiles de liberación logrados, estos sistemas pueden ser clasificados en 4 grupos:

- *Liberación inmediata*: el API es liberado inmediatamente luego de la administración y está diseñado para dar un inicio rápido de la acción del principio activo. En las matrices para liberación oral, este tipo de perfiles se logra con comprimidos desintegrables, efervescentes, masticables y sublinguales (Figura 1.a).

- *Liberación retardada*: la liberación comienza un tiempo después de la dosificación y generalmente se debe a la disgregación de la matriz por las condiciones del entorno al que se expone. Dentro de esta categoría se encuentran los comprimidos con recubrimiento entérico (Figura 1.b).

- *Liberación sensible a estímulos*: la liberación se activa en función de una señal biológica o patológica (por ejemplo, concentración plasmática de glucosa para activar la liberación de insulina) y de estímulos externos (temperatura, pH, radiación) (Figura 1.c).

- *Liberación prolongada*: también conocida como liberación sostenida. La liberación del API es mantenida durante un largo período de tiempo, logrando que la concentración plasmática del fármaco permanezca por un tiempo más prolongado dentro de la ventana terapéutica si es comparado con otros tipos de sistemas. Dentro

de este tipo de perfiles son obtenidos a partir de matrices poliméricas o pellets recubiertos (Figura 1.d).

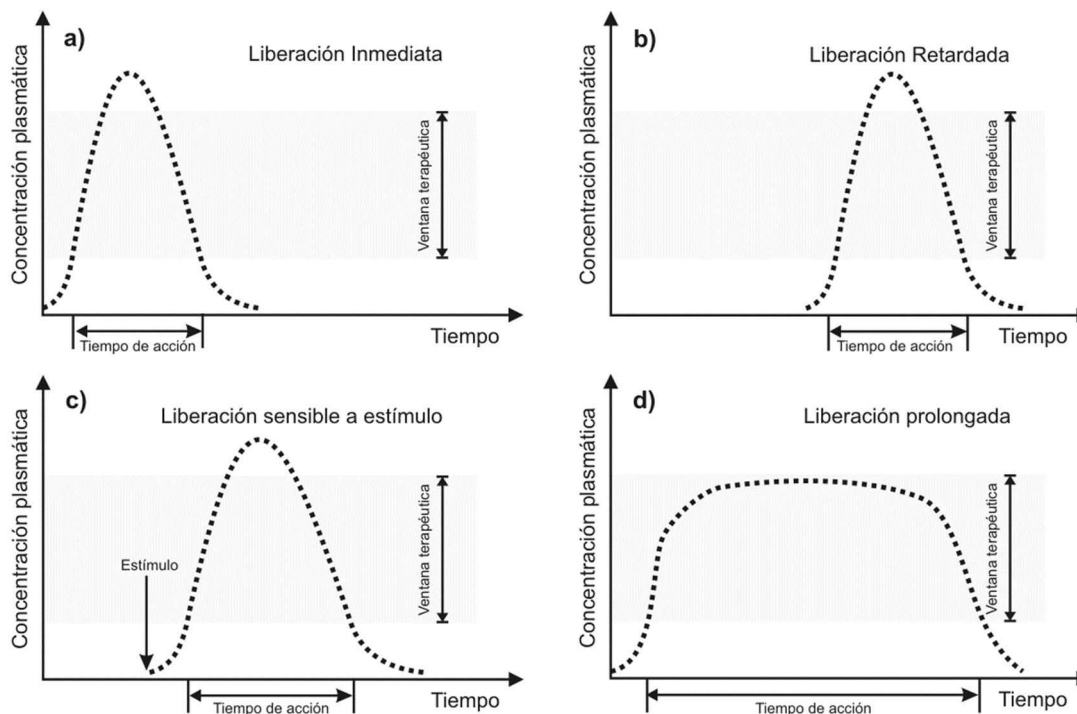


Figura 1. Perfiles de liberación controlada de fármacos (figura modificada de Parky col. 2016) [4].

## 2.1 Mecanismos de control de la liberación de fármacos

El fenómeno de liberación de un API desde una matriz puede ser gobernado por diferentes mecanismos que dependen tanto de las propiedades del API (tamaño, solubilidad), de la matriz (hinchamiento, degradación) como de la interacción entre ambos. A continuación se detallan algunos de los mecanismos más usuales.

- *Degradación-erosión*: el polímero que conforma la matriz se va erosionando en el tiempo permitiendo la liberación del API [5].
- *Difusión*: el API debe difundir a través de una malla polimérica para alcanzar el medio de liberación. El polímero puede encontrarse conformando el seno de la matriz o formando un recubrimiento alrededor de esta.

- *Disolución*: la liberación depende de la cinética de disolución del API, el cual puede encontrarse distribuido de manera homogénea en una matriz polimérica o ubicado en un núcleo recubierto por una membrana polimérica.

- *Control por intercambio iónico*: las resinas de intercambio iónicas son materiales poliméricos insolubles en agua que contienen grupos iónicos. Los principios activos que posean carga pueden asociarse a las resinas por uniones electrostáticas. La liberación se logra por el intercambio del API con iones presentes en los medios de liberación.

## ***2.2 Sistemas multiparticulados de liberación de fármacos***

En los sistemas de liberación multiparticulados, el API se encuentra distribuido en múltiples unidades pequeñas con un tamaño comprendido entre la escala nanométrica hasta algunos milímetros [6–9]. Debido a su rápida dispersión en el TGI, estos sistemas maximizan la absorción y disponibilidad del API, reducen la variabilidad en los perfiles plasmáticos del API intra e inter-paciente si se compara con los comprimidos monolíticos tradicionales [10,11].

Estos sistemas, debido a que cuentan con la totalidad del API distribuido en cientos de partículas son menos susceptibles al vertido total no deseado de su contenido. Este defecto generalmente se debe a fallas en el desempeño de la forma farmacéutica como por ejemplo la ruptura del recubrimiento o la desintegración más rápida que lo deseado.

Los sistemas multiparticulados suelen ser dosificados en suspensiones, en comprimidos de desintegración rápida o en cápsulas que permiten la inclusión de partículas con diferentes propiedades. Por ejemplo, la combinación de partículas de liberación rápida y partículas con liberación sostenida permiten lograr perfiles plasmáticos singulares, alcanzando rápidamente la ventana terapéutica y su sostenimiento por períodos prolongados [4].

## ***3. Quitosano***

El quitosano (CS) es un polisacárido natural, biodegradable y biocompatible conformado por subunidades de N-acetil-d-glucosamina y d-glucosamina [1-3] (Figura 2). Este biopolímero es muy abundante y relativamente económico debido a que se obtiene de la desacetilación alcalina de la quitina, el segundo biopolímero más abundante de la naturaleza que se encuentra

en el exoesqueleto de crustáceos, insectos y en las paredes celulares de algunas algas y hongos. Los principales recursos comerciales son los desechos del caparazón de camarones, langostas, cangrejos y kril [12].

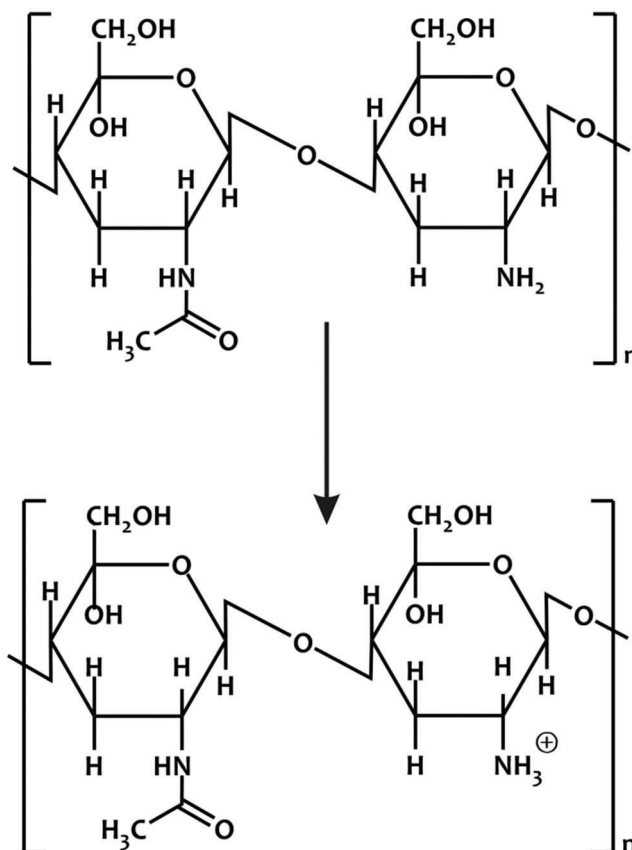


Figura 2. Estructura química del CS y del CS protonado (adaptado de Velázquez y col, 2018) [13].

El proceso de desacetilación de la quitina consiste en la pérdida del acetilo del grupo amida ubicado en el carbono 2 de la quitina dando lugar a un grupo amino. Este proceso no es completo por lo cual al final del proceso quedan subunidades acetiladas remanentes. La relación entre las dos unidades se conoce como grado de desacetilación, parámetro que describe algunas propiedades biológicas y químicas del CS como por ejemplo su solubilidad en medios acuosos [13].

### 3.1 Solubilidad del CS

La quitina, debido a la baja presencia de grupos polares es prácticamente insoluble en medios acuosos. Sin embargo, a pH menores a 6 los grupos amino del CS se protonan aumentando la polaridad de la molécula y las repulsiones electrostáticas polímero-polímero,

generando soluciones estables en medios acuosos ácidos (Figura 2). Por otro lado, cuando el pH de una solución de CS aumenta por encima de 6, los grupos amina se desprotonan, el polímero pierde su carga y se vuelve insoluble [14].

Las cadenas de CS en solución pueden coagularse si se agrega al medio un contraión o una molécula portadora de múltiples cargas negativas (polianión). Por ejemplo, el alginato de sodio, proteínas y la mayoría de los aniones bivalentes como sulfatos o fosfatos forman complejos iónicos insolubles de CS. Estas propiedades son utilizadas para generar películas o micropartículas a partir de soluciones de CS [15].

### ***3.2 Biodegradación del CS***

El CS ha demostrado ser biocompatible, biodegradable y atóxico. La biodegradación posee un rol importante en el destino del CS en el cuerpo. Cuando este polímero presenta un peso molecular entre 30.000 y 40.000 gr/mol y es administrado de manera sistémica, es filtrado por vía renal. Pero si el tamaño molecular es mayor, es degradado química o enzimáticamente para reducirlo a tamaños aptos para la filtración renal. La degradación enzimática es llevada a cabo por enzimas capaces de hidrolizar los enlaces glucosamina - glucosamina, glucosamina - N-acetil-glucosamina y N-acetil-glucosamina - N-acetil-glucosamina [16].

### ***3.3 Propiedades biológicas del CS***

La característica de polianión le brinda al CS la capacidad de unirse a membranas celulares, confiriéndole algunas propiedades biológicas singulares como alta mucoadhesión, mejora en la cicatrización de heridas y hemostasia además de tener actividad como antibacteriano, antifúngico y antiviral [14,16–18]. Es por esto que ha sido propuesto para una gran variedad de aplicaciones biomédicas.

### ***3.4 Aplicaciones biomédicas del CS***

Debido a las características previamente descritas, el CS ha sido estudiado para plataformas biomédicas como:

- *Ingeniería de tejidos*: este área comprende la formación *in vitro* de tejidos utilizando una matriz polimérica. Debido a que el CS es biodegradable, bioadhesivo, no tóxico y puede ser formulado en diversas formas como polvos, geles, películas y esponjas tiene un amplio potencial de aplicaciones en este área. Por consiguiente, se

han propuesto matrices de CS para conformar tejidos análogos a cartílagos y nervios y para la regeneración de huesos [19–22].

- *Cicatrización de heridas*: se ha observado que el CS mejora la vascularización y provee chito-oligómeros (productos de la degradación biológica del CS) con funciones antibióticas, antifúngicas, reguladoras de la inmunidad y mejora la incorporación de fibrillas de colágeno en la matriz extracelular [23]. A su vez, también se han desarrollado apósitos basados en este biopolímero que además contienen factores que mejoran el proceso de cicatrización como por ejemplo el factor de crecimiento de fibroblastos [24].

- *Terapia génica*: matrices basadas en este biopolímero han sido estudiadas para mejorar la eficiencia de transfección de ácido nucleico y virus utilizados en este tipo de terapias [25].

- *Productos médicos hemostáticos*: tanto polvos como apósitos basados en CS que se encuentran actualmente en el mercado (Hemcon®, Celox®) han demostrado detener el sangrado de heridas punzantes y cortantes en situaciones de emergencia en menos de 1 minuto. Estos productos son ampliamente usados tanto en escenarios bélicos como en servicios de emergencias urbanos [26,27].

- *Sistemas de liberación controlada de fármacos*: existe una amplia variedad de estudios que proponen a matrices como hidrogeles, micro o nanopartículas basadas en CS para la liberación controlada de fármacos por vía enteral y parenteral (intramuscular, intradérmica, nasal y tópicos). Se reportaron diversos perfiles de liberación, desde unas pocas horas hasta semanas, dependiendo de la formulación estudiada. En este sentido existen trabajos donde se estudia la aplicación del CS con API para diferentes fines como tratamiento de cáncer, antiinflamatorios, analgésicos, antibióticos, factores de crecimiento, vacunas, entre otros [12,28–34].

Nuestro grupo de trabajo tiene experiencia en el diseño de sistemas de liberación basados en CS. En los últimos años se han realizado desarrollos tecnológicos, publicaciones de patentes y trabajos en congresos y revistas internacionales sobre parches transdérmicos [35], membranas [35,36], partículas [26,37,38] y geles para la administración de diversos fármacos [39–42].

## ***4. Lecho fluido***

En este trabajo se hará uso de la tecnología de lecho fluido. Esta operación tuvo su primera aplicación comercial en el año 1926, pero su uso se masificó en el año 1942 cuando se comenzó a utilizar en el proceso de craqueo catalítico [43]. Debido a su principio de funcionamiento, en los equipos de lecho fluidizado se logran mezclados homogéneos y altas transferencias de materia y temperatura, por lo cual son muy utilizados para funciones diversas como secado de sólidos, adsorción de compuestos, procesos bioquímicos, combustión o granulación y recubrimiento de partículas [44].

### ***4.1 Descripción del fenómeno***

Un lecho fluido consta de una masa de partículas sólidas con una corriente de un fluido pasando de manera ascendente a una velocidad suficiente como para mantener las partículas en suspensión. El equipo utilizado en el desarrollo de esta tesis utiliza aire como fluido. En la Figura 3 se muestra un esquema típico de un lecho fluidizado.

Este proceso posee un amplio número de variables que precisan ser mantenidas dentro de un rango acotado para evitar que se den ciertos fenómenos indeseados como colapso del lecho, transporte neumático de las partículas (si el caudal del aire de fluidificación,  $Q_{\text{aire}}$ , es muy alto las partículas son transportadas fuera del lecho o retenidas en los filtros). El colapso del lecho fluidizado suele presentarse cuando la humedad en el interior del equipo es muy elevada o se ha agregado una gran cantidad de fluido de recubrimiento o granulación. Esto genera un aumento descontrolado del crecimiento del tamaño de las partículas. Además, también es necesario definir otros parámetros como la temperatura del aire de ingreso, presión y caudal de líquido en el aspersor.

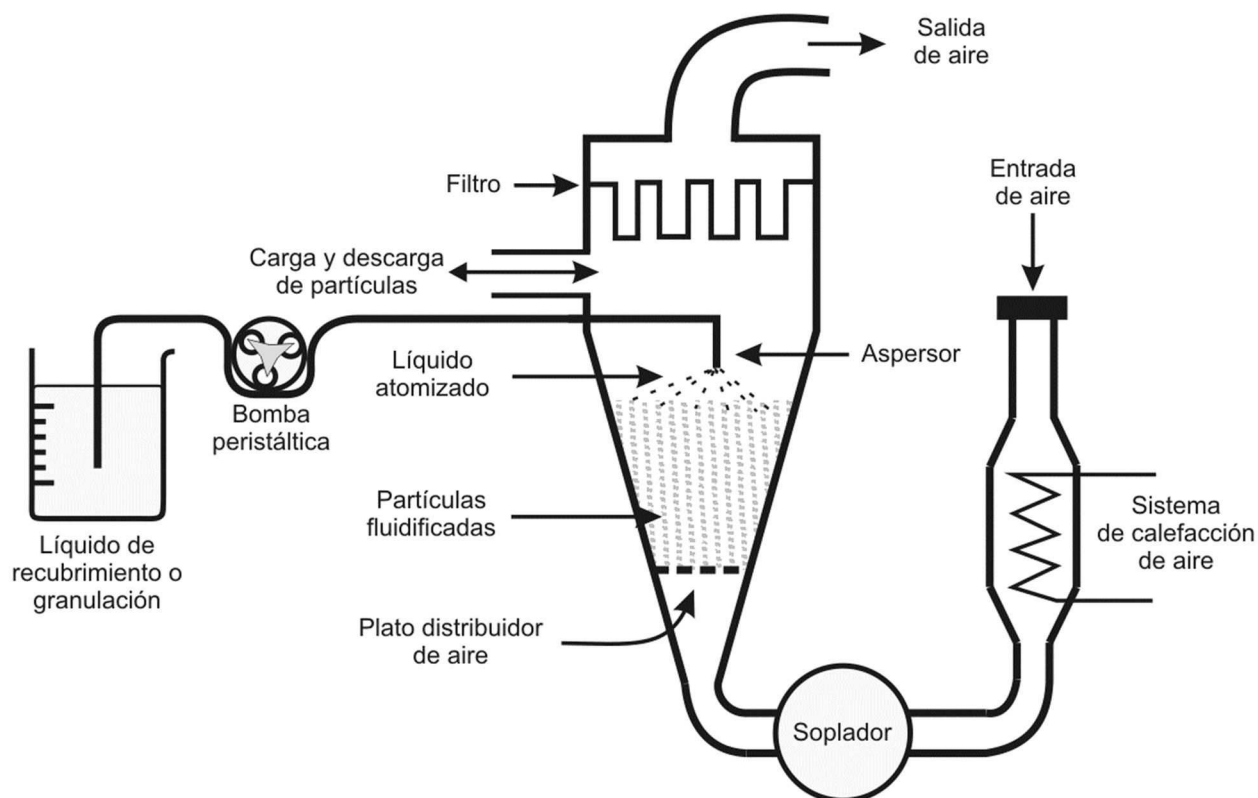


Figura 3. Configuración de un equipo de lecho fluido (modificado de Teunou y col, 2002) [45].

## 4.2 Propiedades de un lecho fluidizado

Las partículas, al entrar en el estado de lecho fluidizado poseen algunas características que hacen que se comporten como un líquido en ebullición [45,46], por ejemplo:

- *La superficie del lecho fluidizado permanece horizontal si el equipo es inclinado (Figura 4.a).*
- *Un objeto colocado en el seno del lecho fluidizado flota según su densidad (Figura 4.b).*
- *Las partículas fluyen por cualquier orificio que se encuentre en las paredes laterales del equipo (Figura 4.c).*
- *Cuando un cilindro es inmerso en un lecho fluido fluidizado, las partículas circulan por el interior del mismo (Figura 4.d).*



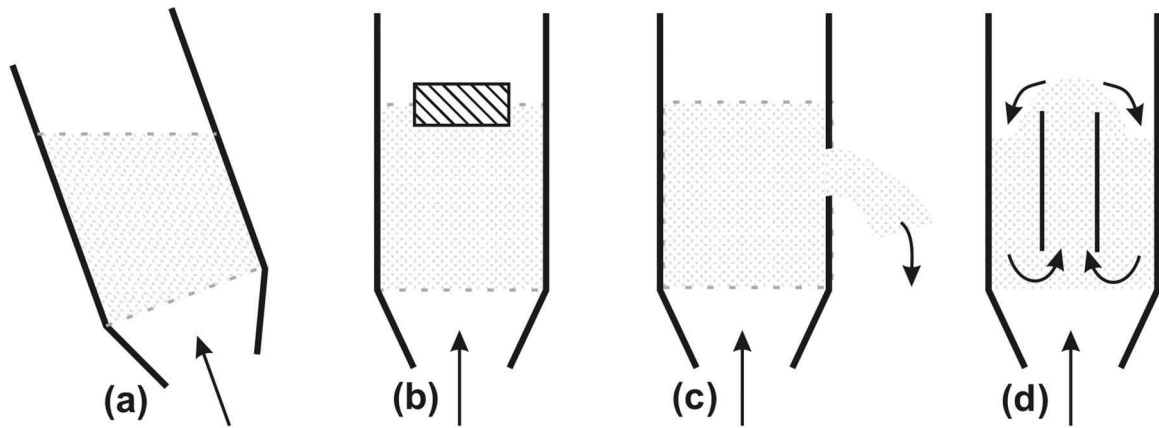


Figura 4. Propiedades de un lecho fluidizado (modificado de Teunou y col, 2002) [45].

### 4.3 Cálculo de la velocidad del aire

Cuando un gas atraviesa a baja velocidad una masa de partículas sólidas, en principio percola por los espacios vacíos del lecho. Este estado es llamado “lecho fijo”. Con el incremento de la velocidad, las partículas comienzan a vibrar. En estas condiciones, y debido a la resistencia que presentan las partículas al paso de aire, se observa una gran diferencia de presión entre la base y la parte superior del lecho. A cierta velocidad, el empuje del aire contrapone el peso del lecho. En esta condición se genera el estado de fluidificación mínima o incipiente y la velocidad de aire que ingresa al lecho se conoce como la velocidad de fluidificación mínima ( $U_{mf}$ ) [47]. Este parámetro puede aproximarse según la ecuación de Ergun, para partículas mayores a 100  $\mu\text{m}$ , propuesta por Teunou y Poncelet (ecuación (1)) [45].

$$U_{mf} = \frac{\eta_{gas}}{\rho_{gas} \cdot d_p} [(1135,7 + 0,04084 \cdot Ar)^{1/2} - 33,7] \quad \text{ecuación (1)}$$

Dónde:  $\eta_{gas}$  y  $\rho_{gas}$  son la viscosidad y la densidad del gas utilizado respectivamente (aire en este caso) y  $d_p$  es el diámetro de las partículas. El parámetro  $Ar$  es el número de Arquímedes definido por la ecuación (2).

$$Ar = \frac{d_p^3 \cdot \rho_{gas} (\rho_p - \rho_{gas}) \cdot g}{\eta_{gas}^2} \quad \text{ecuación (2)}$$

Siendo  $\rho_p$  la densidad de las partículas y  $g$  es la fuerza de gravedad.

Alternativamente,  $U_{mf}$  puede ser estimada empíricamente empleando mediciones proporcionadas por el instrumental del equipo utilizado. Para esto es necesario registrar la presión de aire en la base ( $P_{bed}$ ), la presión aire en la parte superior del lecho ( $P_{bag}$ ) y la velocidad del aire en el lecho ( $U$ ) que se obtiene a partir del  $Q_{air}$ . La  $U_{mf}$  queda determinada por el punto de inflexión de la curva que se obtiene de graficar la caída de presión ( $P_{bed}-P_{bag}$ ) en función de  $U$  según se observa en la Figura 5.

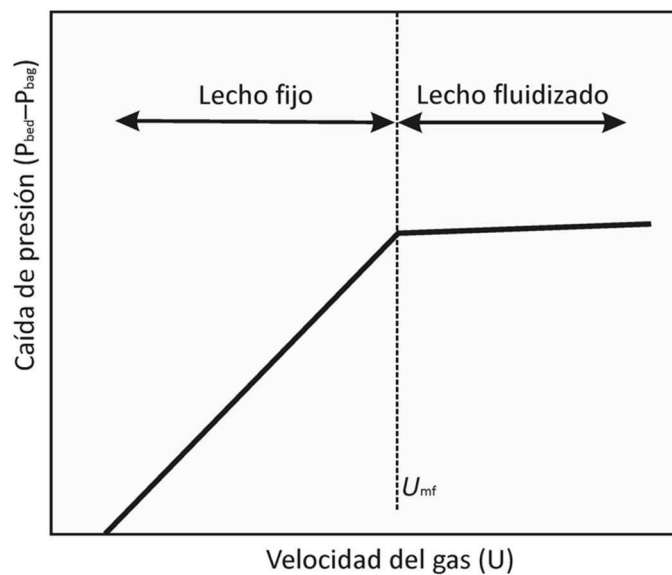


Figura 5. Curva típica de fluidificación de un material particulado.

Existe también una velocidad de aire máxima o terminal ( $U_t$ ) por encima de la cual las partículas son expulsadas del lecho debido al fenómeno de transporte o arrastre neumático. Kunii y Levenspiel propusieron las siguientes ecuaciones para calcular  $U_t$  para partículas no esféricas [44]:

$$U_t = U_t^* \left[ \frac{\eta_{gas} (\rho_p - \rho_{gas}) \cdot g}{\rho_{gas}} \right]^{1/3} \quad \text{ecuación (3)}$$

Donde  $U_t^*$  es la velocidad terminal adimensional, la cual puede calcularse con:

$$U_t^* = \left[ \frac{18}{(d_p^*)^2} + \frac{2,335 - 1,744 \cdot \phi}{(d_p^*)^{0,5}} \right]^{-1} \quad \text{ecuación (4)}$$

El parámetro  $\phi$  es el factor de forma que varía entre 0,5 y 1, siendo 1 el valor adoptado para partículas esféricas.  $d_p^*$  es el diámetro de partícula adimensional que se calcula como:

$$d_p^* = Ar^{1/3} \quad \text{ecuación (5)}$$

El caudal de aire elegido para la manipulación de las partículas debe escogerse de forma tal que la velocidad del aire sea superior a  $U_{mf}$  e inferior a  $U_t$ .

Las características de las partículas y del flujo que pasa a través del lecho son determinantes para estimar el comportamiento del mismo y poder predecir diferentes regímenes de funcionamiento.

#### **4.4 Regímenes de fluidificación**

Un lecho fluidizado se considera *estable* (Figura 6.a) cuando la concentración de partículas es uniforme en todo el lecho a lo largo del tiempo [48]. Mientras que se denomina *lecho agregativo* cuando la concentración volumétrica de sólidos a lo largo del lecho no es uniforme y fluctúa con el tiempo. Los lechos agregativos pueden diferenciarse en:

- *Lecho en tapón*: se conforma cuando tanto el diámetro de las burbujas como el del equipo utilizado son iguales y se conforman estratos separados de burbujas y partículas (Figura 6.b).
- *Lecho burbujeante*: aparecen grandes burbujas en el seno del lecho que pueden unirse entre sí aumentando su tamaño (Figura 6.c).
- *Lecho con canales*: se observa la formación de canales de aire verticales que van desde la base hasta la superficie (Figura 6.d).

En este tipo de lechos la transferencia de materia y energía no es homogénea a lo largo del seno del lecho y se conforman regiones con distinta distribución de aire y partículas logrando resultados de secado, granulación y recubrimientos heterogéneos.

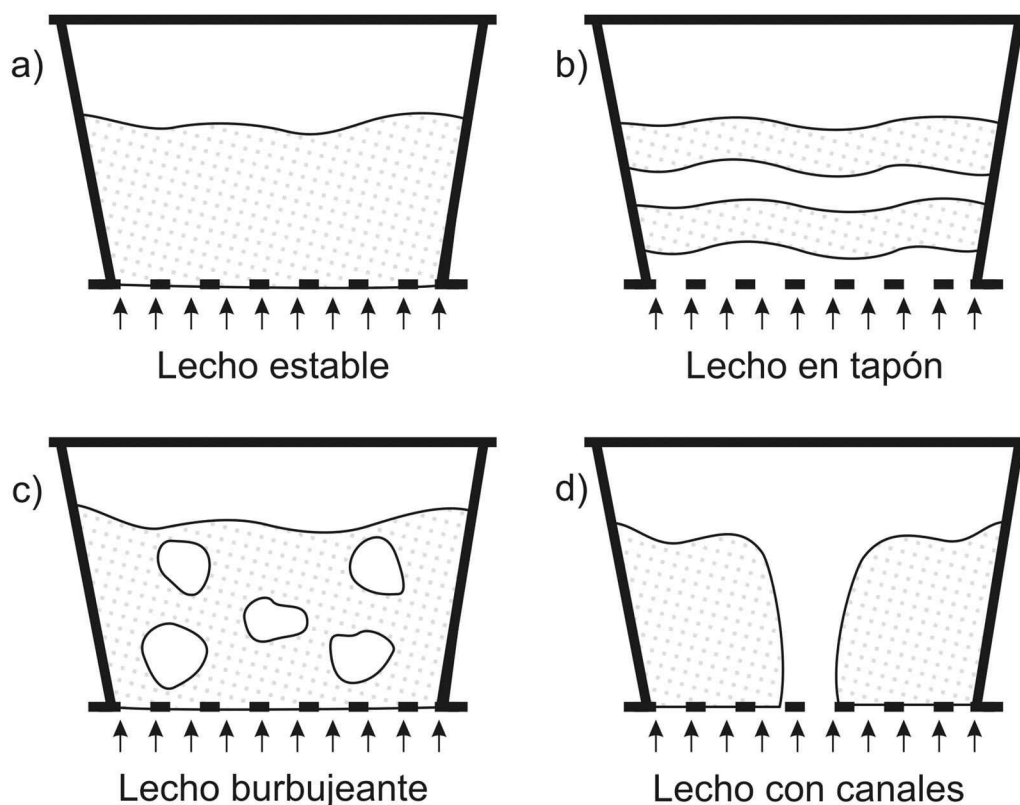


Figura 6. Diferentes regímenes de fluidificación (modificado de Parikh, 2005) [48].

## 4.5 Tipos de lecho fluido

Los equipos de lecho fluido utilizados para granulación o recubrimiento son clasificados de acuerdo con la posición del aspersor (superior, inferior o lateral) y por las condiciones de operación (*batch* o continuo) [49].

En general existen 3 tipos de diseño de equipos de lecho fluidos utilizados en la industria farmacéutica. El modelo *top-spray* es el modelo más sencillo y antiguo, razón por la cual es el más utilizado y por lo tanto es el mejor caracterizado (Figura 7.a). Posee el aspersor ubicado en la parte superior de la cámara y el aire proviene por la parte inferior. Si las condiciones de trabajo no son las adecuadas, este diseño puede presentar inconvenientes relacionados al secado de las soluciones poliméricas en los procesos de recubrimientos de partículas. Se observó que la inclusión del aspersor en la parte inferior del lecho disminuía el secado prematuro de las gotas de recubrimiento aunque aumentaba el riesgo a la formación de aglomerados no deseados [45]. Este inconveniente fue en parte solucionado por el diseño realizado por Wurster. En el modelo Wurster se incorporó un inserto cilíndrico en el seno del lecho y la disposición de los agujeros

del plato distribuidor de aire permite un mayor caudal en la zona central [50] (Figura 7.b). Esta disposición logra que las partículas ingresen al inserto, se encuentren con las gotas del aspersor y asciendan por su interior por transporte neumático mientras se secan. Luego, al llegar a la parte superior del tubo su velocidad disminuye y descienden para volver luego a entrar en el ciclo [46,51,52]. Este equipo es utilizado mayormente para la realización de recubrimientos [53,54].

Existe también un diseño de lecho fluido que cuenta con un plato giratorio en la base (*rotor system*) y el aspersor se encuentra en una posición tangencial a la base (Figura 7.c). El aire para fluidificar las partículas pasa por el espacio comprendido entre el disco giratorio y las paredes del equipo. La combinación de la rotación y el aire ascendente provee a las partículas granuladas propiedades específicas como alta densidad y esfericidad, por lo cual es generalmente utilizado para la conformación de pellets [55].

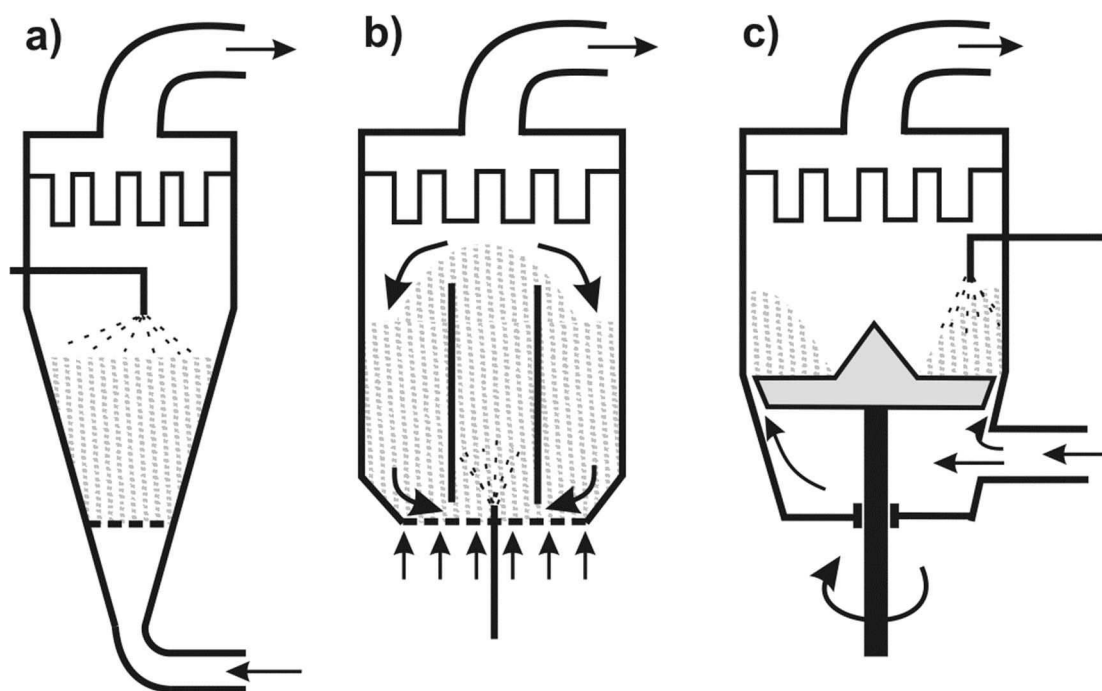


Figura 7. Diferentes configuraciones de lecho fluido. Top-spray (a), Wurster (b) y *rotor system* (c) (modificado de Srivastava y col., 2010) [51].

## 4.6 Recubrimientos de partículas con lecho fluido

Las formas farmacéuticas y en especial las micropartículas, pueden ser recubiertas con el fin de incluir un API, formar un *film* para proteger un principio activo, enmascarar el sabor o modificar el perfil de liberación [31,54–58]. Los recubrimientos de partículas en un equipo de lecho fluido se realizan mediante la aspersión de una solución polimérica sobre una masa de partículas en movimiento. Las gotas al impactar sobre la superficie de cada partícula se secan generando una capa en la superficie (Figura 8). Luego, en el equipo y durante su almacenamiento se termina de consolidar la capa de recubrimiento. Asimismo, puede implementarse una etapa posterior de curado en la cual se somete a las partículas recubiertas a condiciones de elevada temperatura y humedad controlada [46]. Si la temperatura seleccionada está por encima de la temperatura de transición vítrea del polímero utilizado, se logra la coalescencia de las gotas secas alrededor de las partículas obteniéndose recubrimientos más homogéneos [53].

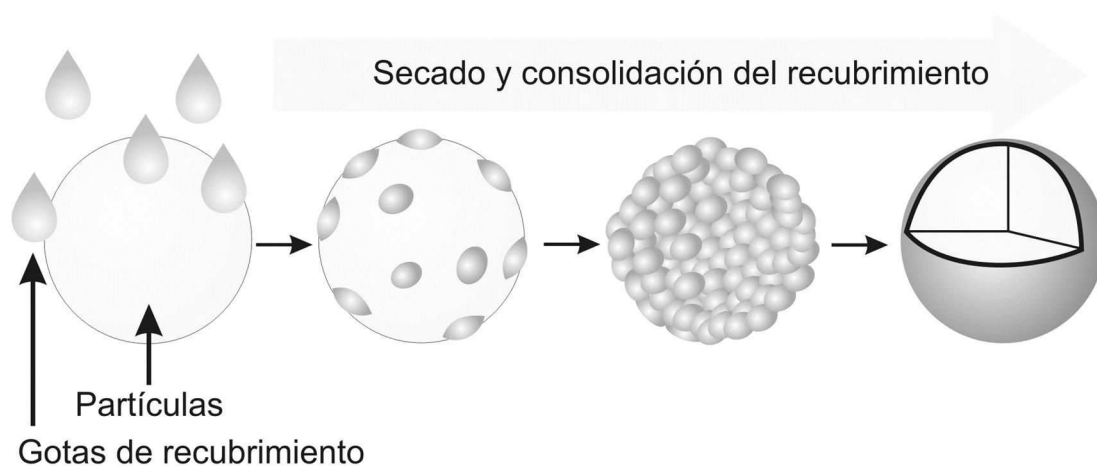


Figura 8. Etapas de la formación del recubrimiento (modificado de Srivastava y col., 2010) [51].

Para llevar a cabo este proceso es necesario realizar un ajuste de diversos parámetros involucrados. Por ejemplo, el fluido utilizado como recubrimiento forma una gota a la salida del aspersor, si el secado de ésta es demasiado rápido, el polímero no se adherirá a la superficie de las partículas. Por otro lado, si el secado es demasiado lento se verá favorecido el proceso de granulación, es decir las partículas se agregan debido a que el polímero forma una unión entre éstas. Las variables críticas en este proceso son [46,51]:

- *Composición de la solución de recubrimiento*: la incorporación de aditivos como surfactantes, emulsificantes o antiadherentes, colaboran en reducir la probabilidad de generación de aglomerados.

- *Temperatura del aire de fluidificación*: al utilizarse temperaturas demasiado bajas, el tiempo de secado de las gotas es muy prolongado por lo cual aumenta la tendencia a la aglomeración. Por otro lado, si la temperatura es demasiado elevada, las gotas de recubrimiento pueden secarse antes de impactar con las partículas.

- *Presión del aire de aspersión*: este parámetro, junto con la viscosidad de la solución de recubrimiento, definen el tamaño de la gota formada en el aspersor. Cuanto menor es el tamaño de la gota, mayor es la superficie expuesta y como consecuencia, menor es el tiempo de secado.

## ***5. Hidrogel quitosano – glicerofosfato***

Los hidrogeles son redes poliméricas tridimensionales (química o físicamente entrecruzadas), con un gran número de grupos hidrofílicos capaces de absorber una gran cantidad de agua. Debido a su estructura, composición, porosidad y comportamiento viscoelástico, estas plataformas han sido consideradas como candidatas para aplicaciones biomédicas tales como sistemas de liberación controlada de fármacos e ingeniería de tejidos [59,60].

Los hidrogeles pueden estar conformados por polímeros sintéticos o naturales. Dentro de los polímeros naturales se destacan los que pertenecen a la familia de las proteínas (colágeno, gelatina y fibrina), los polisacáridos (ácido hialurónico, agarosa y CS) y sistemas híbridos proteína/polisacáridos (colágeno-ácido hialurónico, laminina-celulosa y gelatina-CS y fibrina-alginato) [61,62].

Hidrogeles de CS han sido preparados con una gran variedad de formulaciones que pueden ser separados en dos grandes familias, hidrogeles químicos, conformados mediante entrecruzamiento covalente irreversible; y los hidrogeles físicos, conformados por interacciones físicas reversibles. Los geles químicos poseen buenas propiedades mecánicas, sin embargo, los agentes de entrecruzamiento comúnmente utilizados (por ejemplo el glutaraldehído) están

generalmente relacionados con una alta toxicidad [63]. Por esta razón, los geles de CS físicamente entrecruzados han sido objeto de estudio en los últimos años.

La biodegradabilidad de los geles de CS por la flora bacteriana humana ha sido estudiada por McConnell y col. [64]. Estos autores concluyeron que los geles sin entrecruzamiento químico (como es el caso de los hidrogeles CS/glicerofosfato) son degradados en menos de 4 h, mientras que los entrecruzados con glutaraldehído no son totalmente degradados luego de 18 h de exposición al fluido intestinal.

Las soluciones de CS y glicerofosfato de sodio (GP) presentan una baja viscosidad a temperatura ambiente, pero en condiciones fisiológicas (37 °C) realizan una transición solución-gel sin la necesidad de una estimulación externa [65]. El tiempo de transición depende de la temperatura, la concentración de GP, el pH de la solución final de la concentración y el grado de desacetilación del CS [13]. En la Figura 9 se muestran imágenes de mezclas CS/GP antes y después gelificar.

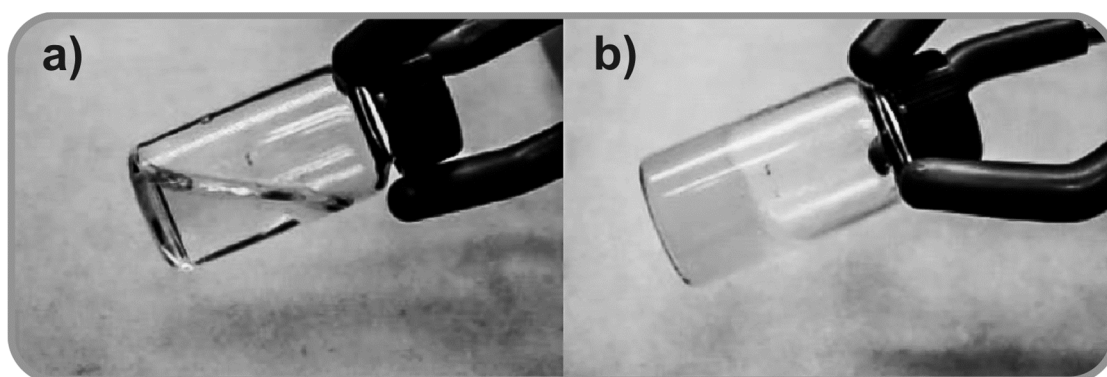


Figura 9. Mezcla de CS y GP antes (a) y después (b) de gelificar a 37 °C (modificado de Mengatto y col, 2016) [39].

Los fenómenos que suceden en la transición solución-gel, son varios y están actualmente en discusión. Algunos autores han reportado que con el aumento de la temperatura, en las mezclas CS/GP se neutraliza el CS debido a una transferencia de protones del CS al GP, por lo cual se conformaría el gel debido a las interacciones hidrofóbicas del biopolímero [66]. También se propuso que el proceso de hidratación/deshidratación de las cadenas de CS está involucrado en la formación del gel. A temperaturas inferiores a la de gelificación la fuerte ligación del polímero con el agua evita la interacción entre las cadenas de CS; a temperaturas más elevadas, las cadenas del polímero pierden agua de hidratación y prevalece la unión entre estas, dando lugar a la conformación de la red tridimensional [67].



## ***5.1 Aplicaciones de hidrogeles CS/GP en liberación controlada***

Los hidrogeles CS/GP han sido estudiados como sistemas de liberación controlada de fármacos en un amplio rango de principios activos como antineoplásicos (paclitaxel), antidepresivos (venlafaxina), antiepilépticos (etosuximida), hormonas (insulina, progesterona) y son mayoritariamente utilizados en aplicaciones parentales [13,67–69]. Por otro lado también existen en la bibliografía trabajos que proponen su aplicación en el área de la ingeniería de tejidos para el reemplazo de cartílagos y discos intravertebrales. Éstas matrices permiten la neovascularización y la diferenciación de células madres mesenquimales hacia el linaje osteogénico, características que potencian su aplicación en este área [67].

Los hidrogeles CS/GP actúan como reservorios con diferentes perfiles de liberación. Los parámetros que más influencia tienen en la cinética de liberación son las características del fármaco (peso molecular y polaridad) y el ambiente de liberación. Mientras que APIs con un radio hidrodinámico pequeño son generalmente liberados en su totalidad en menos de 24 h, pueden esperarse tiempos de liberación más prolongados (desde días hasta años) para fármacos con radio hidrodinámicos grandes [67]. La cinética de liberación de un API desde una forma farmacéutica es generalmente gobernada por una etapa limitante. En el caso de los hidrogeles de CS/GP esta etapa es la difusión a través de la matriz, fenómeno que se encuentra supeditado al tamaño de la malla del hidrogel. Mientras que los APIs con un radio menor que el tamaño de la malla tendrán una difusión rápida, al aumentar el tamaño del API la difusión es más lenta [70].

Teniendo en cuenta las propiedades descritas del CS, los hidrogeles de CS/GP son un buen candidato para conformar sistemas de liberación controlada de aplicación enteral.

## ***6. Fluoruro de Sodio como droga modelo***

La osteoporosis es una enfermedad que se caracteriza por la pérdida de masa ósea y un deterioro en la microestructura de los huesos. Es principalmente causada por el desbalance entre la resorción y la formación de tejido óseo trayendo como consecuencia un aumento en la fragilidad de los huesos y en la susceptibilidad a rupturas óseas. Esta enfermedad tiene una alta incidencia sobre todo en mujeres adultas (osteoporosis postmenopáusicas). Los fármacos

utilizados para tratar esta enfermedad se pueden dividir en dos grupos, aquellos que disminuyen la resorción del tejido óseo y los que aumentan la tasa de formación de tejido [71].

El fluoruro de sodio es utilizado desde hace décadas en los tratamientos de osteoporosis y caries debido a que estimula la formación de tejido óseo, reemplazando el oxhidrilo de la hidróxiapatita por el ión fluoruro, formando flúorapatita, la cual es más estable y posee mayor cristalinidad [72,73]. Un estudio realizado en 202 mujeres con osteoporosis que fueron tratadas con esta droga durante 4 años evidenció un aumento de alrededor del 8% anual en la densidad mineral de los huesos de la espina lumbar [74]. Sin embargo, existen trabajos que discuten el potencial efecto negativo del fluoruro como desórdenes hormonales y fluorosis esquelética y dental cuando es aplicado en altas dosis o de manera crónica (como es el caso de las aguas de bebidas fluoradas) [75-78].

La única forma de administración de fluoruro para que tenga un efecto sistémico es por vía oral. En el tubo digestivo la droga puede ser absorbida tanto a nivel gástrico como intestinal. Este proceso está influenciado por la acidez del medio ya que el fluoruro es una base conjugada fuerte que puede generar HF. Éste es menos polar que la forma iónica y puede atravesar los tejidos con menores impedimentos, por lo cual la velocidad de absorción de la droga varía según el compartimiento del tubo digestivo que se encuentre.

El Dr. Alfredo Rigalli y su grupo de investigación (Laboratorio de Biología Ósea y Metabolismo Mineral – Facultad de Ciencias Médicas – Universidad Nacional de Rosario) han estudiado y desarrollado modelos matemáticos que explican la farmacocinética del fluoruro de sodio administrado por vía oral en ratas [79]. La distribución corporal del fluoruro se representa en el siguiente esquema:

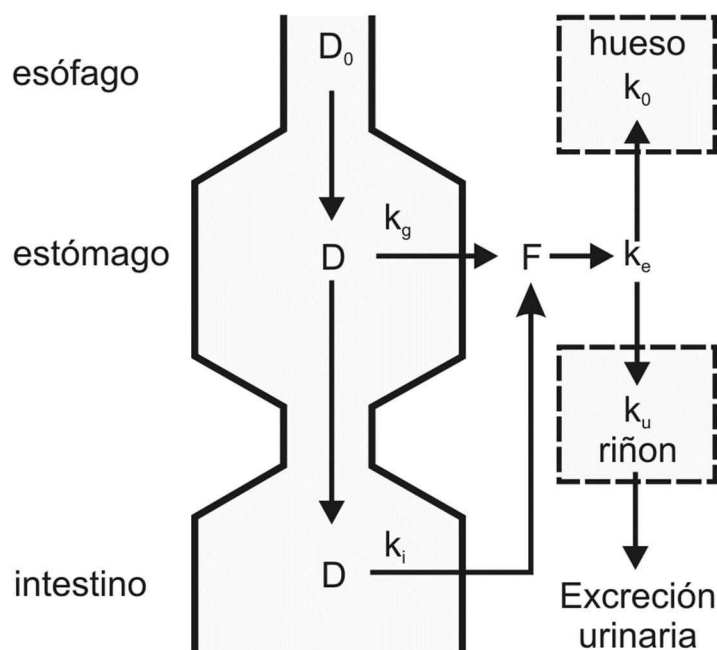


Figura 10. Esquema de la distribución del fluoruro en ratas luego de ser administrado por vía oral (modificado de Rigalli y col., 2003) [79].

Dónde:

- $D_0$  es la dosis inicial de fluoruro.
- $D$  es la concentración de fluoruro en estómago e intestino (decrece a medida que progresa el proceso de absorción).
- $F$  es la concentración plasmática de fluoruro.
- $k_g$  y  $k_i$  son las constantes de velocidad de absorción gástrica e intestinal, respectivamente.
- $k_e$  es la constante de depuración plasmática la cual está compuesta por  $k_o$  (constante de velocidad de absorción ósea) y  $k_u$  (constante de velocidad debida a la eliminación por vía urinaria).

En esta investigación se estudió cada uno de los procesos de absorción y excreción del fluoruro mediante el análisis de la evolución de la concentración de la droga en los distintos compartimentos (estómago, intestino, compartimento plasmático, etc.) determinando los órdenes de los procesos y obteniendo un modelo matemático que explique cada uno de estos.

Por ejemplo, para el análisis de la absorción gástrica de fluoruro en ratas se realizó un experimento de “estómago aislado *in situ*”, bloqueando el pasaje del contenido del estómago al duodeno del animal mediante una ligadura en el píloro. Además se administró una única dosis

de la droga ( $F_0$ ) mediante una sonda gástrica. Luego con un catéter se tomaron muestras del contenido de este compartimiento a distintos tiempos y se midió la concentración de fluoruro. Luego, analizando los datos se concluyó que la absorción de fluoruro en el estómago es un proceso de primer orden y se determinó la constante  $k_g$ . El modelo obtenido es el siguiente:

$$[F^-] = [F_0]e^{-k_g t} \quad \text{ecuación (6)}$$

De modo similar se obtuvieron los órdenes de reacción y los modelos que explican la farmacocinética del fluoruro en otros compartimentos [79].

Teniendo en cuenta los efectos benéficos del fluoruro como principio activo farmacéutico es importante diseñar sistemas de liberación controlada de este API que permitan reducir los efectos adversos reportados.

## 7. Modelos cinéticos de liberación de API

Diferentes mecanismos de liberación de API han sido propuestos para diferentes matrices de liberación prolongada. Estos pueden ser representados por ecuaciones o modelos matemáticos que describen la cinética de liberación. Por esta razón, el ajuste de estos modelos a los perfiles de liberación obtenidos empíricamente por una forma farmacéutica es comúnmente empleado para dilucidar el mecanismo que gobierna el fenómeno de liberación [80]. En esta tesis se utilizaron los siguientes modelos:

### **Modelo de orden cero:**

La disolución del API que ocurre a una tasa constante y suele presentarse en matrices que no se disgregan, puede ser representada por la siguiente ecuación [81]:

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = k_0 \cdot t \quad \text{ecuación (7)}$$

Donde  $Q_t$  es la cantidad de droga liberada a tiempo  $t$ ,  $Q_\infty$  es la cantidad de droga liberada al finalizar el ensayo y  $k_0$  es la constante cinética del modelo.

**Modelo de primer orden:**

En las formas farmacéuticas que ajustan a este modelo, la tasa de liberación del API en un momento determinado es comparable con la cantidad del API remanente en el seno de la matriz. En ese sentido, la velocidad de liberación disminuye a medida que transcurre el tiempo. En este modelo, el logaritmo natural de la fracción de la masa total liberada  $\left(\frac{Q_t}{Q_\infty}\right)$  es proporcional al tiempo (t) con una constante de proporcionalidad  $k_1$  [82], como se observa en la siguiente ecuación.

$$\ln\left(\frac{Q_t}{Q_\infty}\right) = -k_1 \cdot t$$

ecuación (8)

**Modelo de Korsmeyer-Peppas:**

Korsmeyer y col. (1983) desarrollaron un modelo simple, semiempírico relacionando exponencialmente la liberación del API con el tiempo transcurrido [83].

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = k_p \cdot t^n$$

ecuación (9)

Los valores  $Q_t$ ,  $t$  y  $Q_\infty$  tienen el mismo significado que en el modelo de orden cero,  $n$  y  $k_p$  son el exponente y la constante de liberación del modelo [81].

Según los valores que tome  $n$  se pueden definir distintos mecanismos de transporte. Cuando  $n = 0,5$  (0,45 para matrices de forma cilíndrica y 0,43 para esferas) el fenómeno se asocia a un mecanismo de difusión anómalo (Fickiano). En partículas, cuando  $n = 1$ , se trata de una cinética de orden cero [81].

Valores de  $n$  inferiores a 0,5 se relacionan a la presencia de poros en la matriz polimérica (y a la consiguiente difusión simultánea a través de la matriz hinchada) y de poros llenos de medio de disolución. Cuando  $n$  se encuentra entre 0,5 y 1, el proceso está dominado por la difusión y relajación de las cadenas poliméricas [84]. Usualmente, valores de  $n$  mayores a 1 aparecen cuando los tiempos de liberación son muy elevados. Este tipo fenómeno de transporte se denomina “Transporte Supercaso II”.

La comparación del nivel de ajuste entre los distintos modelos para el mismo *set* de datos fue realizada contemplando los valores  $r^2$  y AIC (*Akaike Information Criteria* o AIC por sus siglas en inglés). El valor AIC de cada modelo se obtiene a partir de la ecuación 10.

$$AIC = n_p \cdot \ln(SSR) + 2p$$

ecuación (10)

Donde  $n_p$  es el número de observaciones,  $p$  es el número de parámetros que utiliza el modelo estudiado y  $SSR$  es la suma de los cuadrados de los residuos obtenidos de la comparación entre los valores experimentales y los obtenidos por el modelo [85]. Un menor valor de AIC indica un mejor ajuste del modelo a los datos experimentales.

## ***8. Análisis estadístico de los datos***

El análisis estadístico de los datos fue realizado utilizando el test estadístico test-t de Student provisto por el software estadístico “R” [86]. En este test, se rechaza la hipótesis nula ( $H_0$ ) cuando  $p$  (probabilidad) es menor al nivel de significancia escogido como criterio. En esta tesis se trabajó con un nivel de confianza del 95 %, por lo cual  $p$  tiene que ser menor a 0,05.  $H_0$  plantea que no hay diferencia significativa entre las poblaciones de datos comparados, por lo tanto si el valor  $p$  es menor a 0,05 se considera que las muestras comparadas son diferentes con un 95 % de confianza.



# Objetivos

## Objetivos

### ***Objetivo general***

El objetivo general de este trabajo de tesis es desarrollar sistemas basados en quitosano para la liberación controlada de fluoruro.

### ***Objetivos específicos***

- Desarrollar micropartículas de quitosano-fluoruro de sodio utilizando la tecnología de lecho fluido.
- Caracterizar las micropartículas de quitosano-fluoruro.
- Desarrollar y caracterizar hidrogeles de quitosano-glicerofosfato para la liberación controlada de fluoruro de sodio.
- Evaluar los efectos *in vivo* del efecto del fluoruro de sodio atrapado en los hidrogeles de quitosano-glicerofosfato.

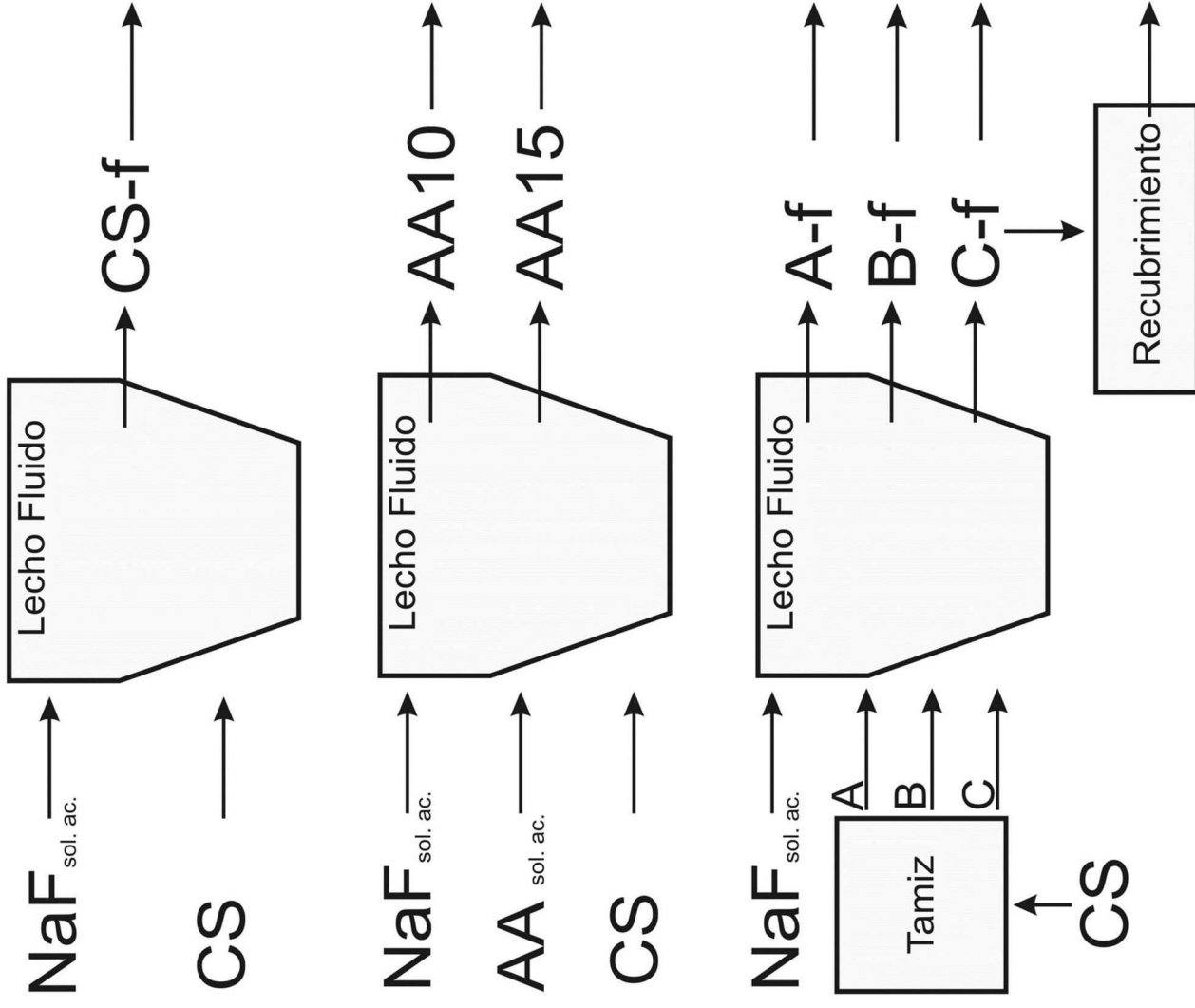


The background of the page is a dense, repeating pattern of microscopic chitin microfibrils, which are thin, rod-like structures with a characteristic zig-zag or helical arrangement. This pattern is rendered in a light gray color against a white background. A decorative border, consisting of a thick, black, stylized line that mimics the microfibril pattern, frames the entire page.

# Capítulo 1

## Micropartículas de quitosano

## Caracterización de las partículas



- Rendimiento del proceso

- Eficiencia de entrapamiento

- Dispersión de tamaños

- FTIR

- SEM

- Ensayo de liberación del API

- Cinética de liberación

# Capítulo 1- Micropartículas de Quitosano

## **1.1 Introducción**

En el desarrollo de este capítulo se describe la metodología utilizada para la inclusión de fluoruro de sodio en partículas de CS mediante la tecnología de lecho fluidizado. Hasta el momento, no se ha reportado en la bibliografía el empleo del CS como matriz sólida para este tipo de tecnología.

Con el objeto de lograr que el material sea fluidificado correctamente, es necesario un ajuste en las condiciones experimentales previo al procesamiento de materiales microparticulados. Por esta razón, en primer lugar se investigaron variables de proceso tales como la temperatura y caudal de alimentación de aire, caudal de alimentación del aspersor y masa de las micropartículas. Estos parámetros deben encontrarse en un rango de valores tales que permitan la manipulación de las partículas en un estado estacionario. Luego se estudiaron diferentes variables de formulación como tamaño de partículas, agregado de ácidos débiles y recubrimientos, con el fin modificar los perfiles de liberación del principio activo en estudio.

Las partículas desarrolladas fueron caracterizadas por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier, microscopía óptica y electrónica de barrido y análisis de imágenes. Además, se caracterizó la granulometría mediante tamizado y análisis de imágenes y los perfiles de liberación del principio activo en un medio acuoso.

## **1.2 Objetivos**

**Los objetivos planteados en este capítulo de la tesis son los siguientes:**

- **Elaborar partículas de quitosano para la liberación de fluoruro de sodio utilizando la tecnología de lecho fluido.**
- **Definir las condiciones de trabajo que permitan procesar el quitosano en el lecho fluido.**
- **Realizar recubrimientos poliméricos sobre las partículas de quitosano-fluoruro de sodio.**
- **Caracterizar las partículas obtenidas.**

## **1.3 Materiales y métodos**

### **1.3.1 Materiales**

El CS utilizado en esta etapa fue adquirido en Easter (China) y el NaF de grado analítico fue adquirido en Ciccarelli. Los polímeros de recubrimiento utilizados fueron polivinilpirrolidona (PVP, peso molecular: 40000 g/mol) y EUDRAGIT® RS30d, producidos por BASF y EVONIK, respectivamente. El bromuro de potasio (KBr) de calidad analítica fue adquirido en Anedra. El agua utilizada en cada etapa fue producida por un sistema de purificación Milli-Q® (Millipore).

La solución reguladora de fosfatos (PBS) se preparó disolviendo 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 0,2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 1,44 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  más agregado de cantidad suficiente de agua para obtener 1 L de solución. Todas las sales fueron de grado analítico (Anedra). Los restantes reactivos empleados en este capítulo fueron de grado analítico.

#### **1.3.1.1 Lecho fluido**

Se utilizó un equipo de lecho fluido modelo DPL-1 manufacturado por la empresa ROTTECH (China), equipado con un soplador de 3 kW y capacidad de producción de entre 0,1 y 3 kg por *batch* (Figura 11).



Figura 11. Fotografía del equipo de lecho fluidizado utilizado en esta tesis (modelo DPL1, Rotech, China).

### ***1.3.2 Condiciones del proceso***

Los parámetros utilizados durante el proceso para elaborar las partículas mediante lecho fluido se detallan en la Tabla 1. La velocidad de fluidificación mínima y la velocidad terminal se calcularon utilizando las ecuaciones (1) y (3) mencionadas anteriormente. Los datos de viscosidad y densidad del aire fueron extraídos de la bibliografía [87], mientras que la dispersión de tamaño y densidad del CS fueron determinados experimentalmente en este trabajo como se detalla más adelante. Debido a que las partículas de CS presentan una geometría irregular, el factor de forma ( $\phi$ ) fue considerado en su valor más bajo (0,5).

**Tabla 1. Parámetros utilizados para el cálculo de las velocidades de fluidificación mínima y terminal.**

Viscosidad del aire (N.s/m <sup>2</sup> )	1,8. 10 <sup>-5</sup>
Densidad del aire (kg/m <sup>3</sup> )	1,184
Tamaño de partículas de CS (μm)	50 - 800
Densidad del CS(kg/m <sup>3</sup> )	1489
Esfericidad de las partículas de CS	0,5

### ***1.3.3 Obtención de partículas mediante lecho fluido***

Con el fin de elaborar las micropartículas de CS para la liberación de fluoruro se siguieron diferentes metodologías. En primer lugar se estudió la inclusión de NaF en partículas de CS sin tratamiento previo (CS-f). Luego, y con el fin de incrementar la interacción electrostática entre el CS y el API, se incorporó un ácido débil (ácido acético) en la formulación de las partículas en una concentración de 10 o 15 % p/p (AA10 y AA15 respectivamente). Además, se estudió el efecto de la segmentación por diámetro del CS antes de la incorporación del API. Por tamizado se obtuvieron tres poblaciones de tamaño, entre 0 y 74 μm, 74 y 177 μm y 177 y 297 μm (partículas A, B y C respectivamente).

Por último, en partículas desarrolladas en etapas anteriores, se aplicaron diferentes niveles de recubrimientos de PVP (CS2PVP, CS4PVP y CS6PVP con 2, 4 y 6 % p/p de PVP respectivamente) y EUDRAGIT® RS (EUD4, EUD8 y EUD12 con 4, 8 y 12 % p/p de EUDRAGIT® RS) utilizando la tecnología de lecho fluidizado. Además se recubrieron partículas por inmersión en una solución de EUDRAGIT® RS durante 1 min (Eud-1min) y 2 min (Eud-2min).

#### ***1.3.3.1 Inclusión de NaF mediante la tecnología de lecho fluidizado***

Las partículas de CS conteniendo NaF (CS-f) se obtuvieron mediante la aspersión de una solución de NaF sobre una masa de partículas fluidificadas. Las condiciones para la inclusión del API se detallan en la Tabla 2.

**Tabla 2. Condiciones experimentales utilizadas para la elaboración de las partículas CS-f.**

<i>Partículas CS-f</i>	
Masa de CS (g)	150
Tiempo de calentamiento (min)	10
Temperatura de aire de entrada (°C)	90
Caudal de alimentación de líquido al aspersor (g/min)	8
Presión de aire en el aspersor (MPa)	0,14
Concentración de NaF en solución aspersada (% p/p)	1
Volumen de solución aspersada (mL)	150
Tiempo de secado (min)	10

### ***1.3.3.2 Elaboración de partículas con diferente concentración de ácido acético***

Se elaboraron partículas de CS con NaF con diferentes concentraciones de ácido acético mediante dos procesos consecutivos. En el primero se incluyó el fluoruro en las partículas de CS como se describió previamente. Luego se dispersaron sobre las muestras soluciones acuosas con dos concentraciones diferentes de ácido acético: 10% (AA10) y 15 % p/p (AA15). Los parámetros de proceso fueron los mismos que los utilizados en la inclusión de NaF (Tabla 1), las condiciones experimentales para esta segunda etapa se detallan en la Tabla 3.

**Tabla 3. Condiciones experimentales utilizadas para elaboración de las partículas AA10 y AA15.**

<i>Parámetro</i>	<i>Partículas AA10</i>	<i>Partículas AA15</i>
Masa de partículas (g)	150	150
Tiempo de calentamiento (min)	10	10
Temperatura de aire de entrada (°C)	90	90
Caudal de alimentación de líquido al aspersor (g/min)	8	8
Presión de aire en el aspersor (MPa)	0,14	0,14
Concentración de ác. acético en solución aspersada (% p/p)	10	15
Masa de solución aspersada (g)	150	150
Tiempo de secado (min)	10	10

### ***1.3.3.3 Obtención de partículas de CS y fluoruro a partir de diferentes granulometrías de CS***

Con el fin de estudiar la influencia del tamaño del CS en la elaboración y en los perfiles de liberación de las partículas obtenidas, se efectuó una separación de tamaño por tamizado del CS

utilizando mallas con una luz de 74, 177 y 297  $\mu\text{m}$  obteniéndose 3 poblaciones diferentes: A (partículas que pasaron la malla de 74  $\mu\text{m}$ ), B (partículas retenidas entre las mallas de 74  $\mu\text{m}$  y 177  $\mu\text{m}$ ) y C (partículas retenidas entre las mallas de 177  $\mu\text{m}$  y 297  $\mu\text{m}$ ). Luego, a cada una de éstas se le aplicó una solución acuosa de fluoruro mediante la tecnología de lecho fluido. Las condiciones de proceso utilizadas se detallan en la Tabla 4.

**Tabla 4. Parámetros de proceso utilizados para elaborar las partículas de CS-NaF separadas en tres poblaciones de tamaño: partículas A (>74  $\mu\text{m}$ ), partículas B (entre 74  $\mu\text{m}$  y 177  $\mu\text{m}$ ) y partículas C (entre 177  $\mu\text{m}$  y 297  $\mu\text{m}$ ).**

Parámetro	Partículas A	Partículas B	Partículas C
Tamaño de partículas ( $\mu\text{m}$ )	0 - 74	74 - 177	177 - 297
Masa de partículas (g)	200	200	200
Tiempo de calentamiento (min)	10	10	10
Temperatura de aire de entrada ( $^{\circ}\text{C}$ )	90	90	90
Caudal de alimentación de líquido al aspersor (g/min)	4	8	8
Presión de aire en el aspersor (MPa)	0,14	0,14	0,14
Concentración de fluoruro de sodio (% p/p)	1	1	1
Volumen de solución aspersada (g)	180	200	200
Tiempo de secado (min)	10	10	10

### ***1.3.3.4 Recubrimientos sobre partículas de C-f***

#### **1.3.3.4.1 Recubrimiento con PVP**

El recubrimiento de PVP se aplicó sobre partículas C-f mediante la aspersion de una solución acuosa de 10 % p/p de PVP k17 utilizando la tecnología de lecho fluido. El procedimiento es similar al utilizado en las etapas anteriores. Una determinada cantidad de partículas C-f fueron fluidificadas y se mantuvieron en este estado durante 10 minutos hasta que el equipo llegue a la temperatura de proceso, luego se activa el aspersor y se dispuso la solución del polímero. Se tomaron muestras de 10 g de partículas luego de haberse agregado 30 y 60 ml de la solución de recubrimiento, obteniéndose niveles de recubrimiento de 2 y 4 % respectivamente. Finalmente se detuvo la alimentación de la solución de recubrimiento cuando la masa teórica de PVP alcanzó un nivel del 6 % (90 ml de la solución). Las condiciones utilizadas para elaborar las partículas recubiertas con PVP se detallan en la Tabla 5.



**Tabla 5. Condiciones de proceso para el recubrimiento con PVP de las partículas de C-f.**

<i>Partículas C-f-PVP</i>	
Masa de C-f (g)	150
Tiempo de calentamiento (min)	10
Temperatura de aire de entrada (°C)	100
Caudal de alimentación de líquido al aspersor (g/min)	4
Presión de aire en el aspersor (MPa)	0,14
Concentración de PVP en solución aspersada (% p/p)	10
Masa de solución aspersada (g)	90
Tiempo de secado (min)	10

### **1.3.3.4.2 Recubrimiento con EUDRAGIT® RS30D**

Se estudió el proceso de aplicación de un recubrimiento insoluble en agua como el EUDRAGIT® RS30D sobre partículas C-f. Este recubrimiento se aplicó utilizando dos técnicas diferentes: tecnología de lecho fluidizado y recubrimiento por inmersión.

#### **1.3.3.4.2.1 Recubrimiento por lecho fluido**

Para llevar a cabo el recubrimiento de EUDRAGIT® RS30D a las partículas C-f, se dispersó sobre un lecho de partículas una solución con el polímero de recubrimiento cuya formulación se indica en la Tabla 6. La composición de esta solución se formuló en base al trabajo de Kaur y col. (2009)[31]. Los tres componentes principales fueron:

- Polímero de recubrimiento: solución acuosa de polimetilmetacrilato al 30 % p/p (EUDRAGIT® RS30D).
- Plastificante: se incorpora en la formulación con el fin de aumentar la flexibilidad del recubrimiento y mejorar la coalescencia de las gotas del polímero en la superficie de la partícula [88].
- Anti-adherente: cumple la función de evitar la formación de aglomerados durante el proceso de recubrimiento y durante el almacenamiento de las partículas.

**Tabla 6. Formulación del recubrimiento con EUDRAGIT® RS.**

<i>Componente</i>		<i>% (p/p)</i>
Polímero de recubrimiento	EUDRAGIT® RS30D	33,3
Plastificante	Metilparabeno	2,0
Anti-adherente	Talco	5,0
Solvente	Agua	59,7

Al igual que cuando se realizó el recubrimiento con PVP, se tomaron muestras a diferentes períodos de tiempo con el fin de obtener partículas con tres niveles teóricos de recubrimiento: 4 % (EUD4), 8 % (EUD8) y 12% (EUD12) de masa seca de EUDRAGIT® RS con respecto a la masa inicial de partículas. Los parámetros seleccionados para llevar a cabo el recubrimiento se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7. Parámetros del proceso de aplicación del recubrimiento con EUDRAGIT® RS.**

<i>Parámetro</i>	<i>Partículas EUD12</i>
Masa de CS-f (g)	160
Tiempo de calentamiento (min)	10
Temperatura de aire de entrada (°C)	130
Caudal de alimentación de líquido al aspersor (g/min)	2
Presión de aire en el aspersor (MPa)	0,14
Masa de solución aspersada (g)	193
Tiempo de secado (min)	10

La mayoría de los valores fueron similares a los escogidos en los procesos anteriores, sin embargo la temperatura del aire de entrada al equipo fue superior (130 °C) y el caudal de la solución de recubrimiento en el aspersor fue menor debido a que se priorizó el secado rápido de las partículas para evitar la formación de aglomerados.

Posteriormente y con el fin de lograr un recubrimiento homogéneo se realizó un curado en las partículas recubiertas. Este proceso consistió en someter a las partículas a condiciones determinadas de humedad y temperatura durante un período fijo de tiempo para lograr la coalescencia del polímero que forma el recubrimiento. El curado se realizó a una temperatura de 40 °C con una humedad relativa del 50 % durante 24 h siguiendo lo propuesto por Kaur y col. (2009) [31].

#### 1.3.3.4.2 Recubrimiento por inmersión

Existen varios artículos que proponen como metodología para la realización de recubrimientos la inmersión de partículas en la solución del polímero [89–92]. En este trabajo se utilizó esta técnica como método alternativo para la aplicación de EUDRAGIT® en las partículas C-f. Con el fin de obtener distintas concentraciones de recubrimiento, 1 g de partículas C-f fueron sumergidas durante 1 min (Eud-1min) o 2 min (Eud-2min) en una solución con las mismas características que las utilizadas para realizar los recubrimientos en el lecho fluidizado. Luego se recuperaron por filtrado en una malla de acero inoxidable y finalmente se secaron por liofilización. Se emplearon tiempos de recubrimientos cortos para evitar la difusión del fluoruro a la solución del polímero.

### **1.3.4 Caracterización de las partículas**

#### **1.3.4.1 Cálculo de rendimiento de proceso y eficiencia de entrapamiento del NaF**

El rendimiento de proceso fue calculado dividiendo la masa seca de partículas obtenidas luego de finalizado el proceso sobre la sumatoria de masa de CS utilizado y de los compuestos agregados en base seca (ácido acético, NaF, etc.) multiplicado por 100.

La eficiencia de entrapamiento del principio activo de las distintas partículas se calculó dividiendo el contenido del NaF en las partículas sobre la masa agregada y luego multiplicando el resultado por 100. Para determinar el contenido total de NaF, 200 mg de partículas fueron sumergidas en agua durante 48 horas, tras lo que se calculó la masa del fluoruro mediante potenciometría directa, como se detalla a continuación.

##### 1.3.4.1.1 Determinación de la concentración de fluoruro

La concentración de fluoruro fue medida por potenciometría directa utilizando un electrodo ion-selectivo ORION 94-09 y un electrodo de referencia de Ag/AgCl (plata/cloruro de plata) conectados a un convertidor analógico-digital. Antes de cada determinación se realizó una curva de calibrado de 5 puntos en el rango de 1,0 a 100,0 ppm (1,0; 5,0; 10,0; 50 y 100 ppm).

Las muestras se mezclaron con un solución amortiguadora de 2 M ácido acético y 2 M de acetato de sodio para ajustar el pH a 5,5 y la fuerza iónica [93]. La proporción muestra:solución amortiguadora fue 10:1.

#### **1.3.4.2 Determinación del contenido de materia seca**

La determinación del contenido de materia seca de las partículas se realizó mediante la eliminación del agua contenida por liofilización. Para esto las muestras a analizar fueron congeladas durante 24 h en un freezer a -80 °C y luego secadas durante 24 h utilizando un liofilizador Telstar-Cryodos -80. La fracción de materia seca se determinó por diferencia de masa entre las partículas secas y húmedas (todas las determinaciones se realizaron por triplicado).

#### **1.3.4.3 Dispersión de tamaños**

La caracterización granulométrica se realizó mediante dos metodologías distintas según la distribución de tamaños. En aquellas muestras donde se esperaba una amplia dispersión de tamaños, la determinación se realizó por tamizado, mientras que cuando se esperaban distribuciones de tamaño angostas se optó por evaluar la granulometría por análisis digital de imágenes. En el primer método, las muestras fueron sometidas a movimiento oscilatorio sobre una malla con un tamaño de poro definido, quedando retenidas aquellas partículas cuyo tamaño fue mayor al diámetro del poro. En esta determinación se utilizó un tamizador Fritzch con tamices Zonytest de diversos tamaños de malla, dispuestos en orden decreciente según su tamaño de poro. Las muestras fueron procesadas durante 15 minutos [94]. Luego cada población obtenida fue pesada para determinar la proporción másica respecto del total.

Para la determinación de la granulometría por análisis de imagen, se tomaron fotografías de las partículas utilizando un microscopio óptico LEICA DM2500 con cámara digital acoplada LEICA DFC 290 HD. Las imágenes obtenidas fueron procesadas mediante el *software* ImageJ 1.60. El tamaño de partículas fue calculado como el promedio entre el diámetro menor y mayor de cada partícula [95].

#### **1.3.4.4 Cálculo de la densidad de partículas**

La densidad aparente de las partículas de CS fue determinada por picnometría. Para esto, en un matraz aforado de 10 ml se colocó una alícuota de CS y luego se enrasó con diclorometano. Se registró la masa del CS y el líquido agregado. Conociendo la densidad del solvente se pudo calcular el volumen ocupado por el CS y la densidad de las partículas.

#### **1.3.4.5 Espectroscopía infrarroja**

Se estudiaron los espectros de absorción infrarroja de los componentes utilizados en el desarrollo y de las partículas obtenidas mediante un espectrómetro de marca Shimadzu modelo FTIR-8201PC. Se utilizó el método de discos de KBr para el cual se mezclaron 2 mg del analito (previamente liofilizado durante 24 h) con 100 mg de KBr. Luego una alícuota de la mezcla fue prensada para formar un disco. Los espectros se obtuvieron escaneando el rango de  $4000\text{ cm}^{-1}$  hasta  $400\text{ cm}^{-1}$ .

#### **1.3.4.6 Microscopía electrónica de barrido**

Con el fin de determinar las características morfológicas de superficie de las partículas, éstas fueron analizadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, del inglés *Scanning Electron Microscope*). Se utilizaron dos instrumentos diferentes:

- JEOL, modelo JSM-35C perteneciente al servicio centralizado de grandes instrumentos (SECEGRIN – UAT – CCT Santa Fe – CONICET). Las partículas se colocaron en un portamuestra de metal y se recubrieron con oro por pulverización catódica atmosférica de argón (SPI Supplies, 12157-AX) en dos sesiones de 40 s cada una a 15 mA. Las micrografías fueron obtenidas con un voltaje de aceleración de 20 kV.
- 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. Por otro lado, este equipo permite realizar un análisis elemental puntual por EDS (*Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy*) con un detector por deriva de silicio. Las muestras observadas no necesitaron tratamiento previo.

### ***1.3.5 Ensayos de liberación in vitro***

Para llevar a cabo los ensayos de liberación de NaF, 200 mg de las partículas fueron sumergidas en 25 ml de un medio tampón fosfato salino (PBS) a pH 7,4 termostaticado a 37 °C en un agitador orbital a 100 rpm. Se tomaron muestras de 1 mL a diferentes intervalos de tiempo con reemplazo del mismo volumen de medio fresco. La concentración de fluoruro fue determinada mediante potenciometría directa como se describió previamente (sección 1.3.4.1.1). Se representó la masa de NaF liberada acumulada en función del tiempo (t).

## 1.4 Resultados y conclusiones

### 1.4.1 Determinación de las condiciones del proceso

Teniendo en cuenta los valores de la viscosidad y densidad del aire y propiedades del CS detalladas en la Tabla 1 y las ecuaciones (1) y (3), se calcularon  $U_{mf}$  y  $U_t$  (velocidad de fluidificación mínima y velocidad de aire terminal respectivamente) teóricas para un rango de tamaños de CS de 50 a 800  $\mu\text{m}$ . La Figura 12 muestra las  $U_{mf}$  y  $U_t$  simuladas en función del tamaño de la partícula.

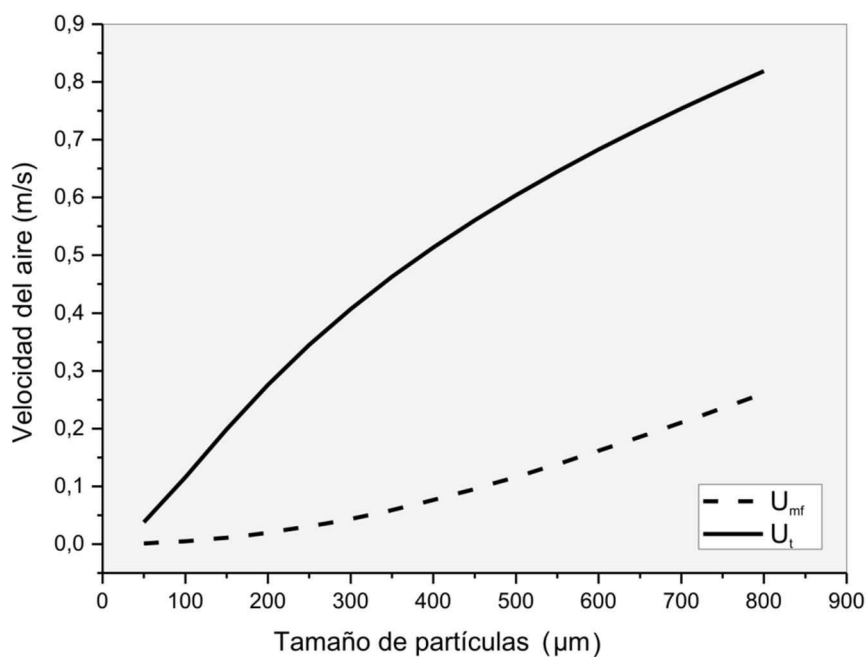


Figura 12. Curvas de velocidad de fluidificación mínima ( $U_{mf}$ ) (línea punteada) y velocidad terminal ( $U_t$ ) (línea continua) para partículas de CS.

El equipo de lecho fluido utilizado posee una geometría tronco-cónica (Figura 13.a), donde la base tiene un diámetro de 17 cm y la parte superior del equipo un diámetro de 30 cm, por lo cual a un caudal constante de aire, la velocidad varía en las distintas regiones del equipo. Es por esto que es necesario encontrar las condiciones de trabajo en las cuales la mayoría de las partículas se encuentren en un régimen fluidificado en la base del equipo y que, por otro lado, en la parte superior se reduzca la posibilidad de que existan partículas que se encuentren en régimen de transporte neumático. Tal condición se cumple con un  $Q_{aire} = 15 \text{ m}^3/\text{h}$ , donde la velocidad en la parte inferior del lecho es 0,18 m/s y en la parte superior es 0,05 m/s. La Figura

13.b muestra la curva con los datos obtenidos experimentalmente cuando se fluidificaron 200 g de una muestra de CS sin tamizar. Se observa que el punto de inflexión de la curva de diferencia de presión en función de caudal del aire es a  $17 \text{ m}^3/\text{h}$ , dato que concuerda con el valor calculado numéricamente.

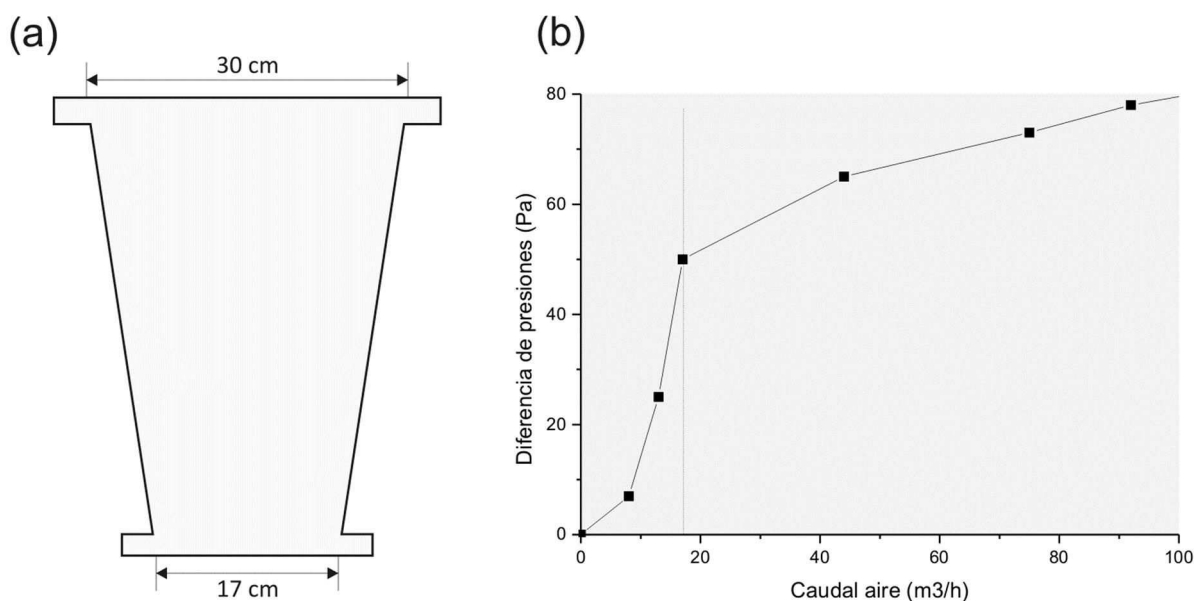


Figura 13. Esquema del lecho fluidizado utilizado en esta tesis (a). Curva experimental de diferencia de presiones en función del caudal de aire aplicado para partículas de CS (b).

Otros parámetros como la temperatura del aire de entrada, la presión de aire del aspersor y caudal de los fluidos que se dispensan sobre las partículas fueron determinados mediante ensayos previos realizados en nuestro laboratorio, priorizando trabajar en una región que minimice fenómenos como el *overwetting* (presencia excesiva de humedad en el lecho, debido a un elevado caudal de líquido en el aspersor o al secado poco eficiente).

También cabe aclarar que durante el procesamiento de las partículas es necesario realizar ajustes en el caudal del aire debido a que la incorporación de agua y el potencial incremento del tamaño de las partículas modifican las condiciones iniciales.

### 1.4.2 Obtención de las partículas de CS-f

Las partículas de CS-NaF (CS-f) se obtuvieron como se detalló en la sección 1.3.2, utilizando las condiciones de proceso de la Tabla 1.

En este sentido, Wan y col. (1992) [96] estudiaron diferentes métodos para elaborar micropartículas en equipos de lecho fluidizado con una baja concentración de APIs. Entre todas



las alternativas estudiadas concluyeron que el movimiento aleatorio de las partículas en el lecho fluido podría causar segregación de la droga si ésta es incluida de forma sólida junto con los demás componentes de la formulación y que se logra una distribución más homogénea si el principio activo se agrega en una solución mediante un aspersor [97]. Por este motivo se decidió que el agregado del API a las partículas de CS sea en forma de solución acuosa mediante aspersión.

### ***1.4.3 Efecto de la incorporación de ácido acético en las partículas de CS-f***

El CS presenta un gran número de grupo aminos primarios, por lo cual puede considerarse una base débil. En un medio ácido, el par de electrones desapareados del grupo amino de las unidades de glucosamina llevan a cabo el rol de aceptor de protones, por lo cual adquieren una carga positiva [98]. Por otro lado, el flúor es el elemento más electronegativo en la escala de Pauling (4,0) y en soluciones acuosas forma el ión fluoruro. En esta sección se estudió también el efecto de la posible interacción electrostática entre el CS y el ion fluoruro incorporando un 10 y un 15 % de ácido acético en las partículas CS-f (AA10 y AA15 respectivamente).

Al igual que lo observado cuando se elaboraron las partículas CS-f no se observó la formación de grandes aglomerados ni una pérdida de masa significativa, por lo cual puede sostenerse que las condiciones de proceso escogidas fueron correctas.

## ***1.4.4 Partículas CS-f, AA10 y AA15***

### ***1.4.4.1 Caracterización del proceso***

Los parámetros más relevantes para evaluar el desempeño del proceso de manipulación son el rendimiento general del proceso, la eficiencia de entrampamiento y el contenido de materia seca final de las partículas. Se calcularon estos parámetros para las partículas CS-f, AA10 y AA15 (Tabla 8). A fines comparativos se incorporó también el dato de materia seca del CS. El rendimiento general del proceso considera la masa seca total recuperada después del proceso con respecto a la masa seca de los productos utilizados. En todos los casos el rendimiento fue mayor al 79 % indicando una alta recuperación. La pérdida de masa puede

deberse a varios factores, pero el mayor efecto se corresponde a partículas que quedan retenidas en el filtro que se encuentra en la parte superior del equipo. Estas partículas, debido a su pequeño tamaño, se encuentran en el régimen de arrastre neumático. La fracción de partículas retenidas en el filtro fue determinada y en todos los casos fueron alrededor del 10 %. Como durante el proceso se agrega agua continuamente, algunas partículas quedan adheridas a la superficie interior del lecho, explicando otra de las fuentes de pérdida de material.

**Tabla 8. Eficiencia del proceso de producción y contenido de humedad de CS-f, AA10 y AA15 (n=3).**

<i>Parámetro</i>	<i>CS</i>		<i>CS-f</i>		<i>AA10</i>		<i>AA15</i>	
Rendimiento general del proceso (%)	-		79,96		85,81		85,66	
Eficiencia de entrapamiento (%)	-		83,72	± 3,88	86,4	± 1,10	84,32	± 1,16
Contenido materia seca (%)	91,30	± 4,42	95,63	± 2,64	94,28	± 3,77	96,64	± 4,32

La eficiencia de entrapamiento es la relación entre la masa total del principio activo entrapado (calculado a partir de medir la concentración de fluoruro en una alícuota de las partículas) sobre la masa teórica de fluoruro dispensada. Como se observa en la Tabla 8, la eficiencia de entrapamiento es alta, en todos los casos fue mayor al 83 %. La pérdida del principio activo puede atribuirse a las mismas causas que generan la pérdida de masa en el proceso.

#### 1.4.4.2 Distribución de tamaño de las partículas

Luego de haberse elaborado las partículas en el lecho, se caracterizó el tamaño por tamizado utilizándose tamices nº 200 (74 µm), 60 (250 µm), 35 (500 µm) y 18 (1000 µm), y a continuación se determinó la masa de partículas recuperada en cada tamiz y se calculó la distribución de tamaño acumulado para el biopolímero sin procesar y para cada una de las partículas elaboradas.

La Figura 14 muestra los resultados de dispersión de tamaño obtenidos. En las curvas se observa que las partículas de CS (CS) tienen un tamaño más pequeño (están más a la izquierda), mientras que las partículas procesadas en el lecho fluido poseen un tamaño mayor que las partículas sin procesar. Por otro lado, se observa que hay un corrimiento de las curvas hacia la derecha, es decir un incremento en el diámetro de las partículas y un aumento de la dispersión a medida que aumenta la concentración de ácido en las partículas. Esto puede atribuirse a que el CS, al entrar en contacto con las soluciones ácidas dispensadas tiende a disolverse, generando un

gel en la superficie de las partículas, que luego, al impactar entre ellas tienden a quedar unidas, lo que conlleva a la formación gránulos de mayor tamaño. Estas uniones se consolidan cuando las partículas se secan.

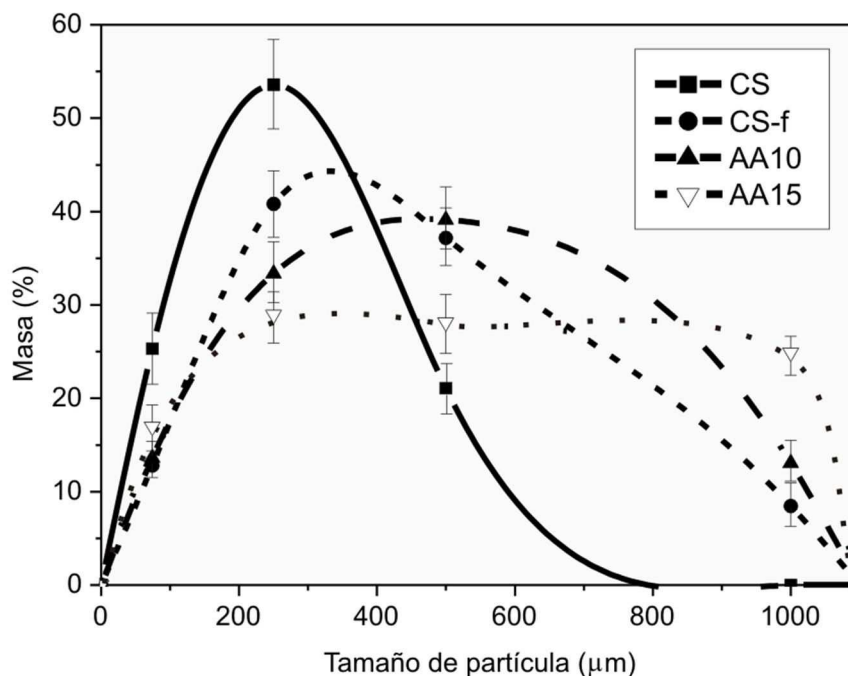


Figura 14. Distribución del tamaño de partículas de CS (CS), CS-f, AA10 y AA15.

#### 1.4.4.3 Análisis de espectroscopia infrarroja

Se estudiaron los espectros de absorción infrarrojo de CS, las partículas CS-f y AA15. Además se obtuvieron también los espectros de las partículas CS-f luego de ser incubadas en agua durante 24 h (post-CS-f) (Figura 15).

El CS presenta una banda de absorción en el rango comprendido entre  $3600$  y  $3100\text{ cm}^{-1}$ , la cual es resultado del solapamiento de las bandas de absorción correspondientes a los estiramientos de los grupos  $\text{-OH}$  y  $\text{-NH}$ . En la región entre  $2800$  y  $3000\text{ cm}^{-1}$  se observa la presencia de un pico asimétrico que se debe al estiramiento de los grupos alifáticos  $\text{-CH}_2$  y  $\text{-CH}_3$ , del anillo piranosa del CS [39]. En la región comprendida entre  $1750$  y  $1500\text{ cm}^{-1}$  se observan dos bandas de absorción. El pico que se encuentra a  $1651\text{ cm}^{-1}$  es asignado al grupo  $\text{C=O}$  del grupo acetilo de las unidades remanentes N-acetil-glucosamina, mientras que el pico a  $1597\text{ cm}^{-1}$  se debe al grupo  $\text{NH}_2$ . En la zona comprendida entre  $1500$  y  $1200\text{ cm}^{-1}$  se encuentran las bandas de absorción pertenecientes a oscilaciones características del grupo O-H y las flexiones C-H de los grupos  $\text{CH}_2$  ( $1422$  y  $1330\text{ cm}^{-1}$ ) y los estiramientos del enlace C-O del grupo alcohol primario

CH<sub>2</sub>-OH (1380 cm<sup>-1</sup>). Además se observan los picos de absorción debido al estiramiento asimétrico C-O-C (1158 cm<sup>-1</sup>) y el pico relacionado a el estiramiento C-O (1083 cm<sup>-1</sup>) [11, 12].

En las partículas compuestas por CS, ácido acético y fluoruro de sodio (AA15) se observan también la mayoría de las regiones de absorción características del CS, sin embargo el pico relacionado al grupo amino presente en 1597 cm<sup>-1</sup> está desplazado hacia la derecha (1531 cm<sup>-1</sup>), probablemente debido al efecto inductivo relacionado a la protonación de este grupo (el hidrogenión actúa como un aceptor de electrones).

Se ha reportado que la interacción electrostática entre el CS y el fluoruro se puede observar estudiando los picos de absorción del grupo amino del biopolímero [99-102]. Se observa una disminución relativa de la intensidad en las bandas de absorción correspondiente al NH<sub>2</sub> en el espectro correspondiente a CS-f si se compara con CS y post-CS-f, por lo cual puede suponerse que esta interacción está presente.

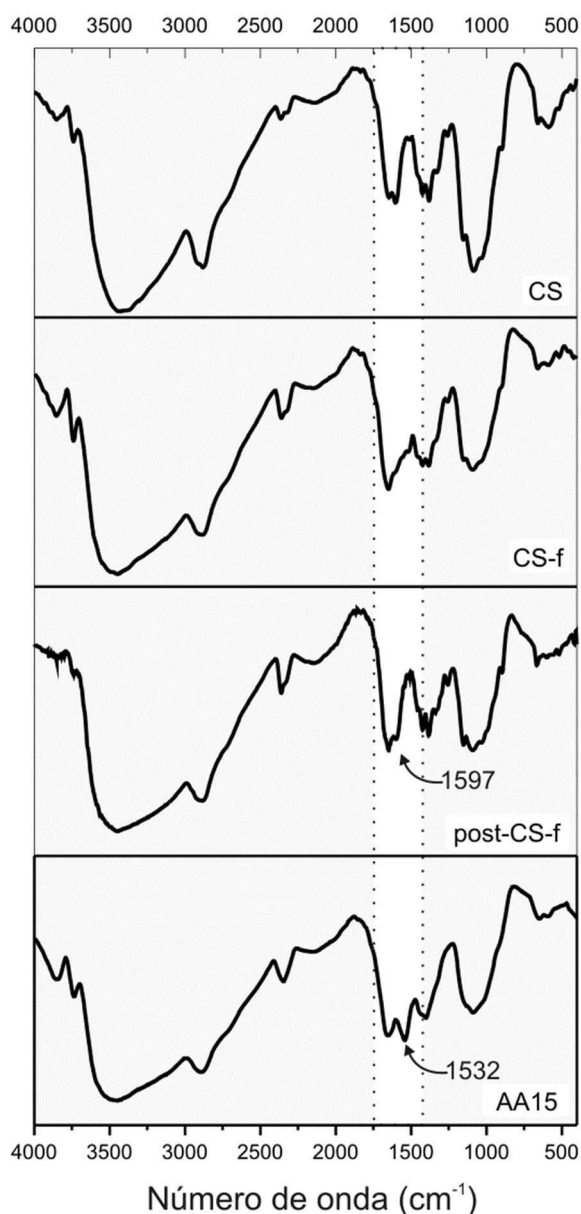
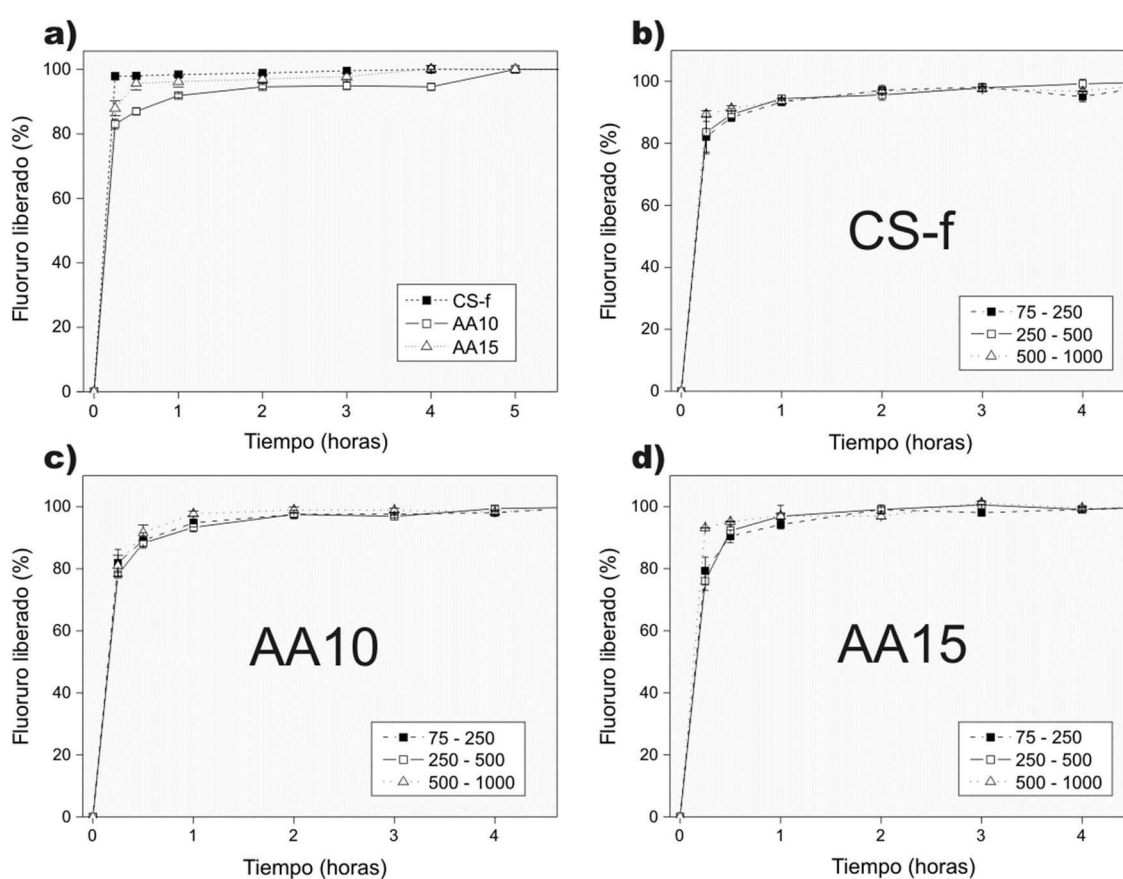


Figura 15. Espectros de FTIR de CS (CS), CS-f, las partículas CS-f luego de haber sido expuestas a agua destilada (*post-CS-f*) y las partículas con mayor contenido de ácido acético (AA15).

#### 1.4.4.4 Ensayo de liberación de fluoruro

Con el fin de estudiar la cinética de liberación del NaF a partir de las partículas desarrolladas (CS-f, AA10 y AA15) se realizaron ensayos de liberación en medio PBS pH 7,4 termostatzado a 37 °C y agitado a 100 rpm. Se tomaron muestras a diferentes tiempos y el contenido de fluoruro se determinó con un método potenciométrico utilizando un electrodo ion selectivo para fluoruro. Se graficó el porcentaje de fluoruro acumulado (%) en función del tiempo (t) (Figura 16).

En los tres casos se observó un marcado efecto *burst* (liberación muy rápida) en los primeros 15 min luego de los cuales se liberó más del 80 % de la carga del principio activo (Figura 16.a). En las partículas que no fueron tratadas con ácido acético (CS-f) la totalidad del fluoruro fue liberado en los primeros 15 minutos. En contraste, en AA10 y AA15 este valor estuvo comprendido entre el 83 % y el 88 %, aumentando lentamente hasta alcanzar el 100% antes de las 4 h de ensayo. Si bien se observaron diferencias entre los perfiles obtenidos para las partículas elaboradas, las mismas no lograron una liberación sostenida por varias horas, lo cual es deseable para este tipo de sistemas.



**Figura 16.** Curvas de liberación de fluoruro de las partículas *CS-f*, *AA10* y *AA15* (a) y de cada una separadas en tres poblaciones de tamaño (b, c y d).

Alternativamente se estudió el perfil de liberación de fluoruro en 3 poblaciones de tamaños de CS-f, AA10 y AA15 (75-250  $\mu\text{m}$ , 250-500  $\mu\text{m}$  y 500-1000  $\mu\text{m}$ ). En la Figura 16.b, c y d se muestran los resultados obtenidos para cada población de tamaño estudiada de cada una de las partículas desarrolladas. En todos los casos se observó que más del 75 % del principio activo presente en las partículas se liberó antes de los primeros 15 min de ensayo.

En las partículas CS-f y AA15 se observó que las poblaciones de mayor tamaño mostraron una liberación levemente superior en los primeros 15 min en comparación con las partículas de menor tamaño. Este fenómeno no se presentó en las partículas con un contenido inferior de ácido acético (AA10). Luego de transcurridos 30 min de comenzado el ensayo todas las partículas liberaron más del 90 % del API incluido.

La cantidad de fluoruro en cada una de las poblaciones coincidió con los valores obtenidos para las partículas sin separar por tamaño, por cual puede suponerse una distribución homogénea del principio activo.

### **1.4.5 Efecto de la distribución de tamaño del CS**

Teniendo en cuenta que hay indicios que indican que el tamaño de partículas puede tener influencia en la velocidad de liberación del principio activo, se decidió realizar un pre-procesamiento al CS utilizado como materia prima. Se efectuó una separación de tamaño por tamizado utilizando mallas con una luz de 74, 177 y 297  $\mu\text{m}$  para obtener 3 poblaciones diferentes: A (partículas que pasaron la malla de 74  $\mu\text{m}$ ), B (partículas retenidas entre las mallas de 74  $\mu\text{m}$  y 177  $\mu\text{m}$ ) y C (partículas retenidas entre las mallas de 177  $\mu\text{m}$  y 297  $\mu\text{m}$ )<sup>1</sup>. Además, teniendo en cuenta que la inclusión de ácido acético no mostró tener un marcado efecto en la liberación del API, se decidió no incluirlo en la formulación de estas partículas.

Las partículas de menor tamaño presentaron una buena fluidificación, sin embargo cuando se comenzó la aspersion de la solución con fluoruro se observó la presencia de aglomerados de gran tamaño cuyo diámetro aumentaba rápidamente (*overwetting*), por lo cual se suspendió la adición del principio activo y se continuó con el proceso de fluidificación para disminuir el contenido de humedad en el lecho. Luego de unos minutos se reinició la aspersion pero con un menor caudal de alimentación de la solución (4 g/min) y se incrementó la temperatura del aire de entrada para acelerar el secado. De todos modos, el *overwetting* se siguió presentando y aunque se alternaron etapas de secado y adición del principio activo, las partículas finales obtenidas presentaron grandes aglomerados. Estos resultados, como se discute más adelante en este capítulo, pueden estar relacionados al tamaño reducido de estas partículas

---

<sup>1</sup> Se optó por esta selección de tamaños considerando la granulometría del CS y el set de tamices disponibles en nuestro laboratorio.

[103]. Las partículas de mayor tamaño (B y C) presentaron una buena fluidificación y pudieron ser procesadas sin inconvenientes.

### **1.4.5.1 Caracterización de las partículas**

#### **1.4.5.1.1 Rendimiento del proceso**

Se calcularon los parámetros que determinan el rendimiento del proceso (Tabla 9). Como se detalló anteriormente las partículas de menor tamaño presentaron dificultades en su procesamiento, de todos modos se calculó la humedad y el rendimiento general. Se observó que el contenido de agua de estas partículas fue superior al obtenido para los otros dos casos y que el rendimiento general fue muy bajo (65,21 %). Se ha reportado que las partículas menores a 100 µm presentan diversas complicaciones al ser procesadas con este tipo de tecnología debido, por ejemplo, a que existe una mayor tendencia a la adhesión al ser humectadas, lo cual genera no solo la formación de aglomeraciones de gran tamaño, sino también la pérdida de masa por adhesión a las paredes del equipo y a los filtros [104]. Por otro lado, la formación de estos grandes aglomerados dificulta la transferencia de materia entre las partículas y el aire de fluidificación por lo cual el proceso de secado se vuelve ineficiente. La bibliografía indica que para disminuir la velocidad de crecimiento de las partículas se debe aumentar la temperatura de entrada del aire, reducir el caudal de adición de líquido al lecho o aumentar el caudal de aire [46,105]. Las 3 alternativas fueron evaluadas pero en todos los casos se observó que el lecho colapsó.

Las partículas B y C pudieron ser procesadas sin ningún inconveniente y presentaron rendimientos similares a los obtenidos en las instancias anteriores de este trabajo.

**Tabla 9. Eficiencia del proceso de producción y contenido de humedad de las partículas A, B y C (n=3).**

<i>Parámetro</i>	<i>Partículas A</i>	<i>Partículas B</i>	<i>Partículas C</i>
Rendimiento general (%)	65,21	90,94	98,31
Eficiencia de entrapamiento (%)	-	83,46 ± 3,09	82,6 ± 2,51
Contenido materia seca (%)	85,21 ± 2,11	92,84 ± 0,07	91,32 ± 1,57

#### **1.4.5.1.2 Distribución de tamaño de las partículas**

El estudio de distribución de tamaños para estas muestras se realizó mediante el análisis de imágenes obtenidas por microscopía óptica. Se optó por este método debido a que estas



partículas habían sido tamizadas antes de procesarse en el lecho fluido, por lo cual era esperable una dispersión de tamaños angosta. En la Figura 17.a se muestran los resultados obtenidos en este análisis. Las partículas de menor tamaño fueron analizadas solo antes de la inclusión del principio activo debido a los inconvenientes ocurridos durante su procesamiento. En las curvas obtenidas para las partículas de tamaño medio antes (B) y después de la inclusión del API (B-f), se denota un leve corrimiento de la distribución de tamaños de B-f hacia la derecha, es decir aumenta el tamaño de las partículas. En el caso de las partículas C, se observó que el procesamiento no generó grandes diferencias en la distribución de tamaños.

En las partículas B la proporción de partículas de un tamaño menor a 100  $\mu\text{m}$  es muy superior a la misma población en las partículas B-f, esto puede atribuirse a que la velocidad terminal mínima es inferior en partículas pequeñas, por lo cual durante el proceso de fluidificación parte de las partículas son desplazadas a hacia los filtros del equipo. Este efecto también puede verse reflejado en que el rendimiento de las partículas C (poseen una menor proporción de partículas inferiores a 100  $\mu\text{m}$ ) fue sensiblemente superior a las otras dos poblaciones ensayadas.

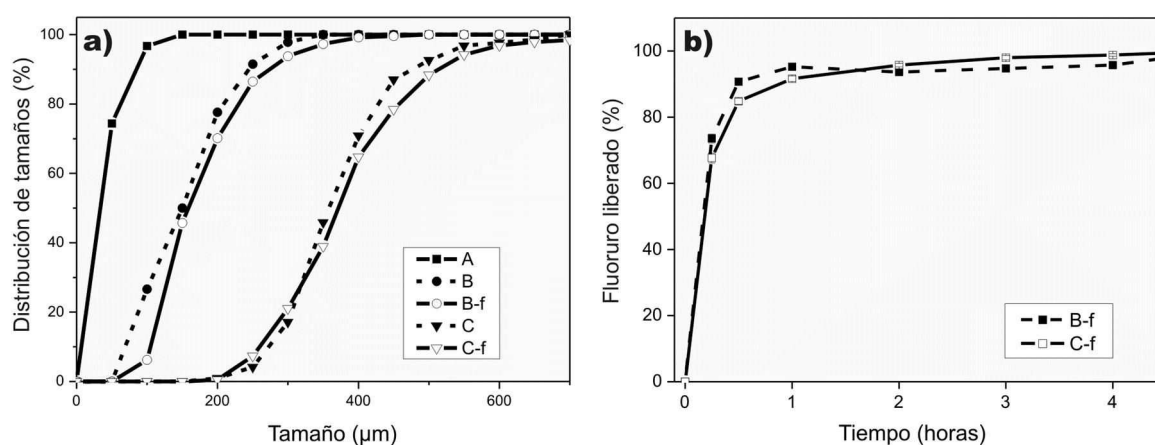


Figura 17. Distribución de tamaño de las partículas A, B y C (a). Curvas de liberación de B-f y C-f. (b).

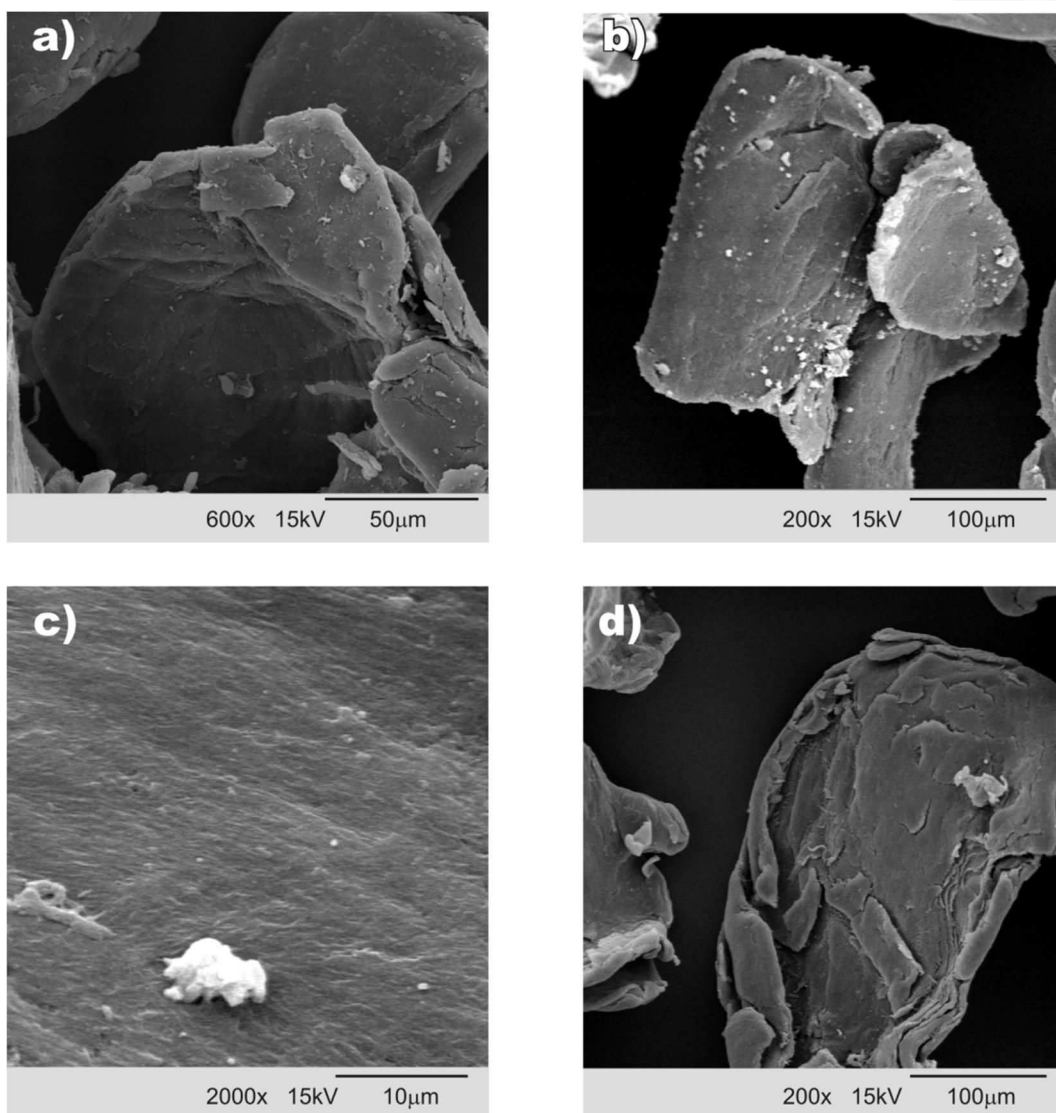
### 1.4.5.2 Ensayo de liberación de fluoruro

El estudio de liberación del API a partir de las partículas desarrolladas en esta etapa se llevó a cabo en las mismas condiciones que cuando se analizaron las partículas sin previa separación. Fueron evaluadas solamente las partículas B-f y C-f y se observó que en ambos casos se repite el efecto de una liberación rápida en los primeros minutos de ensayo Figura 17.b. Las

partículas C-f presentaron una liberación menor que B-f en los primeros 15 min ( $67,67 \pm 3,23$  % vs  $73,55 \pm 2,30$  %), aunque no existen diferencias significativas ( $p > 0,05$ ; t-test); luego de ese período los perfiles de liberación obtenidos fueron similares.

### **1.4.5.1.3 Microscopía electrónica de barrido**

Se obtuvieron micrografías del CS sin tratamiento, de C-f y de C-f (post-CS-f) después de haber sido expuesto a un medio acuoso por 24 h (Figura 18) mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). La Figura 18.a muestra que antes de recibir cualquier tratamiento, las partículas de CS presentan una superficie lisa e irregular. Además se puede observar la presencia de partículas más pequeñas (aproximadamente  $1 \mu\text{m}$  de diámetro) adheridas a la superficie. Las partículas C-f (Figura 18.b) muestran un tamaño similar a las de CS y en su superficie se observan cristales de un tamaño de aproximadamente  $10 \mu\text{m}$  (Figura 18.c). Estos cristales al ser analizados por EDS mostraron tener un alto contenido de fluoruro, por lo cual pueden atribuirse al fluoruro de sodio. Éstas estructuras no se encuentran presentes en las partículas que fueron incubadas por 24 h en agua destilada (Figura 18.d), por lo cual puede suponerse que los cristales presentes en la superficie se disuelven en el medio acuoso (esperable para este principio activo). Por otro lado, el polvo detectado en la superficie de CS no fue observado en ninguna de las otras imágenes, probablemente porque al ser tratado en el lecho fluidizado esas pequeñas partículas fueron desprendidas y retenidas en los filtros del equipo.



**Figura 18. Micrografías obtenidas por SEM de: CS (a); C-f (b y c) y C-f después de haber sido expuestas a un medio acuoso por 24 h(d).**

Analizando el conjunto de los resultados obtenidos hasta este punto, se puede establecer que la inclusión del fluoruro en partículas de CS utilizando la tecnología de lecho fluidizado, en todos los casos, presentó una liberación rápida del principio activo. Sin embargo, se observó que este efecto se ve disminuido en parte por el pre-procesamiento del CS.

Cuando el CS fue procesado sin una separación de tamaños previa se obtuvo una liberación superior al 80 % en los primeros 15 min. El análisis FTIR manifiesta indicios de la existencia de una interacción electrostática entre el ion fluoruro y el grupo amino del biopolímero, de todos modos ésta no disminuye la liberación del API significativamente.

Además, la adición de ácido acético tampoco exhibió un efecto sobre la cinética de liberación en el rango de tiempos evaluados.

Los resultados muestran que al realizar una separación por tamaños del CS antes del procesamiento en el lecho fluido se pudo realizar un ajuste más preciso de las condiciones experimentales. A su vez, los ensayos de liberación del principio activo indican que en las dos poblaciones de tamaños estudiadas se obtuvieron valores muy inferiores de liberación en los primeros 15 min de ensayo si se comparan con los obtenidos cuando el CS no fue pre-tratado.

También se observó que aumentaba el rendimiento del proceso con el incremento del tamaño de las partículas y que cuando el tamaño era inferior a  $74\ \mu\text{m}$  fueron muy difíciles de procesar. En el trabajo "Types of gas fluidization", Geldart (1973) propuso una clasificación en 4 grupos según el comportamiento de las partículas cuando son fluidificadas en un medio gaseoso, basándose solamente en dos parámetros: tamaño de partícula y la diferencia de densidad entre la partícula y el gas [103]. La Figura 19 muestra cómo se conforman los grupos según estos parámetros. Las partículas que pertenecen a los grupos A y B poseen las mejores condiciones para ser fluidificados, obteniéndose lechos con buena agitación y transferencia de energía. Las partículas del grupo D, debido a su alta densidad o gran tamaño generan lechos con baja mezcla y grandes burbujas de aire. Las partículas del grupo C son las que presentan el menor tamaño y es complejo lograr una fluidificación estable debido a la alta influencia de las fuerzas interpartículas.

En la Figura 19 se detalla también dentro de qué grupo se clasifican las partículas de CS separadas en las tres poblaciones de tamaños elegidas en nuestro trabajo. Las partículas con una granulometría comprendida entre  $74$  y  $297\ \mu\text{m}$  se ubican en su totalidad en los grupos A y B. Por otro lado, parte de las partículas de menor tamaño se incluyen en el grupo C, lo cual explicaría los inconvenientes surgidos y el bajo rendimiento al ser procesadas en el lecho fluido.

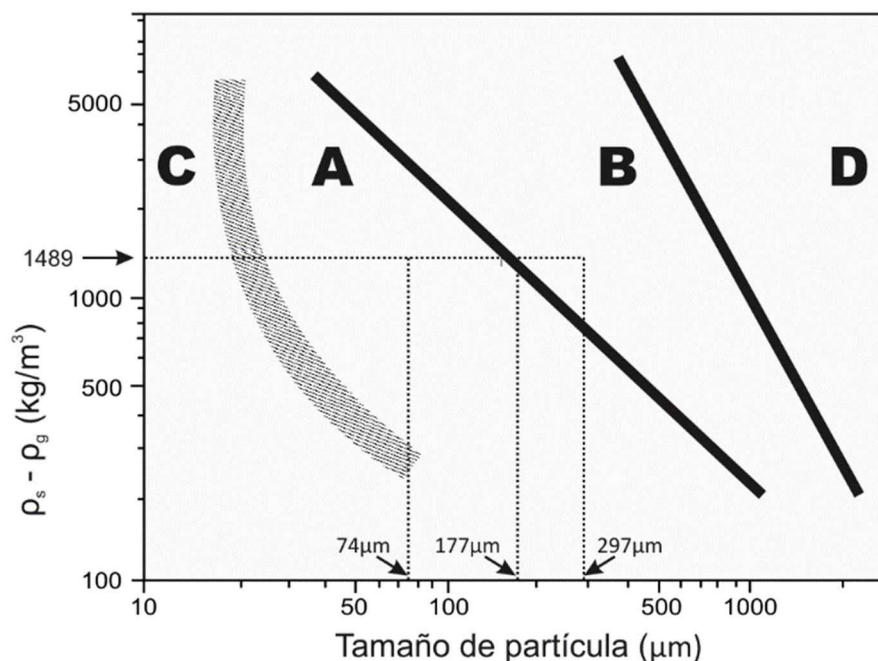


Figura 19. Diagrama de clasificación de partículas para su fluidificación con aire (adaptado de Geldart, 1973) [103].

Además, las micrografías obtenidas por SEM mostraron la presencia de cristales con un alto contenido de fluoruro de sodio en la superficie de las partículas, éstos no estaban presentes en las partículas luego de sumergidas en agua por 24 h. Teniendo en cuenta la alta solubilidad acuosa de este API, puede afirmarse que el mecanismo de liberación del fluoruro de sodio está gobernado por la cinética de disolución de estos cristales, lo que conlleva como consecuencia su rápida disolución en el medio ensayado.

En las etapas siguientes del corriente capítulo se ensayarán diferentes metodologías y tipos de recubrimientos con el fin de modificar la cinética de liberación de API. Se estudiaron dos tipos de recubrimientos poliméricos, uno basado en polivinilpirrolidona (PVP, polímero soluble en agua) y otro en EUDRAGIT® RS30D (copolímero de etilacrilato, metilmetacrilato, insoluble en agua) aplicado como una dispersión acuosa.

#### 1.4.6 Partículas recubiertas con PVP

Se recubrieron partículas C-f con PVP k17 como se describió previamente (Tabla 5). Durante la aplicación del recubrimiento no se observó la formación de aglomerados y no fue necesario detener el proceso en ningún momento, exceptuando los establecidos para la toma de muestra.

### 1.4.6.1 Caracterización del proceso

En la Tabla 10 se muestran los parámetros que determinan el proceso de recubrimiento de las partículas con 6 % de PVP (CS6PVP). El rendimiento general del proceso fue calculado incluyendo la pérdida de masa debida a las dos tomas de muestras realizadas. Los tres parámetros fueron similares a los obtenidos en los procesos anteriores con un rendimiento general mayor al 90 %, una eficiencia del 86,43 % y un contenido de humedad menor a 9 %. Por lo cual, se puede afirmar que las condiciones escogidas para aplicar un recubrimiento de PVP a las partículas C-f fueron adecuadas.

**Tabla 10. Eficiencia del proceso de producción y contenido de humedad de CS6PVP (n=3).**

Parámetro	CS6PVP	
Rendimiento general (%)	93,71	
Eficiencia de entrapamiento (%)	86,43	± 3,33
Contenido materia seca (%)	91,35	± 1,50

### 1.4.6.2 Distribución de tamaño de las partículas

El estudio de la granulometría de las partículas recubiertas con PVP fue realizado (al igual que en las partículas A, B y C) mediante análisis digital de imágenes obtenidas por microscopía óptica (Figura 20). Las partículas con un contenido de PVP del 4 % (CS4PVP) mostraron un tamaño levemente inferior que las partículas con el nivel más alto de recubrimiento (CS6PVP), esto puede atribuirse al aumento de tamaño de cada partícula debido a la capa de recubrimiento o a la aglomeración de las partículas (Figura 20). La distribución de tamaños correspondiente a las partículas 2 % PVP no está representada en la gráfica ya que la curva se solapaba con la correspondiente a 4 % PVP. Además, se observa que el tamaño de las partículas antes de recibir el recubrimiento (C-f) es mayor que el de las partículas recubiertas. Esta disminución de tamaño se relaciona con el típico desgaste generado por la colisión de las partículas en el seno del lecho y entre las partículas y las paredes de equipo (atrición). Para el proceso de recubrimiento de las partículas se utilizó una temperatura de proceso mayor que en las etapas anteriores (100 °C vs. 90 °C) por lo cual es esperable que durante la primera etapa en la cual el equipo alcanza la temperatura de trabajo la humedad de las partículas sea muy baja, lo que conlleva a un aumento en la friabilidad y una mayor propensión a la atrición [49].

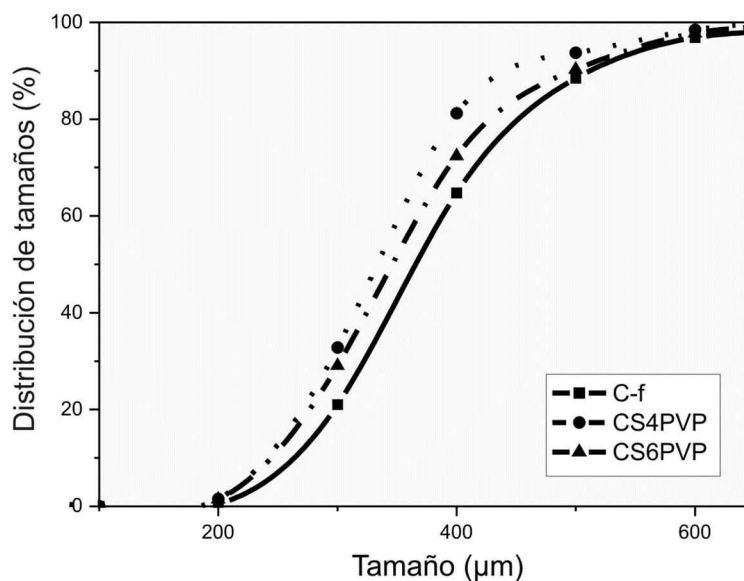


Figura 20. Distribución de tamaños de las partículas C-f, CS4 PVP y CS6PVP.

### 1.4.6.3 Análisis de FTIR

Con el objetivo de investigar la composición de las partículas recubiertas y comprobar si el recubrimiento se mantiene luego de ser expuestas a un medio acuoso, se registraron espectros de FTIR: del polímero utilizado para el recubrimiento (PVP), de las partículas con el nivel más alto de recubrimiento (CS6PVP) y de las partículas que fueron sumergidas en agua destilada durante 24 h (post-CS6PVP) (Figura 21).

El espectro correspondiente al PVP muestra las señales características de este polímero. En la región comprendida entre  $2000$  y  $4000\text{ cm}^{-1}$  se observa una banda de absorción ancha que puede atribuirse a los estiramientos del grupo  $\text{-OH}$  del agua presente en la muestra, debido a que este polímero es altamente hidrofílico ( $3469\text{ cm}^{-1}$ ). Además se observó un pico con un hombro a la derecha que se debe al solapamiento de la absorción debida a los estiramientos de los grupos  $\text{-CH}$  y  $\text{-CH}_2$  ( $2963\text{ cm}^{-1}$ ). El pico angosto en  $1651\text{ cm}^{-1}$  se debe a la contribución de las vibraciones de estiramiento de los grupos  $\text{-C=O}$  y  $\text{-N-C}$ . Se denota también la presencia de 4 picos de absorción ( $1506$ ,  $1459$ ,  $1431$  y  $1377\text{ cm}^{-1}$ ) relacionados a la deformación de los enlaces C-H de los grupos  $\text{CH}_2$  de la pirrolidona. El pico angosto en  $1288\text{ cm}^{-1}$  puede relacionarse con el estiramiento C-N propio de una amida terciaria. Estos resultados están en concordancia con los publicados por Laot y col. (1997) [106].

Los espectros de FTIR de las partículas que recibieron el tratamiento con PVP (CS6PVP) mostraron los picos característicos del CS y del polímero de recubrimiento. En especial se resalta la presencia del pico a  $1651\text{ cm}^{-1}$  propio del grupo carbonilo de la PVP, el cual se encuentra en una baja proporción en el CS debido al alto grado de desacetilación. El espectro obtenido a partir de las partículas que fueron expuestas durante 24 h a un medio acuoso muestra una disminución de la intensidad relativa del pico relacionado al carbonilo (post-CS6PVP), adoptando la forma característica del espectro del CS observado en la Figura 15. Es probable que la ausencia de los picos característicos del PVP se deba a que el polímero se disuelve mientras está sumergido en el medio acuoso.

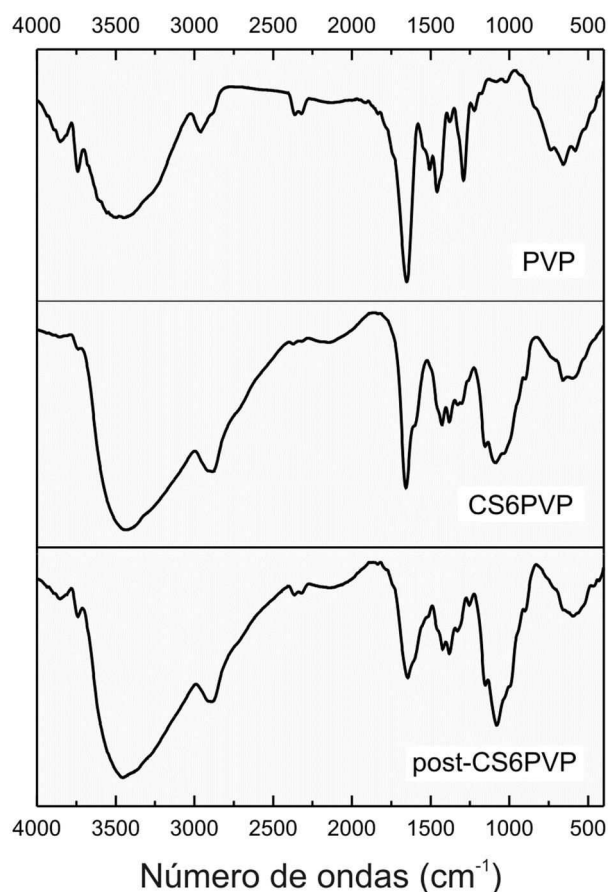


Figura 21. Espectros de FTIR de PVP, CS6PVP y CS6PVP luego de ser expuesto a un medio acuoso por 24 h (*post-CS6 PVP*).

#### 1.4.6.4 Microscopía electrónica de barrido

Se obtuvieron micrografías por SEM de la superficie de las partículas CS6 PVP antes y después de ser sometida al ensayo de liberación.



En la Figura 22.a se muestra la micrografía obtenida para las partículas CS6PVP. Se observa, además de los cristales de fluoruros presentes también en las partículas CS-f, una superficie rugosa y no homogénea que puede atribuirse a la deposición de PVP.

En la Figura 22.b se observa que tanto el recubrimiento como los cristales no se encuentran presentes y las partículas toman el aspecto del CS sin tratamiento.

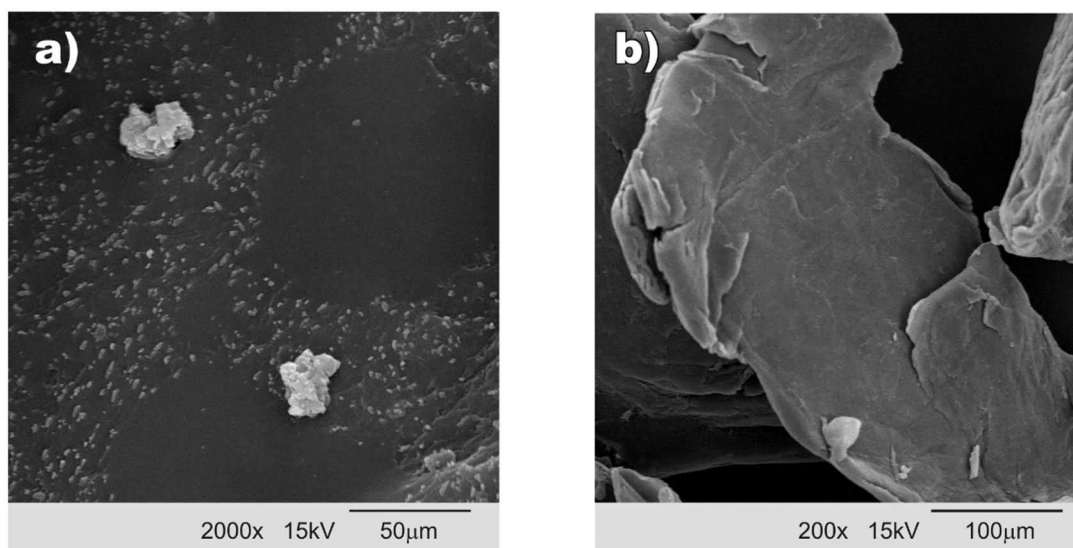
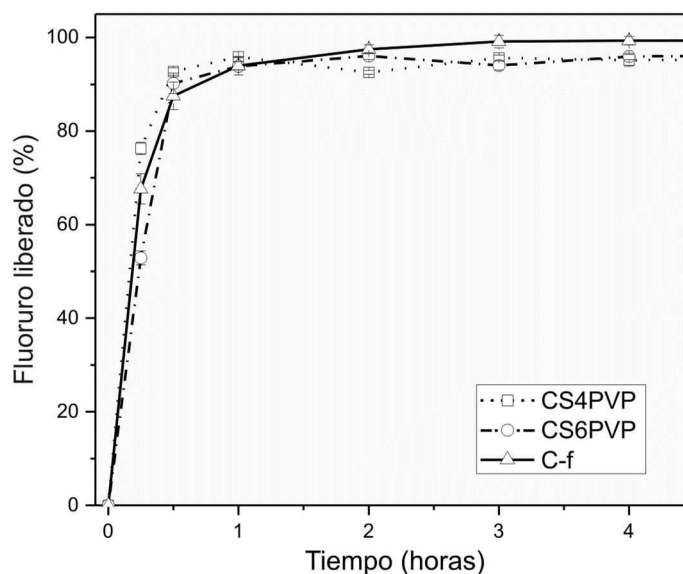


Figura 22. Micrografías obtenidas por SEM de: CS6PVP (a) y éstas luego de ser sumergidas en agua por 24 h (b).

#### **1.4.6.5 Ensayo de liberación de fluoruro**

Se evaluó la liberación del fluoruro en función del tiempo en un medio PBS con un pH de 7,4 para las partículas recubiertas con PVP. En la Figura 23 se muestran los resultados obtenidos para las partículas recubiertas y sin recubrir. Con el fin de simplificar la visualización de las curvas, no se incluyen los valores obtenidos para las partículas con la menor concentración de recubrimiento (CS2PVP). Cuando el nivel de recubrimiento fue de un 4 % (CS4PVP), se observa que el principio activo se libera a una velocidad igual o mayor que la mostrada por las partículas sin recubrimiento en los primeros 15 min, mientras que cuando el recubrimiento fue de un 6 % la liberación del fluoruro fue del 52 % y significativamente menor que las partículas C-f y 4 % PVP ( $p < 0,05$ ). Luego de transcurridos 30 min todas las partículas estudiadas liberaron aproximadamente el 90 % del principio activo, por lo cual la atenuación en la cinética de liberación del API no es suficiente para los objetivos planteados.



**Figura 23. Curvas de liberación de fluoruro de las partículas C-f, CS4PVP y CS6PVP.**

Los resultados obtenidos del análisis de FTIR y por microscopía electrónica de barrido sugieren que se logró recubrir las partículas C-f con PVP de manera no homogénea, además este recubrimiento no se encuentra en las partículas luego de permanecer en un medio acuoso por 24 h, por lo que puede suponerse que tanto el principio activo como el recubrimiento, al tener una alta solubilidad acuosa, migran al medio al que fue expuesto. Si a este análisis se le incorporan los resultados cinéticos observados en los ensayos de liberación se puede agregar que la velocidad de disolución del recubrimiento es también elevada por lo cual, dentro del rango de recubrimiento estudiado, el PVP no logra disminuir la liberación de NaF en períodos mayores a 15 min.

### **1.4.7 Partículas recubiertas con EUDRAGIT® RS30D**

Se estudió la aplicación de un recubrimiento basado en un polímero no soluble en medios acuosos, con el fin de lograr una película que puede perdurar durante el período de exposición al medio de liberación. El recubrimiento se realizó sobre partículas C-f con dos metodologías diferentes, por lecho fluidizado y por inmersión.

### 1.4.7.1 Caracterización de las partículas recubiertas por lecho fluidizado

#### 1.4.7.1.1 Rendimiento del proceso

Durante la operación de recubrimiento por lecho fluidizado no se observó la presencia grandes aglomeraciones y éste fue llevado a cabo sin inconvenientes, se calcularon los parámetros que representan el desempeño del proceso, los resultados se detallan en la Tabla 11.

**Tabla 11. Eficiencia del proceso de producción y contenido de humedad de las partículas EUD12 (n=3).**

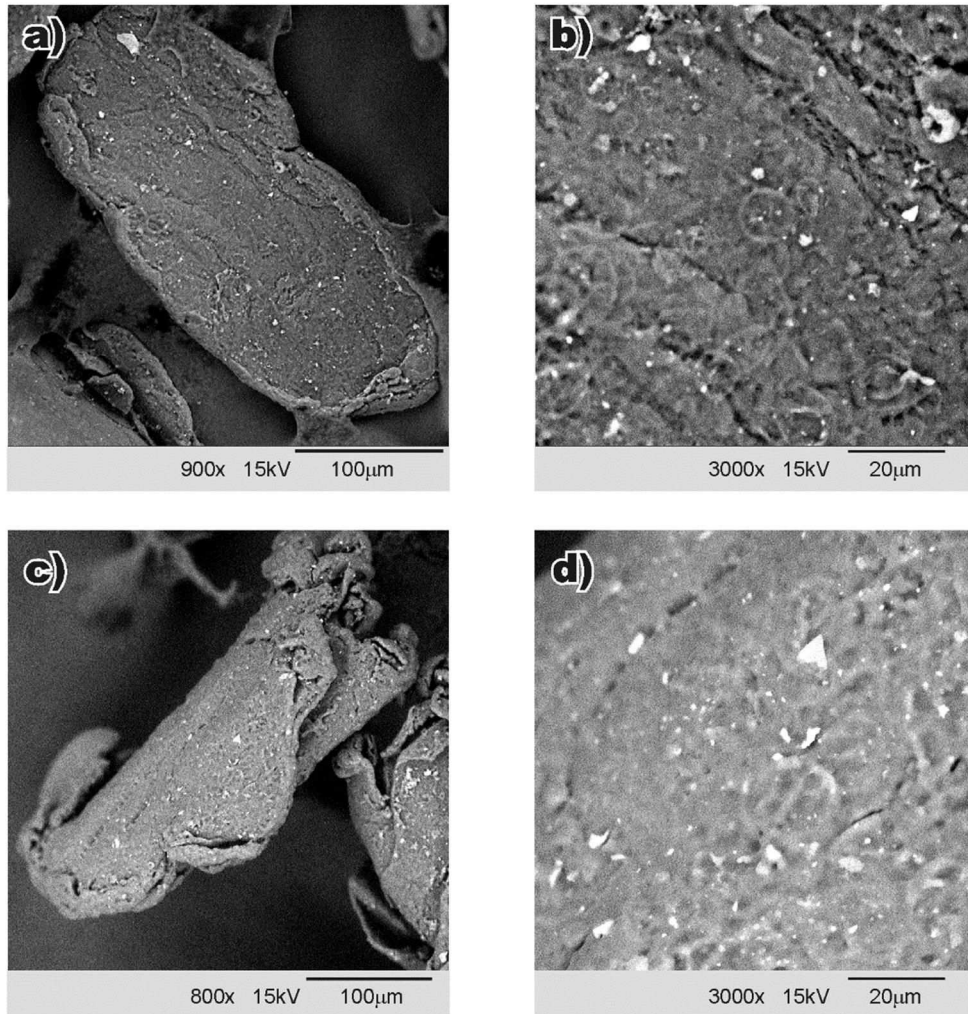
Parámetro	CS6PVP	
Rendimiento general (%)	93,71	
Eficiencia de entrapamiento (%)	86,43	± 3,33
Contenido materia seca (%)	91,35	± 1,50

Al igual que las partículas presentadas en este trabajo, el contenido de humedad luego del procesamiento fue bajo (8,70 %). El rendimiento general, es decir la fracción de sólidos recuperados luego del proceso de recubrimiento, fue muy inferior al observado en los demás desarrollos, incluso comparado con los valores obtenidos cuando se realizó el recubrimiento con PVP (93,71 %). Existen varios factores que pueden explicar estas diferencias. El contenido de agua de la solución de recubrimiento utilizado en esta etapa es levemente inferior al utilizado cuando se realizó el recubrimiento con PVP (83 % vs. 90 %) lo cual puede afectar de varias formas al rendimiento general. En primer lugar, como la cantidad de agua a remover es menor puede ocurrir que la gota de la solución de recubrimiento se seque antes de impactar con las partículas formando un polvo fino que sería arrastrado hacia los filtros del equipo. Por otro lado, durante el proceso de secado de la gota aumenta la concentración del polímero, incrementándose en consecuencia la viscosidad de la misma [46]. Esto conlleva un aumento en la adhesividad de la solución de recubrimiento incrementando la probabilidad de que las partículas C-f queden retenidas en los filtros o en las paredes del equipo. Es probable que estos dos efectos sean los responsables de un menor rendimiento.

#### 1.4.7.1.2 Microscopía electrónica de barrido

La Figura 24 muestra las micrografías obtenidas de las partículas EUD12 sin curar (a y b) y curadas (c y d). Los cristales que se observan en todas las imágenes (puntos blancos en la

superficie de las partículas) fueron estudiados por EDS. Los resultados mostraron que si bien la composición no es homogénea, muchos de éstos tuvieron una alta concentración de fluoruro, por lo cual puede suponerse que parte del fluoruro de sodio queda expuesto en la superficie de las partículas.



**Figura 24.** Micrografías obtenidas por SEM de: *EUD12 sin curar* (a y b) y *EUD12 curado* (c y d).

Si bien el número de etapas en las que se divide el proceso de conformación del recubrimiento de partículas en un lecho fluido está en discusión pueden plantearse que el proceso comienza con el secado de la gota del polímero desde que ésta sale del pico del aspersor, hasta después de haber impactado en la partícula; período que se caracteriza por la alta velocidad de evaporación del solvente. Luego, las partículas poliméricas depositadas en la superficie comienzan a deformarse y entran en contacto entre ellas generando un film

discontinuo y agrietado. En la última etapa de este proceso se genera una capa continua por la coalescencia de las gotas del recubrimiento debido a la difusión de las cadenas del polímero [53].

Las partículas sin curado (Figura 24.a y b) muestran grietas y marcas circulares en su superficie que pueden atribuirse a una de las etapas de la formación del recubrimiento, mientras que las imágenes de las partículas luego del curado (Figura 24.c y d) muestran un aspecto más suavizado y con menos fisuras denotando que el curado realizado colaboró a conformar un recubrimiento más homogéneo.

### 1.4.7.1.3 Ensayo de liberación de fluoruro

Se estudiaron los perfiles de liberación de las partículas recubiertas con los tres niveles de EUDRAGIT® antes y después del proceso de curado. En Figura 25 se muestran solamente los resultados obtenidos para las partículas recubiertas con 12 % del polímero y las partículas sin recubrimiento (C-f) debido a que las curvas eran similares y se solapaban con las partículas con menor contenido de EUDRAGIT®. Se observó que en ninguno de los casos la capa de recubrimiento logró disminuir el efecto de liberación rápida en los primeros minutos.

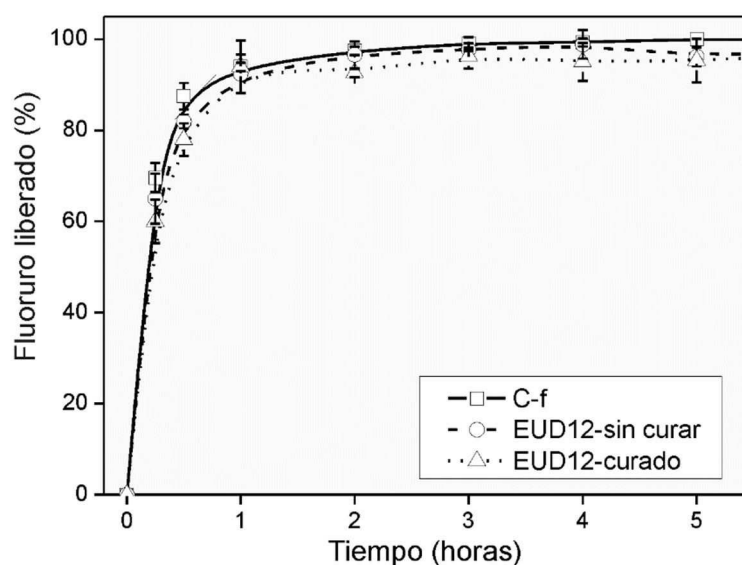


Figura 25. Curvas de liberación de fluoruro de las partículas C-f, EUD12 sin curar y EUD12 curado.

Analizando los resultados de los estudios de SEM y FTIR de las partículas EUD12 se puede concluir que el polímero se encuentra formando una capa alrededor de las partículas. Sin embargo la cinética de liberación del fluoruro muestra que en los primeros 15 min más del 60 %

del principio activo presente en las partículas se disuelve en el medio ensayado. Los parámetros utilizados para la formulación y aplicación del recubrimiento fueron similares a los propuestos en el trabajo de Kaur y col. (2009) [31]. Sin embargo, en las partículas desarrolladas en esta tesis se observó que la liberación del principio activo fue más acelerada. Esta diferencia puede atribuirse a que las partículas de la utilizadas por Kaur eran esféricas, de mayor tamaño (entre 500 y 710  $\mu\text{m}$ ) y con una superficie lisa. En contraposición, las partículas recubiertas en esta sección eran irregulares y con un tamaño de entre 177 y 297  $\mu\text{m}$ , por lo cual puede es posible que la masa de recubrimiento aplicada haya sido insuficiente para lograr una capa con un espesor que logre disminuir la cinética de liberación del API.

### ***1.4.7.2 Caracterización de partículas recubiertas por inmersión***

Como se detalló en la sección de materiales y métodos de este capítulo, se estudió también la aplicación del recubrimiento con EUDRAGIT® RS30D mediante un proceso de inmersión, por el cual las partículas C-f fueron sumergidas en una solución de recubrimiento con la misma formulación utilizada cuando se aplicó este polímero por lecho fluidizado. La inmersión fue aplicada durante 1 (Eud-1min) y 2 min (Eud-2min).

#### **1.4.7.2.1 Concentración del principio activo en las partículas**

Se determinó la concentración de fluoruro contenido en las partículas midiendo la masa del principio activo liberada en PBS pH 7,4 luego de 48 h. Se calculó la eficiencia del proceso como el cociente entre la masa de fluoruro en las partículas después y antes de la aplicación del recubrimiento.

**Tabla 12. Eficiencia del proceso de producción y concentración de fluoruro de las partículas recubiertas por inmersión (n=3).**

Parámetro	C-f	Eud-1min	Eud-2min
Concentración de fluoruro (% p/p)	0,76 ± 0,02	0,33 ± 0,02	0,30 ± 0,03
Eficiencia del proceso (%)	-	43,42 ± 2,06	39,47 ± 4,11

Se observa que la concentración de fluoruro disminuye en función del tiempo de exposición a la solución del recubrimiento, esto puede deberse al aumento de la masa de las partículas debido a la incorporación del EUDRAGIT® RS en su superficie, a la inclusión de

partículas secas de componentes presentes en la formulación de recubrimiento (talco, metilparabeno o EUDRAGIT® RS) o por la migración de fluoruro a la solución de recubrimiento.

#### 1.4.7.2.2 Distribución de tamaño de las partículas

La distribución de tamaño de Eud-2min fue estudiada mediante el análisis de imágenes tomadas con un microscopio óptico (Figura 26). En la misma figura se muestra también la granulometría de las partículas C-f utilizadas como base. Se observa que antes de ser recubiertas las partículas presentan una distribución unimodal angosta, mientras que la curva obtenida para Eud-2min es ancha y parece estar compuesta por más de una población de tamaños.

Con el fin de dilucidar los componentes que conforman Eud-2min se deconvolucionó la curva obtenida utilizando la función “*fit Multi-peaks*” del *software* Origin pro 8. Los resultados obtenidos se grafican también en la Figura 26. El componente denominado pico 1 (150  $\mu\text{m}$ ) podría atribuirse a partículas secas conformadas por los componentes de la solución de recubrimiento (EUDRAGIT® RS y talco), el pico 2 (350  $\mu\text{m}$ ) se pueden adjudicar a las partículas C-f recubiertas ya que tienen un tamaño similar a éstas mismas partículas antes de ser sumergidas en la solución del polímero. El pico 3 (550  $\mu\text{m}$ ) puede atribuirse a la formación de aglomerados. De todos modos esta técnica no es lo suficientemente sensible como para evidenciar el aumento de tamaño debido la película de recubrimiento, para tal fin se realizaron análisis mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

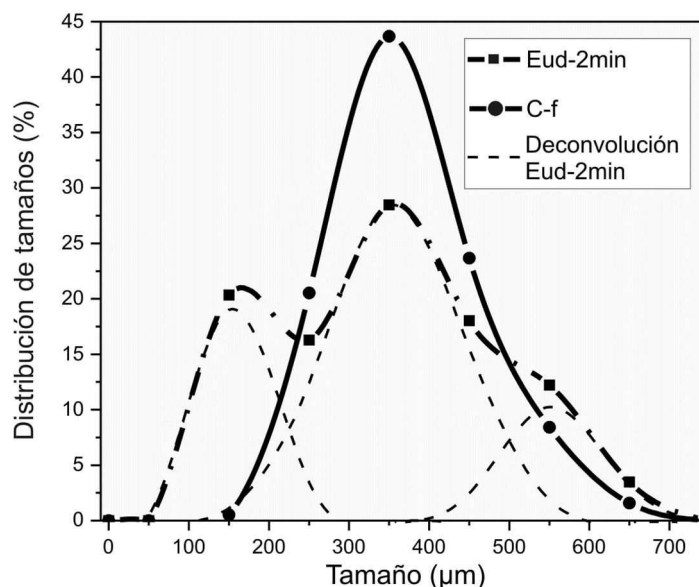


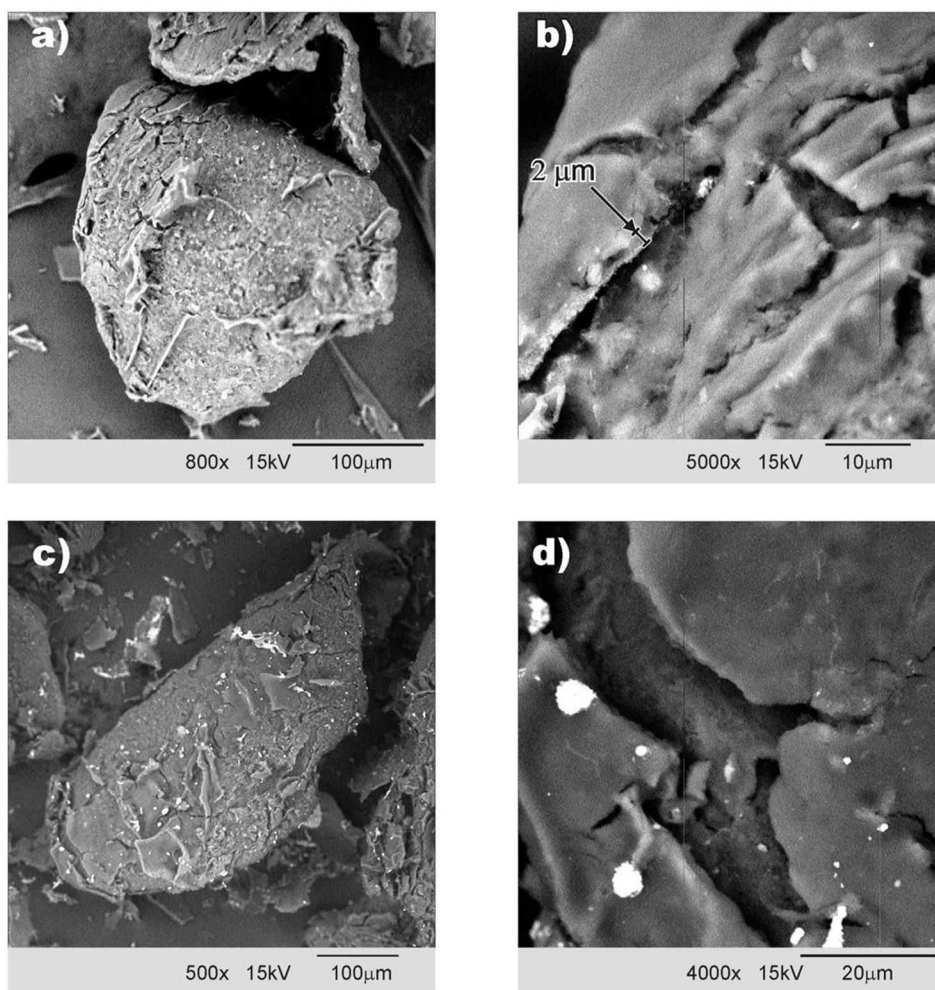
Figura 26. Distribución de tamaños y deconvolución de *Eud-2min* y *C-f*.

### 1.4.7.2.3 Microscopía electrónica de barrido

Se obtuvieron imágenes de la superficie de las partículas recubiertas por inmersión (*Eud-2min*) mediante SEM. Las Figura 27.a y b muestran la morfología de las partículas antes de ser sometidas a ensayos de liberación. Se observó que el recubrimiento generado es irregular con la presencia de grietas, además el film polimérico conformado tiene un espesor de aproximadamente 2 µm (resaltado en la Figura 27.b).

Las Figura 27.c y d pertenecen a las imágenes obtenidas para las mismas partículas pero después del ensayo de liberación. Las partículas conservan superficie irregular y agrietada. Se observan también varios puntos blancos cuya composición fue analizada por EDS. Los resultados indicaron un alto contenido de sodio, cloro, oxígeno y carbono, mientras que no se detectaron cantidades medibles de flúor, por lo cual la presencia de estos elementos puede atribuirse a las sales que conforman el medio de liberación utilizado.





**Figura 27.** Micrografías tomadas por SEM de las partículas *Eud-2min* antes (a y b) y después de ser expuestas a un medio acuoso (c y d).

#### 1.4.7.2.4 Análisis de FTIR

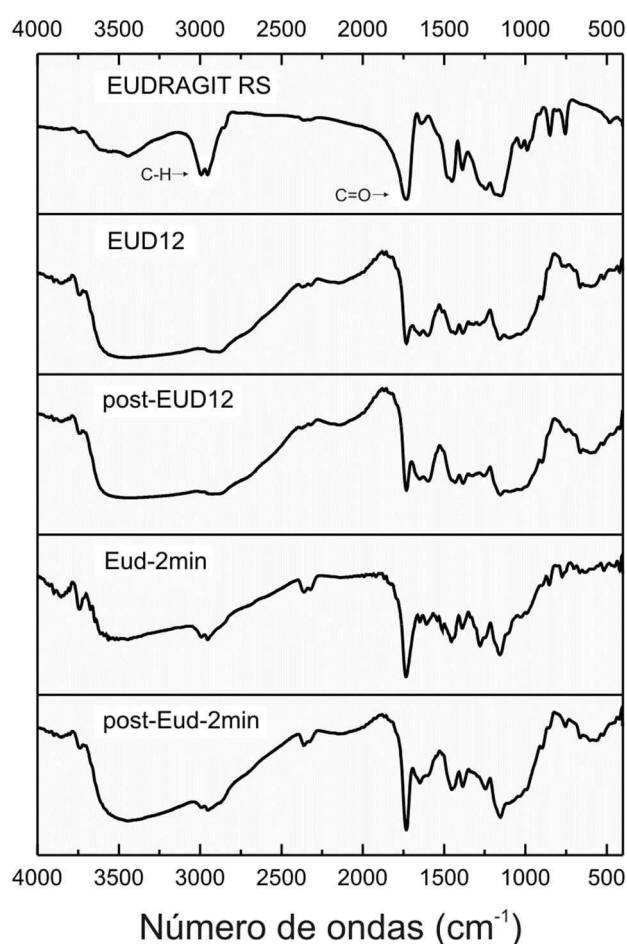
Se obtuvieron los espectros de absorción infrarroja de EUDRAGIT® RS, las partículas recubiertas por lecho fluidizado con 12 % de EUDRAGIT® (EUD12) y por inmersión durante 2 minutos (*Eud-2min*). Además, con el fin de estudiar como el recubrimiento es afectado al ser expuesto a un medio de liberación, se sometió al mismo ensayo a ambas partículas luego de ser sumergidas en agua durante 24 horas (*post-EUD12* y *post-Eud-2min*). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 28.

El espectro del polímero de recubrimiento muestra los picos esperados para el metacrilato. Se observan señales a 2986 y 2953  $\text{cm}^{-1}$  típicos del estiramiento de enlaces C-H en  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$ , el pico angosto en 1735  $\text{cm}^{-1}$  es característico del estiramiento del grupo carbonilo

[82]. Además, en la región comprendida entre 1500 y 1000  $\text{cm}^{-1}$  se presentan las bandas debidas a la absorción asimétrica del enlace C-H de  $\text{CH}_3$  y  $\text{CH}_2$  (1385 y 1460  $\text{cm}^{-1}$ ) y a los estiramientos simétricos y asimétricos de los enlaces C-O-C (1150 y 1246  $\text{cm}^{-1}$ ).

Las muestras fueron liofilizadas antes de ser sometidas a este estudio, sin embargo, es posible que haya una baja proporción de agua que podría aportar una señal en la zona entre 3200 y 3700  $\text{cm}^{-1}$  atribuibles a las oscilaciones de los grupos O-H.

Todas las partículas recubiertas presentan, además de los picos característicos del CS, la banda a 1735  $\text{cm}^{-1}$  propia del EUDRAGIT® RS lo cual indicaría, sumada a la evidencia aportada por los estudios de SEM, que el polímero de recubrimiento se adhiere a las partículas y permanece formando una película incluso después de ser sometido a un medio acuoso.



**Figura 28.** Espectros FTIR del polímero de recubrimiento (EUDRAGIT® RS) y de las partículas recubiertas por lecho fluido (EUD12) y por inmersión (Eud-2min).

### 1.4.7.2.5 Ensayo de liberación de fluoruro

La metodología utilizada para realizar los ensayos de liberación para estas partículas fue la adoptada para el resto de los ensayos llevados a cabo anteriormente. Se tomó como valor 100 % a la masa de fluoruro liberada luego de 48 h de iniciado el ensayo. En la Figura 29 se muestran los resultados obtenidos para las partículas recubiertas por inmersión en EUDRAGIT® a diferentes tiempos y se comparan con la curva de liberación obtenida a partir de las partículas sin recubrir (C-f).

Se observan marcadas diferencias entre los tres perfiles de liberación obtenidos. Mientras que en C-f se observó el efecto *burst*, en las partículas recubiertas por inmersión, la liberación de fluoruro se ve atenuada y este efecto se ve aumentado cuando aumenta el tiempo de incubación en el polímero de recubrimiento. En los primeros 15 min de ensayo las partículas C-f habían liberado más del 65 % de la carga total de fluoruro, mientras que para las partículas recubiertas (Eud-1min y Eud-2min) los valores fueron menores a 40 %. Con el transcurso del ensayo las diferencias entre los perfiles aumentan y luego de 5 horas las partículas C-f liberaron la totalidad del principio activo mientras que Eud-1min y Eud-2min liberaron 79,15 y 58,52 %, respectivamente.

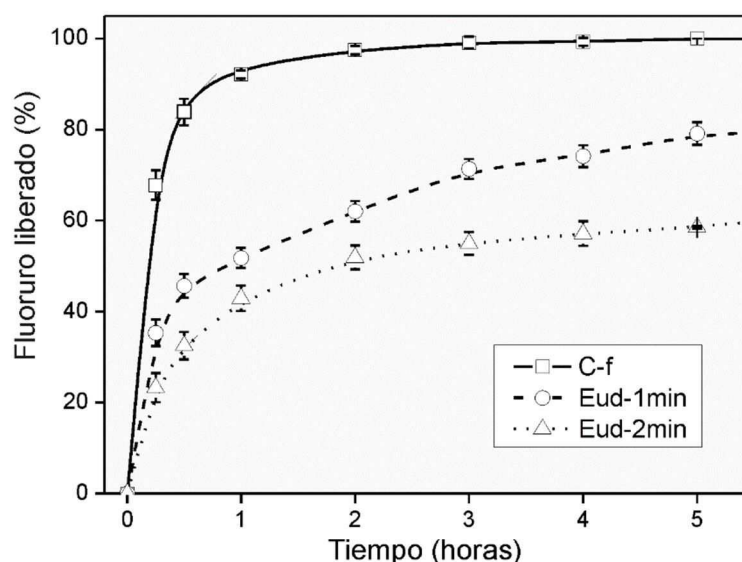


Figura 29. Perfiles de liberación obtenidos para las partículas C-f, Eud-1min y Eud-2min.

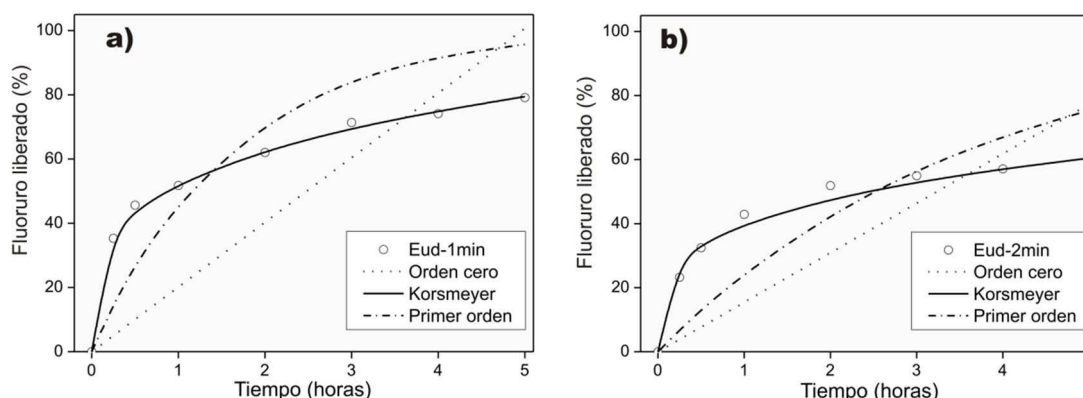
Se caracterizó la cinética de liberación de las partículas recubiertas utilizando modelos cinéticos de orden cero, Korsmeyer-Peppas y primer orden [81] descritos en la introducción de

esta tesis. Utilizando la funcionalidad “solver” del software Excel 2010 (microsoft) y OriginPro 8 (OriginLab) se obtuvieron los parámetros característicos de estos tres modelos, el coeficiente de determinación  $r^2$  y el AIC. Estos resultados se muestran en la Tabla 13 [85].

**Tabla 13. Parámetros de los modelos aplicados a las curvas de liberación de las partículas recubiertas por inmersión**

	<i>Eud-1min</i>			<i>Eud-2min</i>		
	<i>Orden cero</i>	<i>Korsmeyer</i>	<i>Primer orden</i>	<i>Orden cero</i>	<i>Korsmeyer</i>	<i>Primer orden</i>
k	0,201	0,524	0,631	0,154	0,399	0,281
n	-	0,258	-	-	0,258	-
$r^2$	0,092	0,997	0,662	0,028	0,9788	0,565
AIC	-5,781	-53,473	-12,326	-9,674	-39,414	-13,016

Para los dos tiempos de recubrimientos estudiados el modelo de orden cero no tuvo un ajuste apropiado a los datos experimentales, esto se observa en el valor bajo de  $r^2$  y en la Figura 30, en la cual se graficaron los valores de liberación medidos frente a los predichos por los modelos ajustados. Esta falta de ajuste indica que el fenómeno de liberación no es independiente de la concentración del fluoruro en las partículas. Por otro lado, los modelos de primer orden presentaron un  $r^2$  algo más elevado (entre 0,55 y 0,67) y un valor de AIC más bajo, sin embargo el modelo de Korsmeyer-Peppas es el que mejor ajusta los datos experimentales con  $r^2 > 0,97$  y un AIC muy inferior al obtenido para los otros dos modelos.



**Figura 30. Perfiles de liberación obtenidos para las partículas recubiertas por inmersión durante 1 (a) y 2 min (b) y los perfiles estimados por los modelos aplicados.**

Analizando los parámetros obtenidos para la ecuación de Korsmeyer-Peppas se puede observar que la constante  $k$  es superior cuando el recubrimiento se aplicó solamente durante un minuto, lo cual se ve reflejado en una liberación más rápida. Por otro lado el exponente de liberación ( $n$ ) se mantuvo constante (0,258) al cambiar el tiempo de exposición de las partículas al polímero.

Cuando el valor  $n$  es 0,5 la liberación del fármaco sigue un mecanismo de difusión de tipo Fickiano o transporte *Caso I*. Una difusión anómala o no Fickiano se produce cuando los valores son mayores que 0,5 y menores de 1. En los casos donde el sistema de liberación es un material poroso, la constante  $n$  puede tomar valores menores que 0,5, debido a que se combinan los mecanismos de difusión parcial a través de la matriz o la capa de recubrimiento y a través de poros o grietas llenos de agua [107]. Las micrografías obtenidas por SEM de las partículas recubiertas por inmersión muestran que el polímero está depositado sobre la superficie de las partículas de manera irregular generando una superficie agrietada, por lo cual el proceso de migración del fluoruro puede producirse tanto a través del polímero como por las fisuras lo que se refleja en el valor  $n$  obtenido en el modelo de Korsmeyer-Peppas.

El EUDRAGIT® RS es un copolímero de etil acrilato, metil acrilato y un bajo contenido de ácido metacrílico con grupos de amonio cuaternario presentes como sales. Estas sales aumentan la permeabilidad de los films conformados por este polímero en medios acuosos [108,109]. En la bibliografía existen numerosos trabajos en los cuales se han aplicado recubrimientos basados en EUDRAGIT® RS para lograr liberación sostenida durante varias horas de principios activos farmacéuticos como prednisolona [31], oximatrina [110], diclofenac sódico [111] o ambroxol [56]. En la presente tesis se han utilizado formulaciones de recubrimiento similares a las que se usaron en estos trabajos respetándose la relación masa de recubrimiento/masa de partículas. Sin embargo, cuando se aplicó el recubrimiento mediante aspersion, los perfiles de liberación obtenidos muestran que en los primeros minutos de transcurridos los ensayos la mayoría de la carga del principio activo se libera al medio.

La razón de la diferencia entre las cinéticas de liberación puede atribuirse a dos factores: por un lado las partículas C-f poseen un tamaño de entre 200 y 300  $\mu\text{m}$  mientras que las partículas desarrolladas en los trabajos citados poseen tamaños entre 800 y 1000  $\mu\text{m}$  por lo cual la superficie específica de C-f es mayor y como consecuencia a igual relación masa de recubrimiento/masa de partículas, el grosor de la capa de recubrimiento en las

partículas más grandes será mayor que en las partículas pequeñas. Por otro lado las solubilidades en medios acuosos de pH neutro de la prednisolona (0,223 g/l), diclofenaco sódico (4,82 g/l), ambroxol (0,018 g/l) y oximetrina (0,494 g/l) son muy inferiores a la solubilidad del fluoruro de sodio (20,949 g/l). Por este motivo puede plantearse que la difusividad de estos principios activos es muy inferior a la de la droga utilizada en la presente tesis y por lo tanto esto puede explicar que la velocidad de liberación sea mayor.

Al aplicarse el recubrimiento por inmersión se logró un mayor control en la liberación del principio activo. Si bien los resultados obtenidos por FTIR muestran que por las dos metodologías se logra formar un film en la superficie de las partículas, las micrografías obtenidas por SEM denotan que el espesor de la capa formada cuando las partículas son inmersas en la solución de EUDRAGIT® poseen un espesor mayor que el obtenido por aspersion, lo cual explica el mejor control en la liberación.

## ***1.5 Conclusiones parciales***

Se obtuvieron las condiciones experimentales que permitieron la inclusión de NaF en partículas de CS utilizando la tecnología de lecho fluido.

Se elaboraron partículas de CS-NaF variando los componentes de la formulación y se caracterizaron por FTIR, análisis granulométrico, microscopía electrónica de barrido y la liberación del fluoruro mediante métodos potenciométricos.

En primera instancia se utilizó el CS sin tratamiento previo y luego estudió la incorporación de un ácido débil en la formulación de las partículas para incrementar la interacción entre el CS y el fluoruro. Si bien las partículas se pudieron procesar sin inconvenientes obteniéndose buenos valores de secado y eficiencia de inclusión del fluoruro de sodio, los perfiles de liberación obtenidos mostraron que durante los primeros 15 min la mayoría del fluoruro incluido era liberado al medio.

También se estudió el efecto de separación por tamaño del CS antes de procesarlo en el lecho fluido y se observó que las partículas de tamaño menor a 75  $\mu\text{m}$  presentaron grandes aglomerados indeseados. Por otro lado, cuando la granulometría fue más grande el procedimiento pudo ser llevado a cabo sin ningún inconveniente. Los perfiles de liberación de fluoruro también fueron rápidos en los primeros minutos.

Se ensayó la aplicación de recubrimientos de PVP (soluble en agua) y EUDRAGIT® RS (insoluble en agua) por lecho fluido sobre las partículas de CS-NaF. Los resultados de FTIR y SEM muestran que se logró aplicar una película polimérica pero la liberación también fue acelerada.

También se realizó un recubrimiento por EUDRAGIT® RS por inmersión. En estas condiciones la liberación de fluoruro fue lenta y la velocidad dependía del tiempo de exposición de las partículas a la solución del polímero.

Finalmente se ajustaron los valores de la curva de liberación el API obtenidos para las partículas recubiertas por inmersión a modelos cinéticos de orden cero, Korsmeyer-Peppas y primer orden. El modelo de Korsmeyer-Peppas fue el que mejor se ajustó a los valores medidos y el exponente de este modelo corresponde a un efecto de liberación mixto a través de la capa polimérica y los poros de ésta.



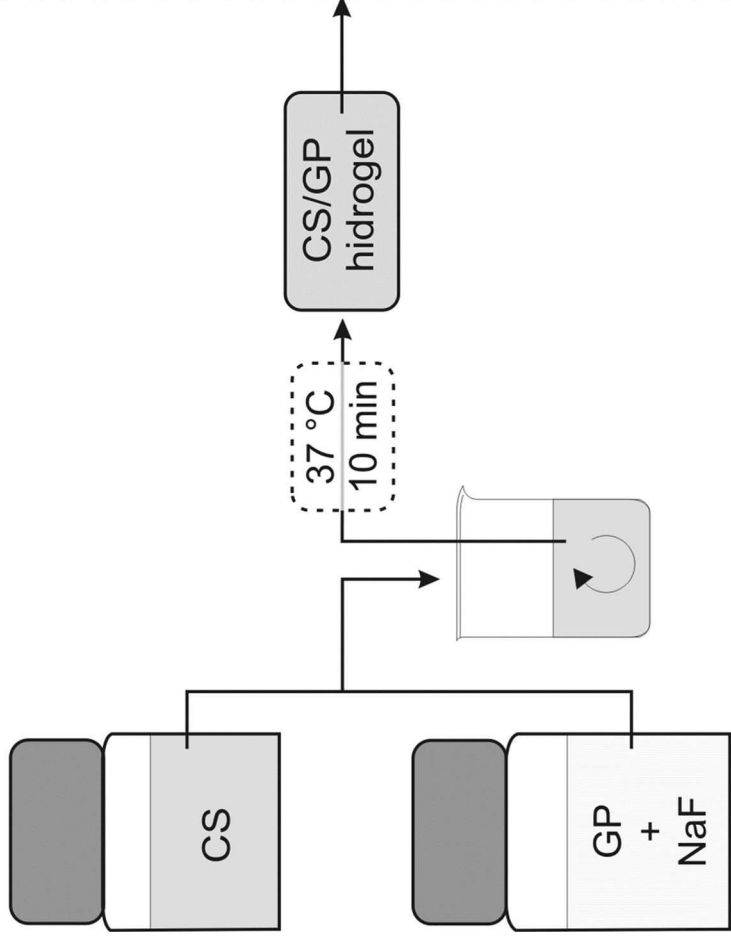
## Capítulo 2

# Hidrogeles de CS-GP



## Caracterización de los hidrogeles

- Estabilidad en diferentes pHs
- FTIR
- SEM
- Reología
- DRX
- Ensayo de liberación del API
- Cinética de liberación



## Capítulo 2 – Hidrogeles de CS-GP

### 2.1 Introducción

Los hidrogeles de CS -  $\beta$ -glicerofosfato (GP) han sido ampliamente estudiados para la liberación de principios activos en vías parenterales. Sin embargo no se han reportado trabajos que propongan a este sistema como matriz para su aplicación por vía enteral. Una forma farmacéutica suministrada de manera oral atraviesa ambientes que poseen diferentes condiciones, por ejemplo la variación de pH, de ácidos a neutros, por lo cual es necesario contemplar estas variables para evaluar la factibilidad de una matriz para este uso.

En el desarrollo de este capítulo se realizó una caracterización físico-química de geles de CS – GP con el objeto de utilizarlos como matriz para la liberación de fluoruro por vía enteral. Se realizaron ensayos de estabilidad a diferentes pH, se estudió la estructura y composición de la matriz en diversas condiciones por FTIR (espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier), SEM (microscopía electrónica de barrido), DRX (difracción de rayos X) y estudios reológicos, y la liberación de la droga modelo en medios con diferentes condiciones.

### 2.2 Objetivos

Los objetivos planteados en este capítulo de la tesis son los siguientes:

- Estudiar la estabilidad de los geles de CS–GP en medios con diferentes pH.
- Caracterizar los geles de CS-GP.
- Estudiar la liberación de NaF a partir de geles de CS-GP en diferentes medios.

### 2.3 Materiales y métodos

#### 2.3.1 Materiales

El  $\beta$ -glicerofosfato de sodio fue provisto por Surfactan (Argentina). El resto de los reactivos necesarios fueron los mismos que los utilizados en el capítulo anterior. La composición de las soluciones amortiguadoras de pH utilizadas en este capítulo se detalla la Tabla 14.

**Tabla 14. Composición de las soluciones amortiguadoras de pH. Cantidades necesarias para formular 1000 mL de solución.**

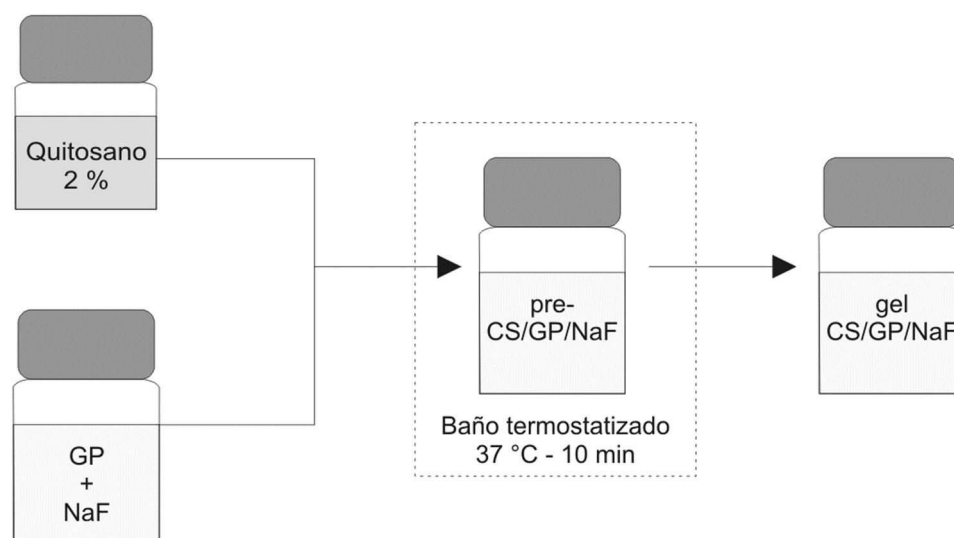
pH	KCl (g)	C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> KO <sub>4</sub> (g)	HCl 0,1 M (mL)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g)	NaOH 0,1 M (mL)	Agua
2	3,725	-	130	-	-	c.s.p.
3	-	10,21	223	-	-	c.s.p.
4	-	10,21	1	-	-	c.s.p.
5	-	10,21	-	-	226	c.s.p.
6	-	-	-	6,81	56	c.s.p.
7	-	-	-	6,81	291	c.s.p.

## 2.3.2 Métodos

### 2.3.2.1 Preparación de los geles de CS-GP

Los geles fueron preparados de acuerdo al trabajo de Mengatto y col, 2016 [39]. Brevemente, 3 mL de una solución 2 % p/p de CS y 0,14 M de ácido acético se mezclaron con 1 mL de una solución de GP (35 % p/p). El NaF fue incluido en la solución de GP. Estas mezclas se denominaron pre-CS/GP y pre-CS/GP/NaF según contuvieran o no al principio activo.

Finalmente, la transición sol-gel (conformación de un gel a partir de una solución líquida) se logró colocando estas mezclas en un baño de agua termostaticado a 37 °C por 10 min. En la Figura 31. se muestra un esquema de la preparación de los geles.



**Figura 31. Esquema de la preparación de geles CS/GP/NaF.**

### **2.3.2.2 Estabilidad de los geles a diferentes pH**

Con el fin de estudiar la estabilidad de los geles en medios de distinto pH, 500 mg de gel preformado, con y sin NaF, fueron sumergidos en 50 mL de una solución amortiguadora a 37 °C (el rango de pH fue de 2 a 7). Se observó la integridad macroscópica de los geles durante 6 días y se tomaron fotografías a diferentes intervalos de tiempo.

### **2.3.2.3 Estudios de espectroscopía infrarroja**

Se estudiaron los espectros de absorción infrarroja de los componentes utilizados en el desarrollo y de los geles en diferentes condiciones mediante un equipo de la marca Shimadzu modelo FTIR-8201PC. Se utilizó el método de discos de KBr para el cual se mezclaron 2 mg del analito (previamente liofilizado durante 24 h) con 100 mg de KBr. Luego, una alícuota de la mezcla fue prensada para formar un disco. Los espectros se fueron obtenidos en el rango de 4000  $\text{cm}^{-1}$  hasta 400  $\text{cm}^{-1}$ .

### **2.3.2.4 Ensayos de liberación**

Para la realización de los ensayos de liberación del fluoruro incluido en los hidrogeles, 400 mg de gel preformado en una sonda orogástrica de pvc (medida k33) fueron dispensados en 50 mL de una solución amortiguadora (de pH de 4 a 7). A diferentes intervalos de tiempo se tomaron muestras de 1 mL que fueron repuestas con igual volumen de medio fresco. El ensayo se llevó cabo en un agitador orbital a 100 rpm en una estufa termostaticada a 37 °C. Cada determinación se realizó por triplicado y los resultados fueron expresados como el promedio  $\pm$  e.s. (error estándar) del fluoruro porcentual acumulado liberado a cada intervalo de tiempo.

En este tipo de ensayos es importante lograr la condición de sumidero, donde la concentración del principio activo en el medio al final del ensayo ( $[\text{NaF}]_{\text{max}}$ ) no sea superior al 10 % de la concentración de saturación del API en el mismo medio ( $[\text{NaF}]_{\text{sat}}$ ) [112]. En primera instancia se determinó la solubilidad del NaF en los 4 medios utilizados. Para esto se colocó 1 gr de NaF en 10 mL de medio y se lo sometió a sonicado durante 15 minutos. Luego, se tomó una alícuota de sobrenadante y se determinó la concentración de fluoruro. En todos los casos la solubilidad fue cercana al 2 % p/p. Teniendo en cuenta que la masa de gel utilizada para estos ensayos fue aproximadamente 400 mg, la relación  $[\text{NaF}]_{\text{sat}}/[\text{NaF}]_{\text{max}}$  es en todos los casos mayor a 80, por lo cual la condición de sumidero fue alcanzada en todos los casos.

### **2.3.2.5 Microscopía electrónica de barrido**

Se tomaron micrografías de los geles mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Para tal fin los geles fueron congelados con nitrógeno líquido, fracturados mecánicamente con una espátula, colocados sobre una hoja de aluminio y posteriormente fueron liofilizados. El instrumental utilizado para tomar las imágenes fue detallado en el capítulo 1.

### **2.3.2.6 Mediciones reológicas**

Con el fin de estudiar el comportamiento reológico de los geles expuestos a diferentes condiciones, se realizaron barridos de deformación y frecuencia utilizando una celda de platos paralelos (20 mm, 1 mm de espacio) (Figura 32). Las mediciones reológicas de los geles fueron obtenidas utilizando un reómetro Haake RheoStress RS80 rheometer (Haake Instruments Inc., Paramus, NJ, USA). La temperatura de la muestra se mantuvo a 37 °C durante los ensayos mediante la calefacción del equipo con un baño de circulación de agua. Los ensayos fueron llevados a cabo por triplicado [113].

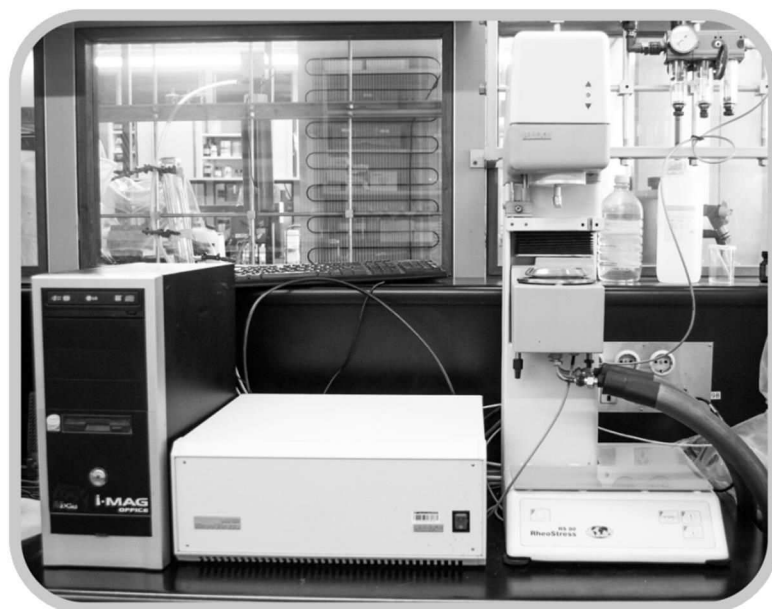


Figura 32. Reómetro Haake RheoStress RS80 rheometer (Haake Instruments Inc., Paramus, NJ, USA).

### **2.3.2.7 Difracción de rayos X**

Los patrones de difracción de las diferentes muestras se obtuvieron utilizando un difractómetro Shimadzu XD-D1 con monocromador usando radiación Cu-K $\alpha$  ( $\lambda = 1.542 \text{ \AA}$ ) a 30 kV y 40 mA (Figura 33). La velocidad de barrido fue de  $2^\circ \text{ min}^{-1}$  y un rango  $2\Theta = 15^\circ\text{-}50^\circ$ . Los resultados obtenidos fueron comparados con la base de datos de difracción de polvos provista por el software LOGIC.



Figura 33. Difractómetro Shimadzu XD-D1.

### ***2.3.2.8 Determinación del contenido de sodio en muestras acuosas***

Se cuantificó la liberación de sodio a partir de los geles CS/GP sumergiendo aproximadamente 500 mg del gel en un recipiente con 50 mL de agua destilada. Se tomaron alícuotas a diferentes intervalos de tiempo y se repusieron con agua destilada. El contenido del analito en las muestras tomadas se determinó en un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer Analyst 800.

## 2.4 Resultados

### 2.4.1 Estabilidad de los geles a diferentes pH

Mezclas de las soluciones de CS y GP, con y sin NaF (pre-CS/GP/NaF y pre-CS/GP respectivamente) en las condiciones que se declaran en la sección de materiales y métodos de este capítulo se cargaron dentro de una sonda orogástrica. Luego fueron colocadas en un baño termostático a 37 °C por 10 min para lograr que se conforme el gel. Finalmente fueron expuestas a medios en un rango de pH de 2 a 7 a 37 °C y se tomaron fotografías en el tiempo para registrar su evolución macroscópica en cada una de las condiciones ensayadas. La Figura 34 muestra una fotografía de un gel luego de ser expulsado de la sonda.



Figura 34. Fotografía de CS/GP conformado en una sonda orogástrica.

Los geles que fueron expuestos a medios con pH 2 comenzaron a desagregarse a los 5 min de comenzado el ensayo y luego de 30 min se habían disuelto totalmente. Un proceso similar ocurrió con los geles expuestos a pH 3 pero la disolución completa se observó luego de 40 min de exposición al medio. En contraposición, los geles fueron estables durante más de 6 días cuando el pH del medio era entre 4 y 7. En la Figura 35 se muestra la evolución temporal de este ensayo.

Se puede plantear que este comportamiento de los geles está relacionado con la alta presencia de grupos catiónicos del CS a lo largo de su cadena. Éstos son propensos a ser protonados en medios ácidos, aumentando la polaridad del compuesto y el grado de repulsión electrostática polímero-polímero. En medios con pH bajo estos fenómenos gobiernan por sobre las interacciones hidrofóbicas que conforman al gel, por lo tanto la matriz se disgrega en éstas condiciones.

Es destacable que la acidez de los medios fue medida después de terminada el ensayo y en ningún caso varió más de 0,1 unidades. El comportamiento de estos hidrogeles no se vio modificado por la presencia de NaF en su formulación.

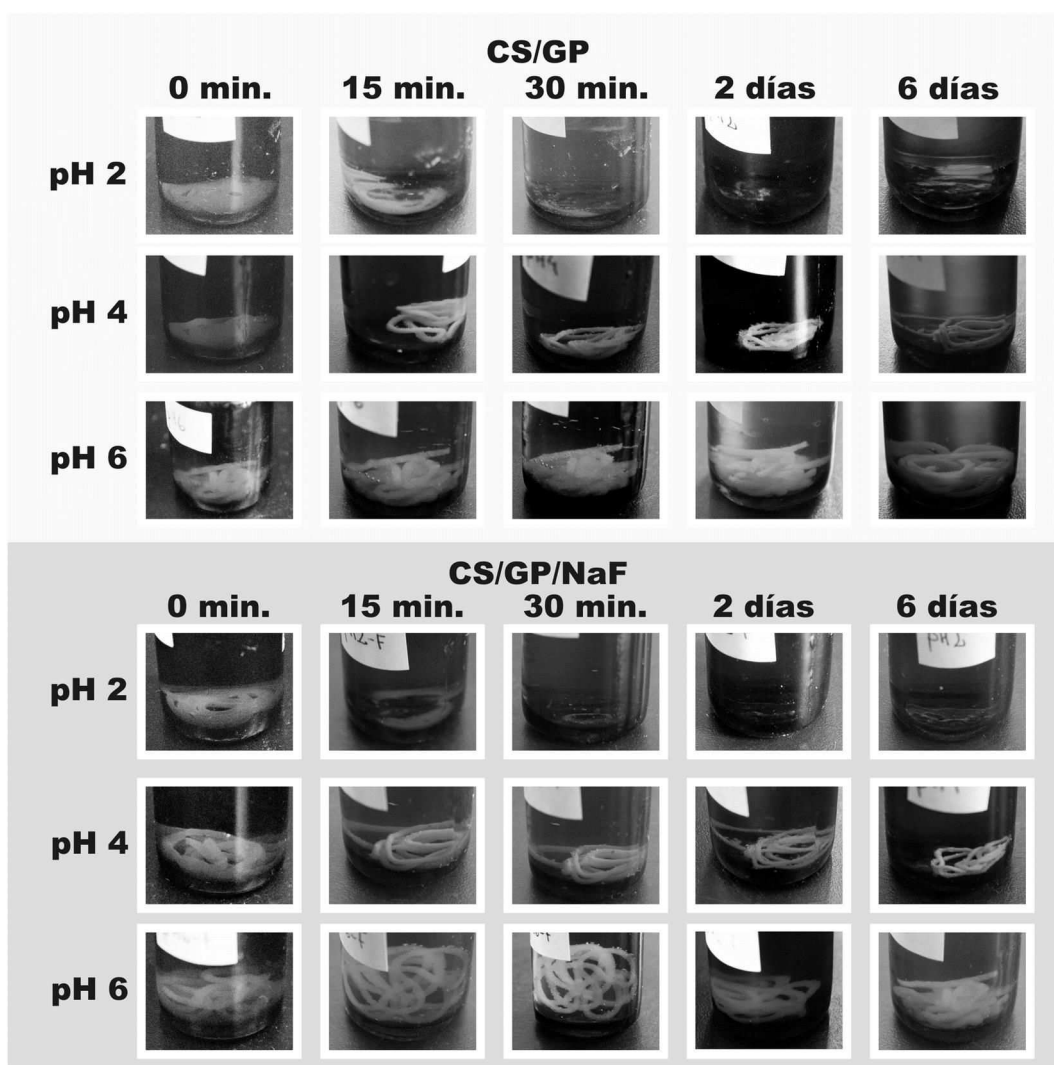


Figura 35. Evolución temporal de CS/GP y CS/GP/NaF expuestos a medios de diferente pH.



### 2.4.2 Estudios de espectroscopia infrarroja

Se obtuvieron los espectros infrarrojos del CS, del GP y de los geles con y sin NaF (CS/GP/NaF y CS/GP respectivamente) antes y después de ser expuestos a agua destilada por 24 h (CS/GP-24h). Los resultados se expresan en la Figura 36.

Las anchas bandas de absorción en el rango comprendido entre 3600 y 3000  $\text{cm}^{-1}$  centradas en aproximadamente 3400  $\text{cm}^{-1}$  presentes en CS, CS/GP, CS/GP/NaF y CS/GP-24h son el resultado de la sobreposición de las vibraciones de estiramiento de los grupos -OH y -NH. Los espectros correspondientes al GP también presentan una banda de absorción ancha en la misma región atribuibles a las oscilaciones -OH. Estos grupos se encuentran involucrados en la formación de puentes hidrógeno inter y/o intra moleculares, los que juegan un rol importante en la transición sol-gel. Dos picos a 1643 y 1591  $\text{cm}^{-1}$  relacionados a las vibraciones de estiramiento C=O en los grupos amida primarios y a las oscilaciones de los  $\text{NH}_2$  se observan en el espectro del CS. En los espectros CS/GP, CS/GP/NaF y CS/GP-24h el pico a 1591  $\text{cm}^{-1}$  muestra un ligero corrimiento hacia 1550  $\text{cm}^{-1}$ . Este efecto puede estar relacionado a la protonación de los grupo amino del CS o a la interacción de éstos grupos con los fosfatos del GP [114,115].

Un pico característico del grupo  $-\text{PO}_4^-$  a 980  $\text{cm}^{-1}$  y una banda a 780  $\text{cm}^{-1}$  (debido al estiramiento alifático de -P-O-C, se observan en los espectros de GP, CS/GP/NaF y CS/GP. Es destacable que el espectro de los geles luego de ser acondicionados en agua (CS/GP-24h), no muestra los picos relacionados al grupo fosfato, lo cual puede atribuirse a que el GP se disolvió en el medio acuoso durante el proceso. Esta idea se sustenta también en que el espectro obtenido para CS/GP-24h muestra solamente las bandas características del CS.

Este ensayo se llevó a cabo con el fin de identificar la presencia de diferentes grupos funcionales y las posibles interacciones de los componentes del gel, entre ellas la interacción electrostática entre el CS y el fluoruro. Esta fue reportada como un disminución en la intensidad relativa del pico relacionado al  $\text{NH}_2$  (1591 o 1550  $\text{cm}^{-1}$ ) [100]. Los resultados de FTIR obtenidos no muestran esta evidencia por lo cual puede suponerse que esta interacción no está presente o no pudo ser detectada con esta técnica.

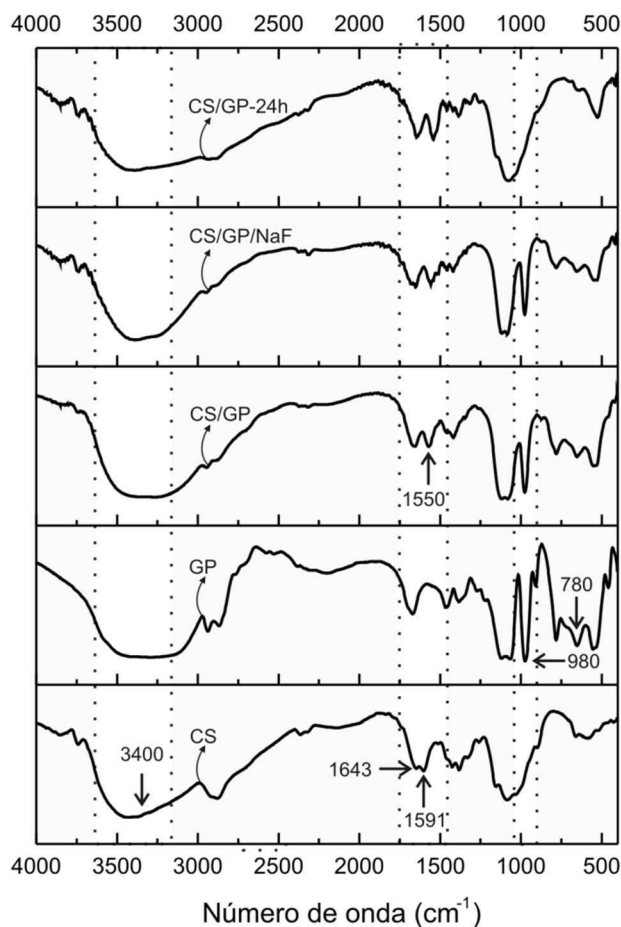


Figura 36. Espectros de FTIR de quitosano (CS), GP, geles con y sin NaF (CS/GP/NaF y CS/GP respectivamente y geles luego de estar sumergido en agua durante 24 h (CS/GP-24h).

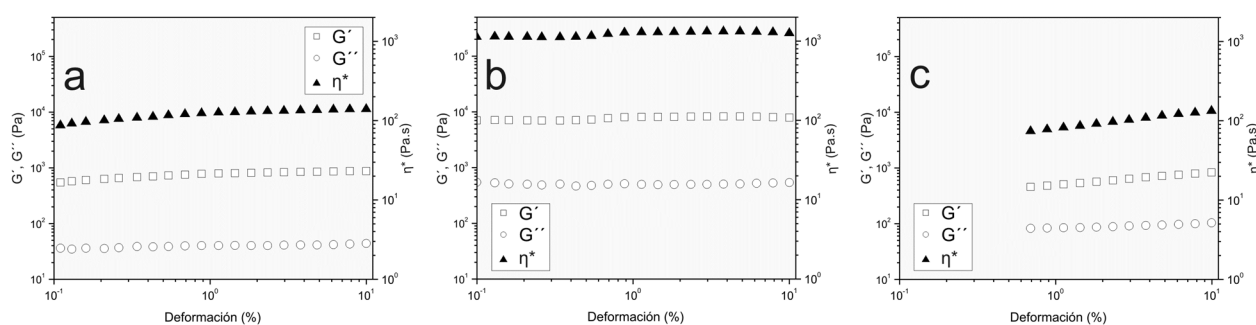
### 2.4.3 Mediciones reológicas

El comportamiento reológico de geles luego de recibir diferentes tratamientos fue estudiado con el fin de determinar cómo los diferentes entornos modifican su estructura. Los ensayos fueron realizados en geles sin tratamiento previo (CS/GP/NaF), luego de ser sumergidos 5 min en un medio de pH 2 (CS/GP/NaF-pH2) o 24 h en un medio de pH 6 (CS/GP/NaF-pH6). Estas condiciones fueron elegidas teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el ensayo de estabilidad de los geles.

El módulo de almacenamiento ( $G'$ ) es una medida de la energía almacenada y recuperada durante el ciclo de deformación (componente elástico). Por otro lado, el módulo de pérdida ( $G''$ ) es una medida de la energía disipada o perdida como calor luego de cada ciclo de

deformación (componente viscoso) [116]. En el corriente trabajo se realizaron barridos de deformación y de frecuencia y en cada ensayo se midieron la viscosidad compleja ( $\eta^*$ ),  $G'$  y  $G''$ .

En este tipo de ensayo oscilatorio las tres variables seleccionadas son medidas en función de un incremento de la deformación con una frecuencia fija. El objetivo es determinar el punto crítico en el cual  $G'$  y  $G''$  se vuelven dependientes de la deformación aplicada, es decir, para determinar si en el rango de deformación estudiado las muestras se encuentran en la región viscoelástica lineal [117].



**Figura 37. Barrido de deformación de CS/GP/NaF sin tratamiento previo (a), luego de 24 h en un medio de pH 6 (b) y luego de 15 min en un medio de pH 2 (c).**

Se realizó un ensayo de barrido de deformación en el rango de 0,1 a 10 % a una frecuencia de 1 Hz. Se observa que los tres geles se encuentran en la región viscoelástica lineal, en el rango de deformación estudiado (Figura 37). En el caso de CS/GP/NaF-pH2 (Figura 37.c), no se graficaron los resultados obtenidos para deformaciones menores a 0,7 % ya que no se pudo obtener una respuesta del reómetro debido a que el torque mínimo aplicado por el equipo era demasiado grande, dando resultados erráticos.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se realizó un análisis de barrido de frecuencia de 0,1 a 100 Hz con una deformación constante del 2%. La Figura 38 muestra que a bajas frecuencias todos los geles tienen un comportamiento de gel ( $G'$  mayor que  $G''$ ) [118]. Según Schorsch y col. (1997) la categoría de “gel verdadero” puede asignarse a geles donde relación  $G'/G''$  es mayor a 10; tal condición se cumple para CS/GP/NaF y CS/GP/NaF-pH6 (Figura 38.a y b) [119]. En contraposición, aunque CS/GP/NaF-pH2 mostró un carácter predominantemente elástico,  $G'/G''$  fue menor que 10, por lo cual no puede categorizarse como “gel verdadero” (Figura 38.c).

La viscosidad compleja en CS/GP/NaF y CS/GP/NaF-pH2 fue al menos un orden de magnitud menor que en CS/GP/NaF-pH6. El GP puede actuar como plastificante o reducir las

interacciones CS/CS [118,120]. Es por esto que el aumento de la viscosidad compleja puede atribuirse a la disminución del contenido de GP en geles, el cual migró al medio acuoso de acondicionamiento de 24 h, lo que se observa en el análisis de FTIR.

A frecuencias mayores  $G'$  y  $\eta^*$  disminuyen mostrando un punto de inflexión luego del cual las tres variables estudiadas aumentan. Este comportamiento puede estar relacionado a una ruptura de la estructura del hidrogel y un posterior acomodamiento de las cadenas poliméricas conformando una nueva estructura. Es destacable que este punto de inflexión o ruptura sucede a 10 Hz en CS/GP/NaF y CS/GP/NaF-pH6 mientras que en CS/GP/NaF-pH2 ocurre a aproximadamente 3 Hz. Si se analizan de manera conjunta los resultados obtenidos en el estudio de la estabilidad y en los geles a distintos pH los barridos de deformación y frecuencia puede plantearse que la estructura del gel se debilita cuando es expuesta a un medio altamente ácido.

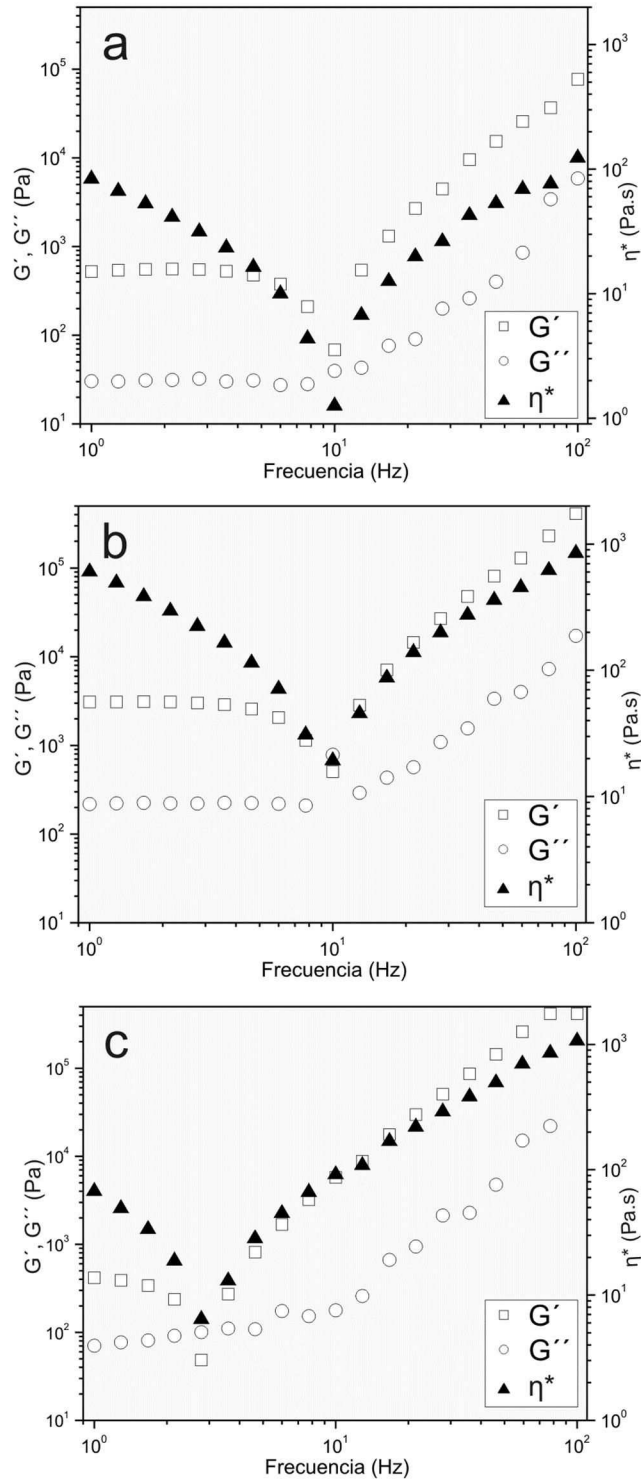


Figura 38. Barrido de frecuencia de CS/GP/NaF sin tratamiento previo (a), luego de 24 h en un medio de pH 6 (b) y luego de 15 min en un medio de pH 2 (c).

#### **2.4.4 Microscopía electrónica de barrido**

Mediante microscopía electrónica de barrido se puede observar la estructura superficial de materiales inorgánicos y orgánicos. Con el objeto de estudiar la morfología de los geles en diferentes condiciones, se realizaron micrografías de CS/GP con dos concentraciones distintas de fluoruro de sodio y de éstos luego de ser expuestos a un medio acuoso por 24 h.

Las Figura 39.a y b muestran las imágenes obtenidas de geles con 2,5 % p/p y 0,625 % p/p de NaF respectivamente. Se denota en ambas imágenes la presencia de cristales de aproximadamente 4  $\mu\text{m}$  (detallados en la Figura 39.c), en mayor proporción en los geles con concentración más elevada de NaF. Mediante EDS se determinó que estos cristales tienen una concentración de flúor cercana al 30 % por lo cual se estima que esta estructura pertenece al NaF.

Luego de ser sumergidos en un medio acuoso (Figura 39.d), no se observan los cristales de NaF y los geles están conformados por una matriz más abierta que antes de ser expuestas al medio acuoso. Esta diferencia puede atribuirse a la disolución del NaF y, en mayor medida, al GP presente en la matriz. Estos resultados apuntalan la hipótesis de que la matriz de los geles, luego de exponerse a un medio acuoso, queda conformada solo por CS.

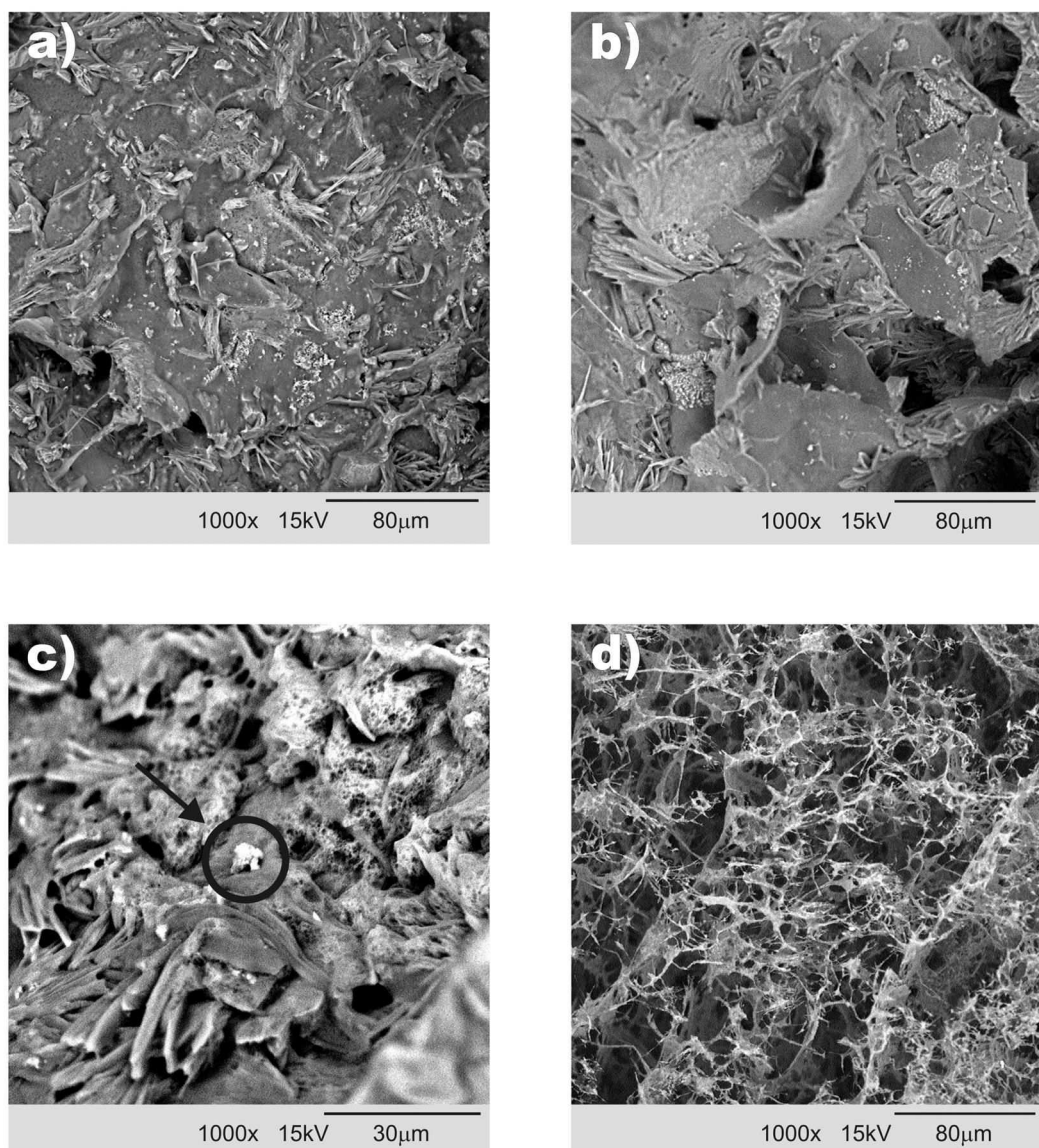


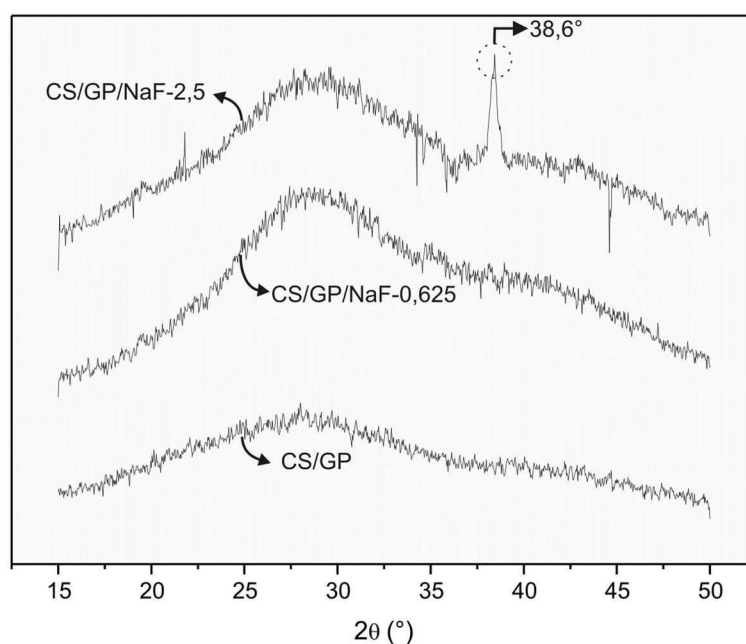
Figura 39. Micrografías obtenidas por SEM de geles CS/GP-NaF con 2,5 % (a), 0,625 % p/p de NaF (b y c) y CS/GP-NaF luego de ser expuestos a un medio acuoso por 24 h (d). En (c) se resalta la presencia de cristales de aproximadamente 4  $\mu\text{m}$ .

#### 2.4.5 Estudios de difracción de rayos X

Los estudios de difracción de rayos X brindan información que permite conocer las estructuras cristalinas de los analitos. Para llevar a cabo estos ensayos en los geles desarrollados en la presente tesis se optó por no secar muestra en el tratamiento previo a la determinación, de manera tal de conocer las estructuras cristalinas tal como se encuentran en los geles húmedos.

Se analizaron geles sin la incorporación de NaF (CS/GP) y con 0,625 y 2,5 % p/p del principio activo (CS/GPNaF-0,625 y CS/GPNaF-2,5 respectivamente). El gel CS/GP puede

considerarse como completamente amorfo debido al ancho halo que presenta y a la ausencia de picos típicos de estructuras cristalinas (Figura 40). Mientras que el patrón de difracción obtenido para CS/GPNaF-2,5 muestra un pico a un ángulo  $2\theta$  de  $38,6^\circ$ , el resultado obtenido para CS/GPNaF-0,625 no muestra picos atribuibles a estructuras cristalinas. El pico observado en CS/GPNaF-2,5, según la base de datos del software LOGIC puede relacionarse a estructuras cristalinas pertenecientes a NaF. Estos resultados muestran que no hay evidencia de estructuras cristalinas en CS/GPNaF-0,625, lo que puede ser atribuido a la baja concentración de NaF en la matriz.



**Figura 40. Difractograma de geles CS/GP con diferente concentración de NaF.**

Modrzejewska y col. (2014) realizaron estudios de DRX en geles de CS-GP obteniendo como resultado difractogramas muy diferentes a los mostrados en este trabajo [61]. Estas diferencias se deben principalmente a que en la presente tesis los geles no fueron secados antes de realizar el ensayo, mientras que en el trabajo citado los geles fueron liofilizados, lo cual explica que tanto el GP como el CS formen estructuras cristalinas.

#### ***2.4.6 Ensayos de liberación del principio activo***

En el tracto gastrointestinal, el pH varía desde ácido en el estómago hasta neutro en el tracto intestinal inferior. Además, estos valores cambian según el estado de alimentación del



individuo y su condición de salud [121–123]. Con el fin de evaluar los hidrogeles de CS-GP como una matriz para la liberación controlada de fármacos en el tracto digestivo, se realizaron ensayos de liberación en medios de 4 valores diferentes de pH (4, 5, 6 y 7). Se estudiaron geles con una concentración de NaF de 0,625 y 2,5 % p/p (CS/GPNaF-0,625 y CS/GPNaF-2,5, respectivamente).

Los geles CS/GPNaF-0,625 mostraron una liberación sostenida de fluoruro durante al menos 6 horas. En este período la liberación fue menor al 70 %, exceptuando el perfil obtenido cuando el pH fue de 5 donde la liberación en ese lapso fue aproximadamente el 90 % (Figura 41.a). Similares resultados se obtuvieron para CS/GPNaF-2,5 aunque la fracción del principio activo liberado luego de 6 h fue sensiblemente menor (entre 40 % y 55 %) (Figura 41.b).

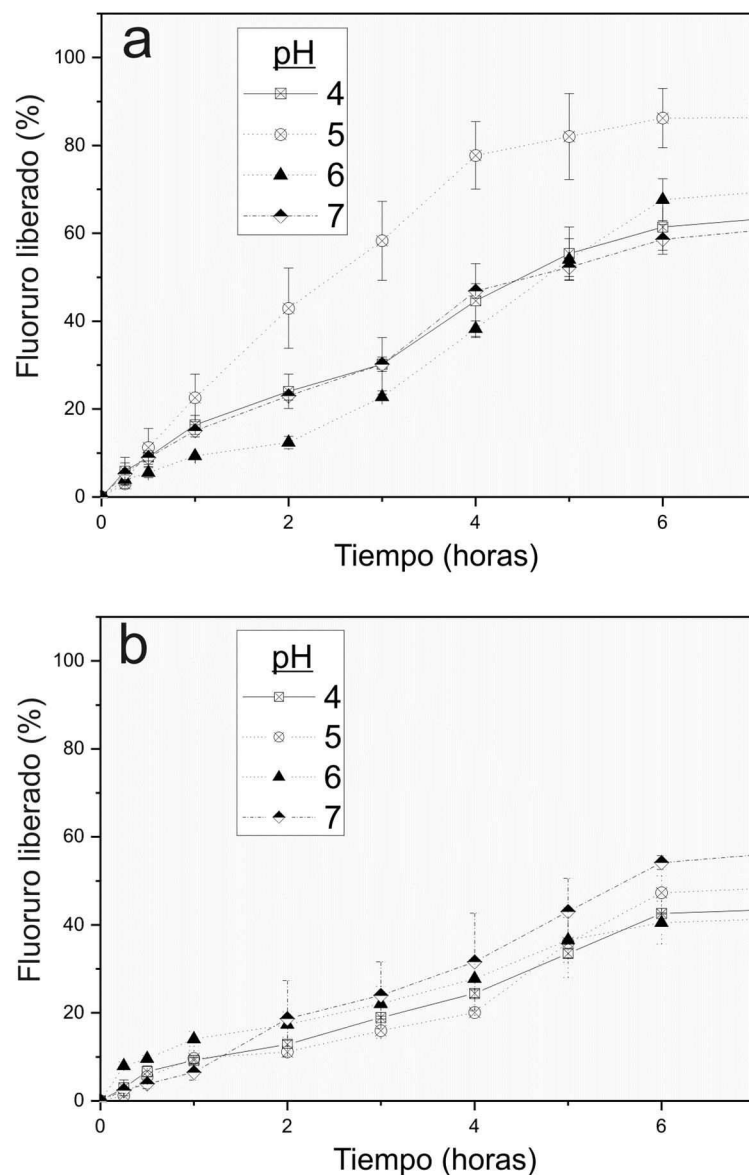


Figura 41. Curvas de liberación de fluoruro en medios de diferente pH desde geles CS/GP con 0,625 % p/p (a) y 2,5 % p/p de NaF (b).

Estos resultados muestran que los hidrogeles estudiados en este trabajo lograron una liberación sostenida de fluoruro estudiado durante 6 h en un amplio rango de pH sin la presencia de un marcado efecto *burst*. En contraste, matrices de CS desarrolladas en otros trabajos obtuvieron un perfil de liberación rápida en las primeras 3 h. Keegan y col. (2012) desarrollaron partículas de CS mediante secado por aspersión (*spray drying*) obteniendo un sistema con tiempos de liberación más cortos que los presentados en esta tesis [124]. Estos autores proponen que las partículas secas se humectan rápidamente y que el fluoruro situado cerca de la superficie se libera en un período corto de tiempo. Además, sostienen que el

principio activo remanente migra de manera más lenta debido a la formación de un gel en la capa externa de la matriz, lo cual reduce la hidratación en el centro de la partícula e incrementa la longitud del camino de difusión. Una matriz nanoparticulada basada en CS para la liberación controlada de fluoruro fue estudiada por Nguyen y col (2017). Este sistema también mostró una liberación rápida la cual puede verse explicada por la alta relación superficie/volumen de las nanopartículas [125].

La liberación sostenida de CS/GP/NaF no podría atribuirse a la interacción electrostática entre el CS y el fluoruro debido a que no se han podido observar los efectos de este fenómeno en los estudios de FTIR realizados. Los hidrogeles de CS/GP/NaF no fueron secados antes de la realización de las ensayos de liberación, por eso no existe un hinchamiento marcado cuando son sumergidos en un medio acuoso, por lo cual la tasa de liberación no podría ser explicada solo por el proceso de hidratación.

Peng y col. (2013) estudiaron la liberación de venlafaxina hidrocloreto, un principio activo hidrosoluble (5,17 % p/v) y de peso molecular medio (277 g/mol), desde un gel de CS/GP con una geometría de discos planos [65,126]. En ese trabajo se obtuvieron perfiles de liberación sostenida durante aproximadamente 30 horas, mayormente gobernada por procesos difusivos.

La liberación sostenida lograda en los hidrogeles puede deberse a que, en comparación a los sistemas particulados presentados, los hidrogeles CS/GP/NaF poseen relación superficie/volumen menor y a que la velocidad de difusión a través de la matriz de los geles es disminuida debido a la presencia de canales internos formados por la malla del gel que aumentan su tortuosidad. Por otro lado, los tiempos de liberación más cortos en estos geles comparados con los estudiados por Peng y col., pueden relacionarse a la diferencia en el tamaño de los principios activos estudiados y a la geometría de las matrices.

#### ***2.4.7 Cinética de la liberación in vitro***

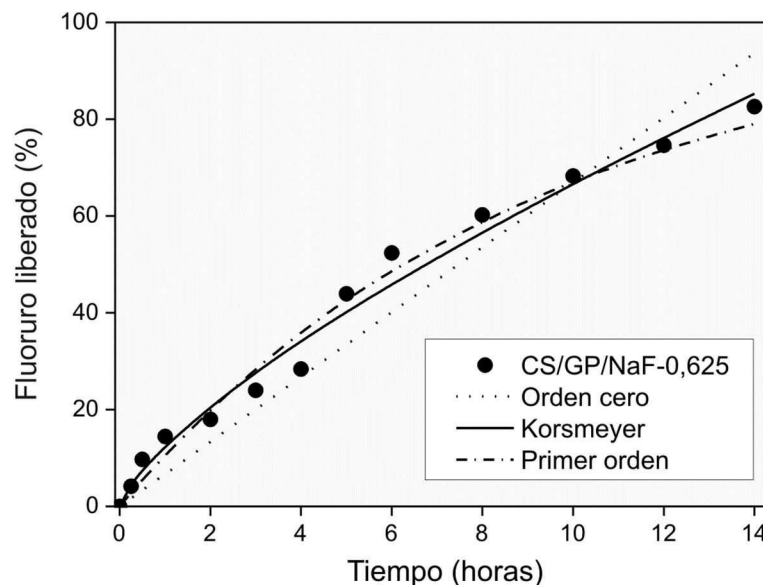
Con el fin de estudiar la cinética y el mecanismo de liberación del principio activo a partir de los geles de CS/GP, se propusieron 3 modelos cinéticos semi-empíricos (orden cero, Korsmeyer y primer orden) [65]. Los datos a ser ajustados por los modelos fueron obtenidos a partir de un ensayo de liberación de un gel CS/GP/NaF-0,625 en una solución amortiguadora de pH 7 llevado a cabo durante 24 h. La curva obtenida mostró que a las 14 h de ensayo se llegaba a valores cercanos al 90 % de liberación y luego se alcanzaba una asíntota, por lo cual la regresión

fue realizada utilizando solo los valores correspondientes al primer período. En la Tabla 15 se muestran los parámetros obtenidos para cada modelo utilizando el software OriginPro 8.0.

**Tabla 15. Parámetros de los modelos aplicados a las curvas de liberación del gel CS/GP/NaF-0,625**

	<i>gel CS/GP/NaF-0,625</i>		
	<i>Orden cero</i>	<i>Korsmeyer</i>	<i>Primer orden</i>
<i>k</i>	0,0669	0,1241	0,1318
<i>n</i>	-	0,7303	-
<i>r<sup>2</sup></i>	0,9763	0,9795	0,9855
<i>AIC</i>	-35,71	-50,06	-49,16

Se obtuvieron también dos parámetros que definen la bondad de ajuste de cada modelo,  $r^2$  y el AIC. Para todos los modelos se obtuvo un coeficiente de determinación alto ( $r^2 > 0,9$ ). El parámetro AIC sirve para comparar diferentes modelos aplicados a un mismo set de datos, tal que cuanto menor es el valor de AIC, mejor es el ajuste. El modelo de orden cero obtuvo un valor mucho mayor a los otros dos modelos por lo cual puede considerarse que es el menos apropiado de los tres, además esto se denota en la observación de las curvas obtenidas a partir de los modelos obtenidos (Figura 42). Los modelos predicen una liberación constante en el tiempo y no dependiente de la concentración, lo cual no es el caso ya que la liberación observada presenta una asíntota.



**Figura 42.** Curva de liberación de fluoruro a partir de un gel CS/GP/NaF en una solución amortiguadora de pH 7 y las curvas predichas por los modelos de Orden cero, Korsmeyer y Primer orden.

Los modelos de primer orden y Korsmeyer tuvieron un desempeño similar (un valor de AIC -49,16 y -50,16 respectivamente). Los modelos de primer orden tienen buen ajuste para los casos de matrices porosas y principios activos de alta solubilidad en el medio estudiado, tal como es el caso del API estudiado en este ensayo, cuya solubilidad es de aproximadamente 3 % p/p. Por otro lado observando el valor obtenido para el parámetro  $n$  (0,7303) del modelo de Korsmeyer se puede concluir que el mecanismo de liberación no está gobernado solamente por un proceso Fickiano ( $n=0,45$ ) ni por la relajación de las cadenas poliméricas ( $n = 0,89$ ), sino que ambos fenómenos se ven involucrados [81,85].

### 2.4.8 Cinética de migración de GP

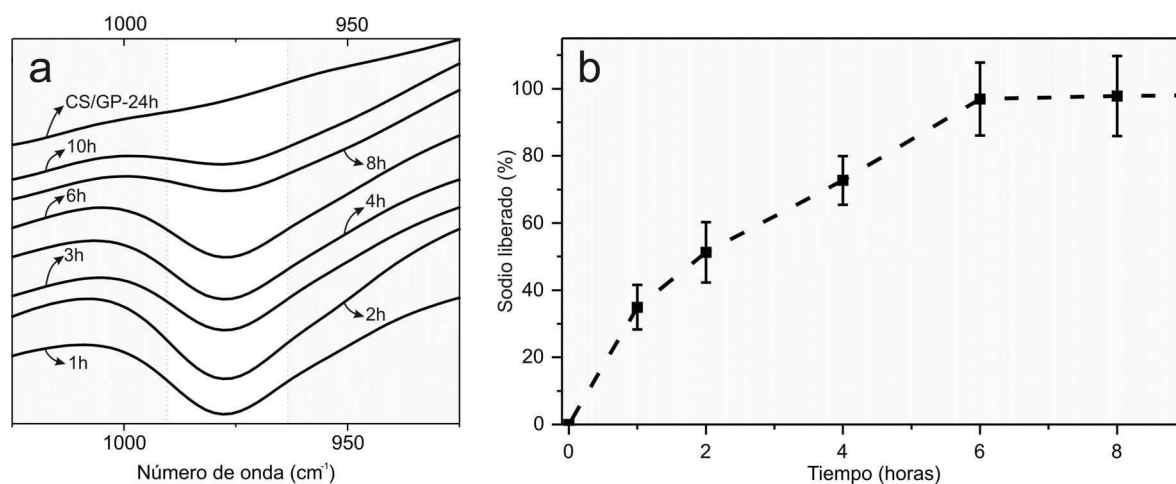
Alternativamente se estudió la cinética de migración del GP desde el gel hacia el medio acuoso. Para tal fin se realizaron ensayos de liberación de fosfato y sodio a partir de los hidrogeles CS/GP.

Para la determinación del contenido de fósforo se utilizó el método colorimétrico de Azul de Molibdeno [127]. Los resultados obtenidos, si bien denotaban el aumento de la concentración de este ion en la solución con el paso del tiempo, presentaron un error grande por lo cual no se muestran en la presente tesis. También se obtuvieron los espectros de FTIR de geles CS/GP previamente sumergidos a un medio acuoso durante 1, 2, 4, 6, 8 y 10 horas. Se

observa que la intensidad relativa del pico correspondiente al grupo fosfato ( $980\text{ cm}^{-1}$ ) va disminuyendo gradualmente en función del tiempo (Figura 43.a).

El análisis de la variación de la concentración de sodio se llevó a cabo teniendo en cuenta que en los geles sin NaF el ion sodio es mayormente aportado por el GP, por lo cual un seguimiento del aumento de la concentración de sodio en el medio es por un lado un indicio de la liberación del GP, y por el otro también nos indica como es la liberación de un API similar al fluoruro (pequeño, hidrosoluble y de alta relación carga/masa). Los resultados obtenidos muestran que la migración de este ion al medio es sostenida por al menos 6 h (Figura 43.b).

Estos resultados dan indicios de que el GP no forma parte de la estructura que consolida el gel y que además la migración de este compuesto hacia el medio es sostenida durante varias horas.



**Figura 43. Espectros de FTIR de geles CS/GP con diferentes tiempos de exposición al agua (a). Curva de liberación de sodio a partir de geles CS/GP (b).**

El gel CS/GP demostró que logra perfiles de liberación sostenida de iones de bajo peso molecular, como fluoruro, sodio y glicerofosfato (19 g/mol, 22,9 g/mol y 170 g/mol respectivamente), y de alta solubilidad acuosa.

Los geles de CS y GP han sido estudiados en la aplicación de fármacos de baja solubilidad teniendo como objeto ser utilizados para la liberación durante períodos largos (de varios días hasta meses) en aplicaciones parenterales. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este capítulo, puede plantearse que este tipo de matriz puede aplicarse en la liberación controlada de fármacos de alta relación carga/masa durante períodos más cortos, como los esperados para dosificaciones orales.

## ***2.5 Conclusiones parciales***

En este capítulo se realizó la caracterización físico-química de geles de CS y glicerofosfato de sodio.

Estos geles demostraron ser estables en un amplio rango de pH, que abarcan desde moderadamente ácidos (pH 4) hasta neutros por más de 48 h. En medios más ácidos los geles se desintegraron en menos de 30 min.

Mediante espectroscopia infrarroja se logró observar que los geles antes de ser expuestos a un medio acuoso presentaban los picos característicos de CS y el GP y que la presencia de NaF no modificó los espectros obtenidos. Además, con esta misma técnica se evidenció que el GP migra de manera sostenida desde la matriz hacia el medio y que luego de 24 h no se observan los picos característicos de esta sustancia, por lo cual la matriz queda conformada solo por CS.

Los geles tuvieron un comportamiento viscoelástico en el rango de frecuencia y deformación ensayado. La exposición a un medio acuoso modificó considerablemente sus propiedades reológicas. Cuando los geles fueron expuestos a un medio de pH cercano a la neutralidad (6) la viscosidad compleja aumentó luego de 24 h debido a la migración del GP.

Los ensayos de barrido de frecuencia de los geles mostraron un decaimiento y recomposición tanto del módulo de almacenamiento como de la viscosidad compleja con el aumento de la frecuencia. Este comportamiento se relaciona con una ruptura y posible recomposición de la estructura polimérica que conforma el gel. Este fenómeno ocurrió a frecuencias menores en los geles expuestos a un medio de pH ácido (2) durante 15 min, mostrando que esta matriz se debilita en estas condiciones.

Los difractogramas muestran que los geles no presentaron fases cristalinas, a excepción de los cristales de NaF cuando la concentración del principio activo fue de 2,5 %.

La liberación del fluoruro desde los geles es sostenida por al menos durante 6 horas en medios de diferente acidez y, según los modelos cinéticos semi-empíricos estudiados, este fenómeno está gobernado por procesos difusivos y de relajación de las cadenas poliméricas.





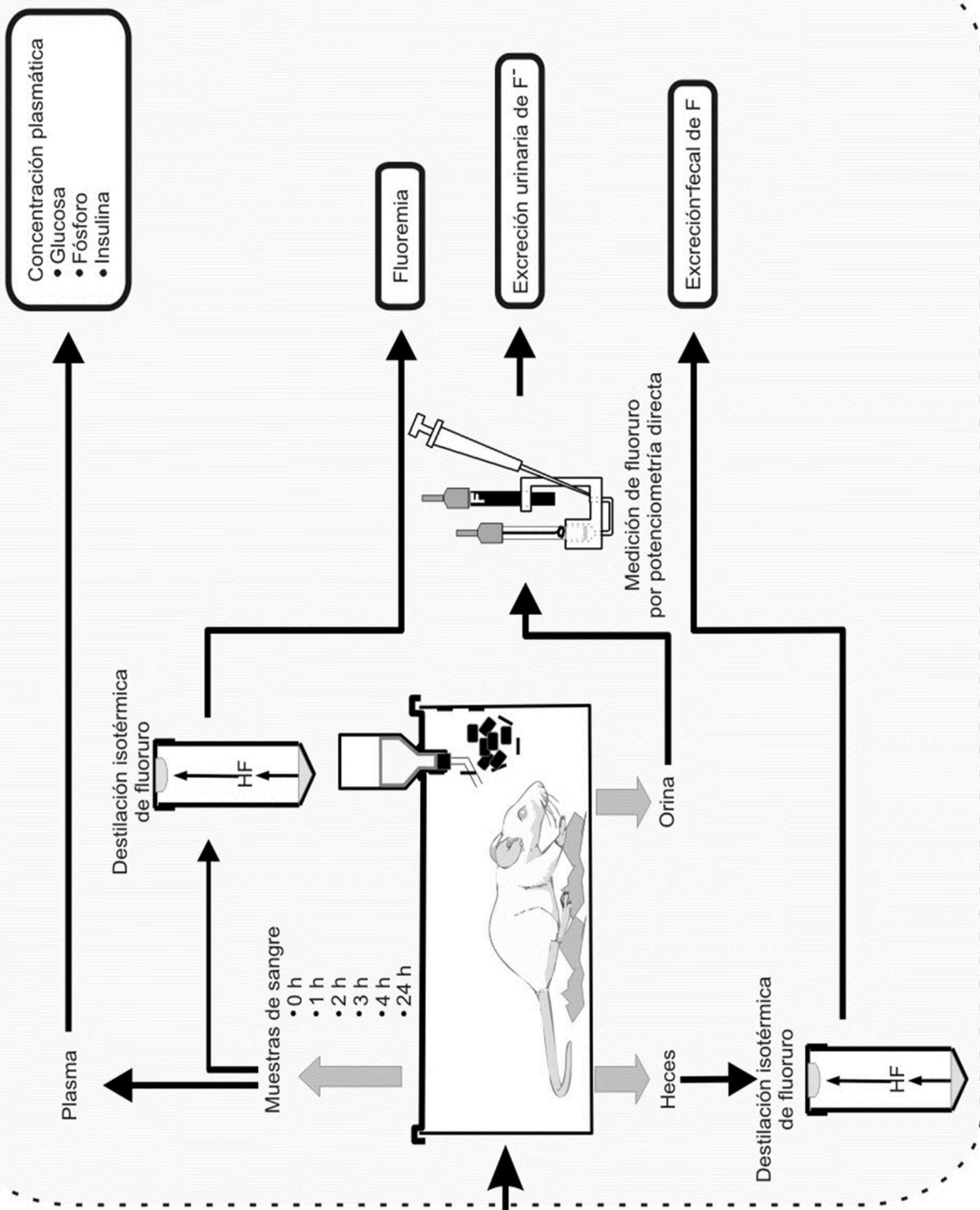
## Capítulo 3

**Evaluación *in vivo*  
de los  
Hidrogeles CS-GP**

Intubación orogástrica  
gel/solución acuosa + NaF



Ensayos *in vivo*



## Capítulo 3 – Evaluación *in vivo* de los hidrogeles CS/GP/NaF

### 3.1 Introducción

El fluoruro es la forma iónica del flúor, el elemento más electronegativo, y es reconocido por estimular la diferenciación de osteoblastos y por sus propiedades anticariogénicas [75,128]. Este ion, al ser administrado por vía oral es absorbido en el estómago y en el intestino delgado. Una vez en el torrente sanguíneo, es incorporado en los tejidos mineralizados o excretado por vías urinarias. En los niveles de ingesta habituales no se acumula en tejidos blandos [129].

La osteoporosis es una enfermedad que se caracteriza por el incremento de la fragilidad ósea y de la susceptibilidad a las fracturas de huesos debido a la pérdida de su densidad mineral. El fluoruro, cuando es administrado en dosis adecuadas, incrementa la masa ósea reduciendo el riesgo de fracturas vertebrales en pacientes con esta condición [72]. El fluoruro en el tejido óseo reemplaza el oxhidrilo en el cristal de la hidroxiapatita, formando fluorapatita que posee mayor cristalinidad y estimula la proliferación de células formadoras del tejido óseo. La dosificación oral es la única vía posible para lograr un efecto sistémico con fluoruro para el tratamiento de la osteoporosis [79]. Sin embargo, se han reportado efectos negativos relacionados a este API cuando es suministrado en altas dosis o de manera crónica. La toxicidad del fluoruro puede incluir desórdenes hormonales, alteraciones en el tejido óseo y fluorosis dental [75–78].

En el desarrollo de este capítulo se compara la variación de diversos parámetros biológicos como la excreción de urinaria de fluoruro, la fluoremia, la fracción no absorbida a nivel intestinal, la glucemia, la insulinemia y la fosfatemia en ratas luego de recibir una dosis de fluoruro en un sistema de disponibilidad inmediata (solución acuosa del principio activo) y en una matriz de liberación lenta (gel CS/GP/NaF).

### 3.2 Objetivos

Los objetivos planteados en este capítulo de la tesis fueron:

- Estudiar el efecto de la administración oral de fluoruro en un gel CS/GP/NaF en ratas.

- Comparar la absorción de fluoruro administrado oralmente en un gel CS/GP/NaF y en una solución acuosa en ratas.
- Estudiar la influencia de la dosificación del fluoruro en un gel CS/GP/NaF en los efectos negativos relacionados a las altas dosis de este principio activo.

## 3.3 Materiales y métodos

### 3.3.1 Estudios *in vivo*

Los ensayos *in vivo* fueron realizados en el bioterio del Laboratorio de Biología Ósea de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario. Para realizar estos estudios se emplearon ratas Sprague–Dawley hembras (100 – 150 g). Los animales se mantuvieron en ayuno durante 12 h antes de la administración del principio activo y luego fueron aislados en cajas metabólicas con agua y comida *ad libitum*. Se recolectaron las heces y orina durante 24 h. A todos se les suministró una dosis de fluoruro (entrampado en el gel CS/GP o en una solución acuosa) por una sonda orogástrica de pvc (medida k-35). Se tomaron muestras de sangre (100  $\mu$ L) de la vena de la cola a diferentes intervalos de tiempo. La Figura 44 muestra una fotografía del procedimiento de intubación orogástrica.



Figura 44. Imagen del proceso de intubado con una sonda orogástrica.

Se estudió el efecto de la forma de dosificación del fluoruro en la fluoremia y el contenido de fluoruro en heces y orina. Para esta determinación se le suministró a 8 animales el NaF en una solución acuosa o en un hidrogel CS/GP. Además, se estudió el efecto del fluoruro en los niveles plasmáticos de insulina, glucosa y fósforo. Para tal fin, a 5 animales se les dosificó el principio activo en una solución acuosa o en un hidrogel CS/GP.

### ***3.3.2 Excreción urinaria y fecal de fluoruro***

La determinación de la excreción urinaria y fecal permite evaluar la farmacocinética y la absorción gastrointestinal del fluoruro. Para ello se recolectaron durante 24 h ambos tipos de excreciones de los animales tratados y se determinó la masa de fluoruro contenida en ellas. Del mismo modo, se determinó el valor basal en animales no tratados.

La excreción urinaria total fue obtenida utilizando los datos de concentración de fluoruro en orina y la diuresis en las 24 h posteriores a haberse efectuado el tratamiento. Las heces fueron recolectadas durante las 24 h posteriores a la dosificación del principio activo y la masa total de fluoruro se determinó por calcinación-destilación-potenciometría.

### ***3.3.2 Fluoremia***

Se siguió la evolución de la concentración del fluoruro en sangre (fluoremia) tomando muestras de cada animal a diferentes intervalos de tiempo. Para cada determinación se extrajeron 100  $\mu$ L sangre de vena de la cola y luego se determinó la concentración de fluoruro por microdestilación-potenciometría directa.

### ***3.3.3 Determinación de contenido de fluoruro en muestras biológicas***

En este trabajo la determinación del contenido de fluoruro en las muestras biológicas estudiadas se llevó a cabo siguiendo dos metodologías, potenciometría directa y microdestilación-potenciometría directa.

Para la determinación por potenciometría directa cada muestra fue mezclada con una solución de ajuste de pH y fuerza iónica y luego se midió el potencial de la solución con un electrodo ion selectivo para fluoruro (ORION 94-09) y un electrodo de referencia Ag/AgCl.

En la microdestilación, una alícuota de muestra (100  $\mu$ L para el caso de la sangre) fue colocada en el fondo de tubo de 3 mL (cámara de destilación), tratándose luego con ácido fosfórico concentrado durante 24 hs a 60 °C. El ácido fluorhídrico desprendido de la muestra va siendo atrapado sobre 5  $\mu$ l de NaOH 1,65 N depositado en la tapa del tubo, durante el tiempo que dura el proceso. Finalmente, la trampa de NaOH se ajustó a pH 5-5.5 con 60  $\mu$ l de ácido acético glacial diluido 1/120 y se procedió a la determinación potenciométrica [93].

Para determinar el contenido de fluoruro en heces, éstas fueron previamente calcinadas a 600 °C durante 24 h y luego se realizó el proceso de destilación-potenciometría.

### **3.3.4 Glucemia**

La determinación de glucosa se realizó con un kit comercial (Glucemia enzimática Wiener Laboratorios, Rosario, Argentina). El método utiliza glucosa oxidasa y el color desarrollado es proporcional a la concentración de glucosa en la muestra. La absorbancia se midió a 505 nm con un espectrofotómetro Perkin Elmer, lambda 11 y se procesaron simultáneamente testigos de glucosa de 0,5, 1, 2 y 3 g/L. La determinación se realizó por duplicado y estuvo sujeta a control de calidad, repitiéndose las determinaciones si el coeficiente de variación de la determinación superara el 10%. En paralelo, se procesó una solución control de calidad de media y desvío estándar conocidos. Con el valor de la medición se calcularon las unidades de desvío estándar y si dicho valor estuvo fuera del intervalo [-2,2], se repitió el lote de mediciones.

### **3.3.5 Insulinemia**

La medida de la concentración de insulina plasmática se realizó con un contador de centelleo sólido Alfa nuclear modelo Cmos utilizando un kit de radioinmunoensayo específico para insulina de rata (Rat insulin Millipore, USA). El ensayo se fundamenta en la competencia entre la insulina de la muestra con hormona marcada con  $^{125}$ I por anticuerpos específicos contra insulina de rata. El manejo del material radiactivo se realizó de acuerdo a las normas establecidas por la Autoridad Regulatoria Nuclear Argentina (norma ARN 10.1.1 de seguridad radiológica). La determinación se realizó por duplicado y estuvo sujeta a control de calidad, repitiéndose las determinaciones si el coeficiente de variación de la determinación supera el 10%.

### **3.3.6 Fosfatemia**

El fósforo inorgánico se midió utilizando un kit comercial FOSFATEMIA UV AA Wiener Lab, Rosario, Argentina. El método se fundamenta en la reacción del fósforo con el molibdato en medio ácido y la formación de un complejo fosfomolibdico. Para cada determinación se utilizó 5 uL de plasma o suero y simultáneamente se procesó una solución patrón de 4 mg/dL de fósforo, con la que se construyó una curva de calibración. La absorbancia a 340 nm (medida en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 11) es proporcional a la concentración de fósforo inorgánico en la muestra. La determinación se realizó por duplicado y estuvo sujeta a control de calidad, repitiéndose las determinaciones si el coeficiente de variación de la determinación supera el 10%. Simultáneamente se procesó una solución control de calidad de media y desvío estándar conocidos. Con el valor de la medición de esta solución se calcularon las unidades de desvío estándar y si dicho valor estuvo fuera del intervalo [-2,2], se repitió el lote de mediciones.

## 3.4 Resultados

### 34.4.1 Farmacocinética del fluoruro

Las matrices farmacéuticas para dosificación oral son expuestas a diferentes condiciones a lo largo del tracto digestivo. Entre otros parámetros se destaca la variación del pH (desde entre 3 o 4 en el estómago hasta valores cercanos a la neutralidad en el intestino delgado y grueso). Otra condición cambiante a lo largo del tracto digestivo es el contenido enzimático [122]. Los geles CS/GP mostraron ser estables y sostener una liberación controlada de NaF en el rango de pH de 4 a 7. De todos modos en los ensayos *in vitro* no se evaluaron variables como la degradación enzimática del CS la cual puede modificar el desempeño de los geles.

En este capítulo se realizaron estudios *in vivo* para comparar farmacocinética del fluoruro siendo administrado en un hidrogel CS/GP/NaF o en una solución acuosa. Se utilizaron ratas hembras de la línea Sprague-Dawley en ayuno y la dosis suministrada a cada una fue de 0,84 mg de NaF/ 100 g de masa corporal. Teniendo en cuenta que los animales utilizados tenían una masa de entre 100 y 150 g se optó por utilizar CS/GP/NaF-0,625, de esta forma las dosis de hidrogel fueron entre 130 y 200 mg.

La concentración de fluoruro en sangre de cada animal fue seguida durante 24 h luego de suministrado cada tratamiento. Para cada animal se determinó la fluoremia basal, es decir la concentración de fluoruro en sangre antes de recibir el principio activo. Este parámetro era esperable que fuese próximo a cero, pero se observaron valores superiores.

En las primeras 2 h posteriores a la aplicación del principio activo, ambos tratamientos mostraron resultados similares (Figura 45). Luego de 3 h de realizada la dosificación, en el grupo de animales tratados con una solución acuosa de NaF se observó un aumento en la fluoremia, por otro lado, este valor disminuyó en los animales tratados con CS/GP/NaF ( $3.62 \pm 1.49$  ppm y  $0.68 \pm 0.19$  ppm respectivamente). Luego de 5 h la fluoremia en los animales sometidos a los dos tratamientos decayó a niveles cercanos a 0 ppm y se mantuvo hasta el final del ensayo (24 h). Estos resultados sugieren que la aplicación del fluoruro en el gel CS/GP/NaF disminuye los picos en la fluoremia observados cuando se dosifica el principio activo en una forma de disponibilidad inmediata, por lo cual se puede suponer que el gel CS/GP/NaF actúa como una matriz de liberación sostenida *in vivo*.



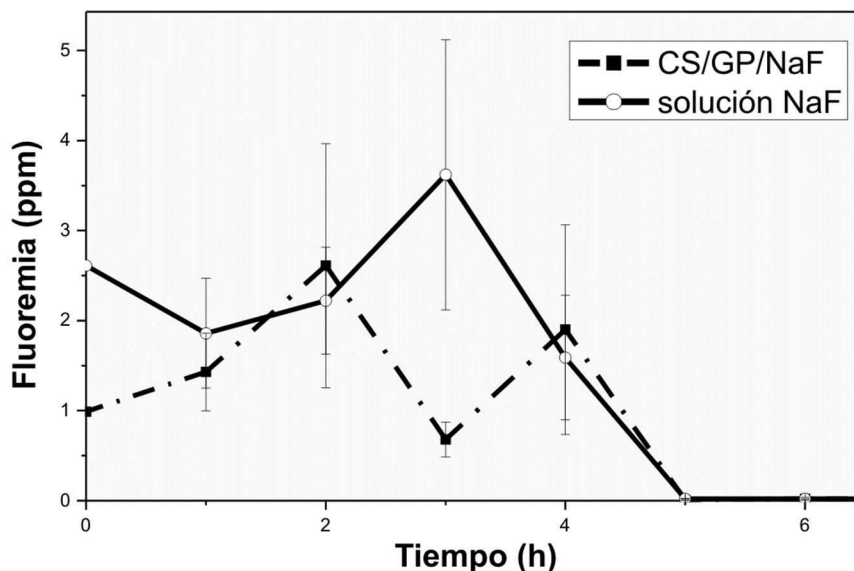
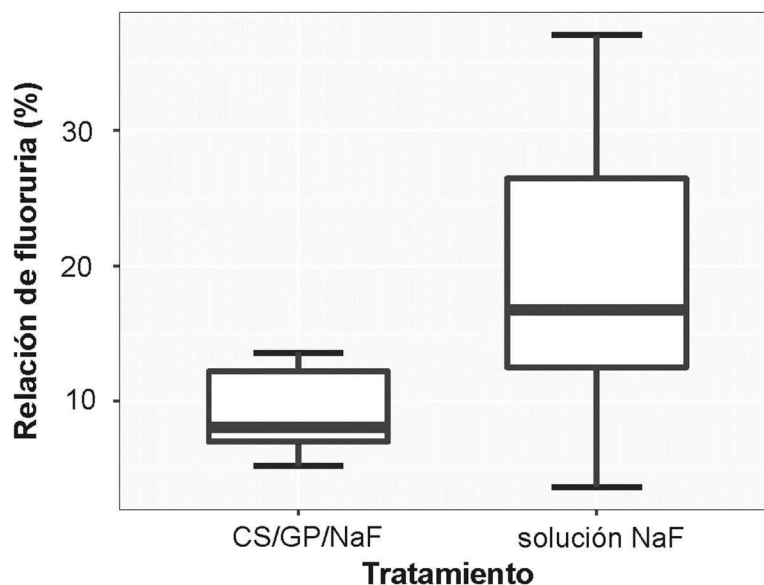


Figura 45. Variación de la fluoremia en animales tratados con una solución acuosa de fluoruro de sodio (solución NaF) y con un gel de CS/GP/NaF (n = 8 por tratamiento).

### 3.4.2 Excreción urinaria y fecal de fluoruro

Luego de la ingesta oral, el fluoruro puede ser absorbido en tracto gastrointestinal o excretado en heces. El principio activo, una vez que alcanza el torrente sanguíneo es removido por dos mecanismos, por un lado puede ser incorporado por el tejido óseo o bien excretado en la orina. Es decir, que luego de su ingesta este ion puede tomar tres vías, la incorporación en tejido óseo o la excreción por vía fecal o urinaria. Es por esto que se comparó la fluoruria y la excreción fecal total de fluoruro luego de 24 h de comenzado cada tratamiento [74]. Los resultados se expresaron como la relación porcentual entre el contenido de fluoruro excretado y la masa del ion suministrada a cada animal.

La Figura 46 muestra una gráfica de cajas que representa los resultados obtenidos para la excreción urinaria. Los animales tratados con el gel CS/GP/NaF mostraron una excreción del principio activo por esta vía significativamente inferior que los tratados con la solución acuosa (t de Student para datos no apareados,  $p < 0,05$ ). Además es destacable que la dispersión de los valores de excreción/dosis obtenidos en los animales tratados con el gel fue muy inferior al obtenido para aquellos tratados con una solución acuosa (3,2 vs. 9,22; valor  $p < 0,05$ ).



**Figura 46. Excreción urinaria de fluoruro en animales tratados con un hidrogel con NaF (CS/GP/NaF) y una solución de fluoruro de sodio (solución NaF).**

Los resultados obtenidos para la excreción fecal de fluoruro (Figura 47) muestran que esta variable fue similar para ambos tratamientos (t de Student de datos no apareados,  $p > 0,05$ ).

Tuleu y col. (1999) estudiaron el tiempo de residencia en el tracto gastrointestinal de matrices inertes (partículas de vidrio y celulosa microcristalina y sin principios activos farmacológicos) y no biodegradables [130]. Este trabajo reportó que, si bien la densidad y el tamaño de la matriz son influyentes, en todos los casos más del 40 % del contenido ingerido no fue excretado por vía fecal después de 9 h. En el caso de los hidrogeles estudiados en este capítulo existen otros factores que pueden tener influencia en este proceso, por ejemplo la bioadhesividad en mucosas del CS o la degradación enzimática y microbiológica del biopolímero. De todos modos, los resultados de excreción fecal de fluoruro luego de 24 h de administrado el principio activo no muestran diferencias significativas entre los tratamientos. Esto puede atribuirse a que si bien la liberación del fluoruro entrampado en el gel es lenta, el largo tiempo de residencia en el tracto gastrointestinal derive en que la cantidad de fluoruro no absorbido (o excretado) entre los tratamientos sea del mismo orden.

Por otro lado, es también destacable que la comparación de la varianza en los valores de relación de excreción fecal de fluoruro fue significativamente menor para el tratamiento CS/GP/NaF (13,6 vs 49,63, valor  $p < 0,05$ ).

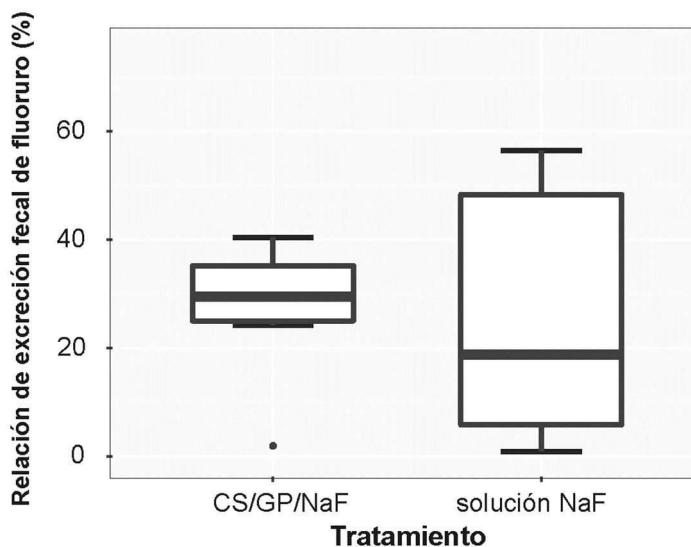


Figura 47. Excreción fecal de fluoruro en animales tratados con hidrogel con NaF (CS/GP/NaF) y una solución acuosa de fluoruro de sodio (solución NaF).

De la observación en conjunto de ambos parámetros se puede concluir que la absorción a nivel intestinal es similar para ambos tratamiento y que la excreción urinaria del principio activo es menor cuando se dosifica en un gel CS/GP/NaF. Por lo tanto, puede postularse que la inclusión del principio activo dentro de esta matriz mejora la biodisponibilidad del fluoruro hacia el tejido óseo si es comparada con la dosificación mediante una solución acuosa. Por otra parte, la menor dispersión de datos de excreción urinaria y fecal cuando el fluoruro se halla atrapado, indican que el comportamiento farmacocinético del fluoruro es más predecible que cuando se administra en solución acuosa.

### 3.4.5 Insulinemia y glucemia

Se ha reportado que el fluoruro posee efectos en la regulación de la glucosa sérica mediante la inhibición de secreción de insulina. Estos efectos fueron estudiados comparando los niveles en plasma de insulina (insulinemia) y glucosa (glucemia) antes y después de 1 h de la administración oral de fluoruro. Se observó que luego de este período la glucemia aumentó debido a la disminución de los niveles plasmáticos de insulina relacionados a una inhibición de la secreción de esta hormona en los islotes de Langerhans dependiente de la dosis de fluoruro[78].

En esta tesis se estudió si la inclusión del fluoruro dentro de un gel lograba disminuir este efecto. Es por esto que se compararon los niveles de glucemia e insulinemia en ratas, antes y después de 60 min de la dosificación oral de fluoruro (2,5 mg/100 g de masa corporal) suministrado mediante los dos tratamientos estudiados a lo largo de este capítulo.

En la Figura 48 se representan los resultados obtenidos en cada animal estudiado. En 4 de las 5 ratas tratadas con CS/GP/NaF, el nivel de insulina en sangre aumentó, mientras que en 4 de las 5 animales tratados con una solución acuosa este valor descendió (Figura 48.a). El análisis estadístico de los resultados (Tabla 16) indica que las variaciones obtenidas en ambos tratamientos son significativas (t de Student para datos apareados,  $p < 0,05$ ).

Los resultados obtenidos para la evolución de la glucosa en sangre (Figura 48.b) muestran que este parámetro disminuyó en al menos 3 de las 5 ratas que recibieron el principio activo en un gel, en contraposición, en todos los animales tratados con una solución acuosa de fluoruro de sodio aumentó la glucosa en sangre. El aumento en la glucemia de los animales tratados con una solución de fluoruro fue estadísticamente significativo (t de Student para datos apareados,  $p < 0,05$ ).

Estos resultados muestran que los parámetros obtenidos en los animales tratados con una solución acuosa de fluoruro son concordantes con los reportados por Menoyo y col. (2005) [78].

**Tabla 16. Variación en la insulinemia, glucemia y fosfatemia en animales tratados con CS/GP/NaF o con una solución acuosa. d.s es desviación estándar.**

	Tratamiento	promedio	d.s.	valor p
insulinemia (ng/L)	Solución acuosa	-33,31	28,62	0,03*
	CS/GP/NaF	53,83	39,88	0,02*
glucemia (g/L)	Solución acuosa	0,11	0,08	0,02*
	CS/GP/NaF	0,01	0,13	0,46
fosfatemia (mg/dL)	Solución acuosa	1,97	1,78	0,035*
	CS/GP/NaF	-0,88	2,07	0,19

Los resultados fueron considerados estadísticamente (\*) significante si  $p < 0,05$ .

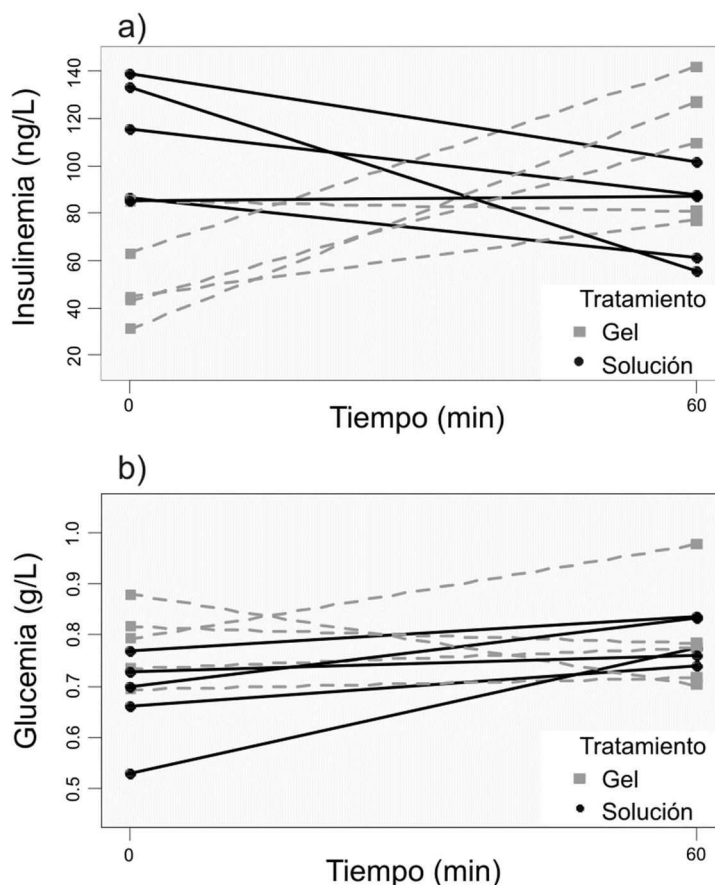


Figura 48. Variación de los valores de insulinemia (a) y glucemia (b) en animales tratados con CS/GP/NaF (Gel) o una solución acuosa (solución).

### 3.4.6 Fosfatemia

Di Loreto y col. (2006) reportó que ratas sometidas a una dosis oral de fluoruro de sodio de entre 1,26 y 3,40 mg/100 g de masa corporal incrementaron su nivel de fósforo en plasma luego de una hora de haberse suministrado el principio activo[131]. Además, animales tratados con dosis similares de fluoruro durante períodos más largos (30 días) mostraron una disminución en el contenido de fósforo óseo, lo cual se relaciona con el aumento de la concentración de fósforo en plasma.

Se estudió si la dosificación del fluoruro en el gel CS/GP revertía el efecto agudo del fluoruro en la fosfatemia. Para tal fin, se compararon las concentraciones de fósforo en sangre en animales tratados con una solución o un gel portador de fluoruro (2,5 mg/100 g de masa corporal) antes y 60 min después de comenzado el tratamiento. Los resultados obtenidos para cada animal se representan en la Figura 49.

En los animales pertenecientes al grupo tratado con una solución acuosa de fluoruro, este parámetro aumentó en el período estudiado ( $p < 0,05$ ), lo cual está en concordancia con lo reportado con Di Loreto y col. Contrariamente, la fosfatemia no varió significativamente en este lapso de tiempo en los animales tratados con el gel (Tabla 16).

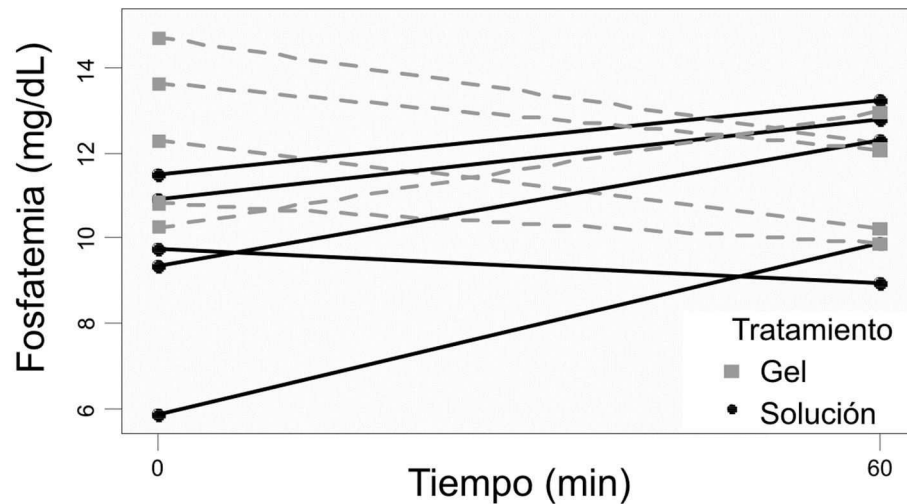


Figura 49. Variación de los valores de fosfatemia en animales tratados con CS/GP/NaF (Gel) o una solución acuosa (Solución).

Los resultados de glucemia, insulinemia y fosfatemia sugieren que los efectos negativos del fluoruro previamente reportados, disminuyen cuando el fluoruro es administrado en un hidrogel CS/GP. Probablemente esta diferencia entre tratamientos se deba a que el principio activo está entrampado en una matriz de liberación controlada. En consecuencia, la tasa de absorción del principio activo es menor, lo que conlleva a la reducción de los valores de fluoremia, los cuales son los responsables de la perturbación en la glucemia, insulinemia y fosfatemia.

Se destaca que durante los ensayos *in vivo* llevados a cabo en este trabajo no se observaron cambios ni en el estado de salud general ni de comportamiento en los animales sometidos a ambos tratamientos.

### 3.5 Conclusiones parciales

Se realizó el estudio del desempeño *in vivo* de los geles CS/GP/NaF en ratas. Para tal fin se observó la variación de la fluoremia, fosfatemia, insulinemia y glucemia luego de la dosificación de una solución acuosa de fluoruro y del gel CS/GP/NaF.

De la comparación de la evolución de la fluoremia en el tiempo luego de la dosificación del principio activo se destaca que la aplicación del fluoruro en un gel CS/GPNaF disminuía los valores altos de fluoremia observados luego de 3 h de comenzado el ensayo.

Mientras la absorción de fluoruro en el tracto gastrointestinal fue similar en ambos, la excreción urinaria fue significativamente inferior en los animales tratados con el gel CS/GP/NaF, por lo cual se puede inferir que la incorporación de fluoruro en el tejido óseo es superior cuando es suministrado en un gel de CS-GP.

Se evaluó la influencia de la forma de dosificación del fluoruro en alguno de los efectos adversos relacionados a las altas dosis de fluoruro. En los tres parámetros estudiados (disminución de la insulinemia e incremento en la glucemia y fosfatemia), cuando se administró el principio activo en un gel CS/GP/NaF no se manifestaron las perturbaciones previamente reportadas en la bibliografía.



# Conclusiones



## **Conclusiones**

### **Capítulo 1 – Micropartículas de quitosano:**

Se obtuvieron las condiciones experimentales que permitieron la inclusión de NaF en partículas de CS utilizando la tecnología de lecho fluido.

Se elaboraron partículas de CS-NaF variando los componentes de la formulación y se caracterizaron por FTIR, análisis granulométrico, microscopía electrónica de barrido y la liberación del fluoruro mediante métodos potenciométricos.

En primera instancia se utilizó el CS sin tratamiento previo y luego estudió la incorporación de un ácido débil en la formulación de las partículas para incrementar la interacción entre el CS y el fluoruro. Si bien las partículas se pudieron procesar sin inconvenientes obteniéndose buenos valores de secado y eficiencia de inclusión del fluoruro de sodio, los perfiles de liberación obtenidos mostraron que durante los primeros 15 min la mayoría del fluoruro incluido era liberado al medio.

También se estudió el efecto de separación por tamaño del CS antes de procesarlo en el lecho fluido y se observó que las partículas de tamaño menor a 75  $\mu\text{m}$  presentaron grandes aglomerados indeseados. Por otro lado, cuando la granulometría fue más grande el procedimiento pudo ser llevado a cabo sin ningún inconveniente. Los perfiles de liberación de fluoruro también fueron rápidos en los primeros minutos.

Se ensayó la aplicación de recubrimientos de PVP (soluble en agua) y EUDRAGIT® RS (insoluble en agua) por lecho fluido sobre las partículas de quitosano-NaF. Los resultados de FTIR y SEM muestran que se logró aplicar una película polimérica pero la liberación también fue acelerada.

También se realizó un recubrimiento por EUDRAGIT® RS por inmersión. En estas condiciones la liberación de fluoruro fue lenta y la velocidad dependía del tiempo de exposición de las partículas a la solución del polímero.

Finalmente se ajustaron los valores de la curva de liberación el API obtenidos para las partículas recubiertas por inmersión a modelos cinéticos de orden cero, Korsmeyer-Peppas y primer orden. El modelo de Korsmeyer-Peppas fue el que mejor se ajustó a los valores medidos y el exponente de este modelo corresponde a un efecto de liberación mixto a través de la capa polimérica y los poros de ésta.

## ***Capítulo 2 – Hidrogeles de CS-GP:***

En este capítulo se realizó la caracterización físico-química de geles de quitosano y glicerofosfato de sodio.

Estos geles demostraron ser estables en un amplio rango pH, que abarcan desde moderadamente ácidos (pH 4) hasta neutros por más de 48 h. En medios más ácidos los geles se desintegraron en menos de 30 min.

Mediante espectroscopia infrarroja se logró observar que los geles antes de ser expuestos a un medio acuoso presentaban los picos característicos de quitosano y el GP y que la presencia de NaF no modificó los espectros obtenidos. Además, con esta misma técnica se evidenció que el GP migra de manera sostenida desde la matriz hacia el medio y que luego de 24 h no se observan los picos característicos de esta sustancia, por lo cual la matriz queda conformada solo por quitosano.

Los geles tuvieron un comportamiento viscoelástico en el rango de frecuencia y deformación ensayado. La exposición a un medio acuoso modificó considerablemente sus propiedades reológicas. Cuando los geles fueron expuestos a un medio de pH cercano a la neutralidad (6) la viscosidad compleja aumentó luego de 24 h debido a la migración del GP.

Los ensayos de barrido de frecuencia de los geles mostraron un decaimiento y recomposición tanto del módulo de almacenamiento como de la viscosidad compleja con el aumento de la frecuencia. Este comportamiento se relaciona con una ruptura y posible recomposición de la estructura polimérica que conforma el gel. Este fenómeno ocurrió a frecuencias menores en los geles expuestos a un medio de pH ácido (2) durante 15 min, mostrando que esta matriz se debilita en estas condiciones.

Los difractogramas muestran que los geles no presentaron fases cristalinas, a excepción de los cristales de NaF cuando la concentración del principio activo fue de 2,5 %.

La liberación del fluoruro desde los geles es sostenida por al menos durante 6 horas en medios de diferente acidez y, según los modelos cinéticos semi-empíricos estudiados, este fenómeno está gobernado por procesos difusivos y de relajación de las cadenas poliméricas.

## **Capítulo 3 - Evaluación *in vivo* de los hidrogeles CS/GP/NaF:**

Se realizó el estudio del desempeño *in vivo* de los geles CS/GP/NaF en ratas. Para tal fin se observó la variación de la fluoremia, fosfatemia, insulinemia y glucemia luego de la dosificación de una solución acuosa de fluoruro y del gel CS/GP/NaF.

De la comparación de la evolución de la fluoremia en el tiempo luego de la dosificación del principio activo se destaca que la aplicación del fluoruro en un gel CS/GP/NaF disminuía los valores altos de fluoremia observados luego de 3 h de comenzado el ensayo.

Mientras la absorción de fluoruro en el tracto gastrointestinal fue similar en ambos, la excreción urinaria fue significativamente inferior en los animales tratados con el gel CS/GP/NaF, por lo cual se puede inferir que la incorporación de fluoruro en el tejido óseo es superior cuando es suministrado en un gel de CS-GP.

Se evaluó la influencia de la forma de dosificación del fluoruro en alguno de los efectos adversos relacionados a las altas dosis de fluoruro. En los tres parámetros estudiados (disminución de la insulinemia e incremento en la glucemia y fosfatemia), cuando se administró el principio activo en un gel CS/GP/NaF no se manifestaron las perturbaciones previamente reportadas en la bibliografía.

### **Conclusiones generales:**

En esta tesis se desarrollaron diferentes matrices basadas en quitosano para la liberación controlada de fluoruro de sodio. Dentro de todas las formulaciones estudiadas se destacan las partículas recubiertas por inmersión con EUDRAGIT® y los geles de quitosano-glicerofosfato. En ambos casos se lograron tiempos de liberación prolongados (mayores a 3 horas). Además, los geles mostraron mejorar la absorción del fluoruro y contrarrestar algunos de los efectos secundarios típicos presentes en el principio activo estudiado cuando fueron administrados *in vivo*.



# Bibliografía

- [1] K.Y. Chan, K.P. Ng, D.S. Sim, Drug Administration, in: Pharmacol. Basis Acute Care, 2015: pp. 9–15. doi:<https://doi.org/10.1007/978-3-319-10386-0>.
- [2] H. Wen, K. Park, Oral Controlled Release Formulation Design and Drug Delivery, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2010. doi:[10.1002/9780470640487](https://doi.org/10.1002/9780470640487).
- [3] R. Onnainty, Desarrollo y Caracterización de Nuevos Sistemas de Liberación de Fármacos Farmacéutica Renée Onnainty, Universidad Nacional de Cordoba, 2016.
- [4] K. Park, A. Hillery, Drug Delivery, 2nd ed., CRC Press, Broken Sound Parkway NW, 2016. doi:[10.1201/9781315382579](https://doi.org/10.1201/9781315382579).
- [5] V. Sáez, E. Hern, L.S. Angulo, Mecanismos de liberación de fármacos desde materiales polímeros, Rev. Iberoam. Polímeros. 5 (2004) 55–70.
- [6] H. Hezaveh, I.I. Muhamad, R. Safdar, A.A. Omar, A. Arunagiri, I. Regupathi, M. Thanabalan, Potential of Chitosan and its derivatives for controlled drug release applications – A review, Carbohydr. Polym. 89 (2019) 138–145. doi:[10.1016/j.carbpol.2012.02.062](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.02.062).
- [7] H. Hezaveh, I.I. Muhamad, The effect of nanoparticles on gastrointestinal release from modified  $\kappa$ -carrageenan nanocomposite hydrogels, Carbohydr. Polym. 89 (2012) 138–145. doi:[10.1016/j.carbpol.2012.02.062](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.02.062).
- [8] M. Rabišková, T. Bautzová, J. Gajdziok, K. Dvořáčková, A. Lamprecht, Y. Pellequer, J. Spilková, Coated chitosan pellets containing rutin intended for the treatment of inflammatory bowel disease: in vitro characteristics and in vivo evaluation., Int. J. Pharm. 422 (2012) 151–9. doi:[10.1016/j.ijpharm.2011.10.045](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.10.045).
- [9] F. Priese, B. Wolf, Development of high drug loaded pellets by Design of Experiment and population balance model calculation, Powder Technol. 241 (2013) 149–157. doi:[10.1016/j.powtec.2013.03.026](https://doi.org/10.1016/j.powtec.2013.03.026).
- [10] N. Fakult, M. Pa, Study to design stable lansoprazole pellets, Naturwissenschaftlichen

Fakultät der Universität Basel, 2008.

- [11] P.K. Mundada, K.K. Sawant, V.P. Mundada, Formulation and optimization of controlled release powder for reconstitution for metoprolol succinate multi unit particulate formulation using risk based QbD approach, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 41 (2017) 462–474. doi:10.1016/j.jddst.2017.09.001.
- [12] M. Hiorth, T. Skøien, S.A. Sande, Immersion coating of pellet cores consisting of chitosan and calcium intended for colon drug delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 75 (2010) 245–253. doi:10.1016/j.ejpb.2010.02.012.
- [13] N.S. Velazquez, L.N. Mengatto, J.A. Luna, *Sistemas de liberación controlada basados en complejos de inclusión ciclodextrina-fármacos incluidos en matrices poliméricas*, Universidad Nacional del Litoral, 2018.
- [14] M. Dash, F. Chiellini, R.M. Ottenbrite, E. Chiellini, Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications, *Prog. Polym. Sci.* 36 (2011) 981–1014. doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.02.001.
- [15] F. Ahmadi, Z. Oveisi, M. Samani, Z. Amoozgar, Chitosan based hydrogels: Characteristics and pharmaceutical applications, *Res. Pharm. Sci.* 10 (2015) 1–16. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84925009537&partnerID=40&md5=6deaed5a2e6694906574ca2df5bd6de6>.
- [16] R. Cheung, T. Ng, J. Wong, W. Chan, Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications, *Mar. Drugs.* 13 (2015) 5156–5186. doi:10.3390/md13085156.
- [17] E.I. Rabea, M.E.T. Badawy, C. V. Stevens, G. Smagghe, W. Steurbaut, Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action, *Biomacromolecules.* 4 (2003) 1457–1465. doi:10.1021/bm034130m.
- [18] T.H. Fischer, H.S. Thatte, T.C. Nichols, D.E. Bender-Neal, D. a. Bellinger, J.N. Vournakis, Synergistic platelet integrin signaling and factor XII activation in poly-N-acetyl glucosamine fiber-mediated hemostasis, *Biomaterials.* 26 (2005) 5433–5443.

doi:10.1016/j.biomaterials.2005.01.023.

- [19] F. Croisier, C. Jérôme, Chitosan-based biomaterials for tissue engineering, *Eur. Polym. J.* 49 (2013) 780–792. doi:10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009.
- [20] S. Ahmed, Annu, A. Ali, J. Sheikh, A review on chitosan centred scaffolds and their applications in tissue engineering, *Int. J. Biol. Macromol.* 116 (2018) 849–862. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.04.176.
- [21] S. Saravanan, S. Vimalraj, P. Thanikaivelan, S. Banudevi, G. Manivasagam, A review on injectable chitosan/beta glycerophosphate hydrogels for bone tissue regeneration, *Int. J. Biol. Macromol.* 121 (2019) 38–54. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.10.014.
- [22] X. Xu, Z. Gu, X. Chen, C. Shi, C. Liu, M. Liu, L. Wang, M. Sun, K. Zhang, Q. Liu, Y. Shen, C. Lin, B. Yang, H. Sun, An injectable and thermosensitive hydrogel: Promoting periodontal regeneration by controlled-release of aspirin and erythropoietin, *Acta Biomater.* 86 (2019) 235–246. doi:10.1016/j.actbio.2019.01.001.
- [23] K. Ibrahim, B. El-Eswed, K. Abu-Sbeih, T. Arafat, M. Al Omari, F. Darras, A. Badwan, Preparation of Chito-Oligomers by Hydrolysis of Chitosan in the Presence of Zeolite as Adsorbent, *Mar. Drugs.* 14 (2016) 43. doi:10.3390/md14080043.
- [24] C.J. Park, S.G. Clark, C.A. Lichtensteiger, R.D. Jamison, A.J. Wagoner, Accelerated wound closure of pressure ulcers in aged mice by chitosan scaffolds with and without bFGF, *Acta Biomater.* 5 (2009) 1926–1936. doi:10.1016/j.actbio.2009.03.002.
- [25] R. Jayakumar, K.P. Chennazhi, R.A.A. Muzzarelli, H. Tamura, S. V. Nair, N. Selvamurugan, Chitosan conjugated DNA nanoparticles in gene therapy, *Carbohydr. Polym.* 79 (2010) 1–8. doi:10.1016/j.carbpol.2009.08.026.
- [26] J.A. Luna, F.A. Fookes, M.A. Canteros, Process for obtaining a biopolimeric hemostatic powder and the product, US2019/022009 A1, 2019.
- [27] M.A. Khan, M. Mujahid, A review on recent advances in chitosan based composite for hemostatic dressings, *Int. J. Biol. Macromol.* 124 (2019) 138–147. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.11.045.

- [28] N. Bergisadi, J. Akbuga, Effect of formulation variables on cis-platin loaded chitosan microsphere properties, *J. Microencapsul.* 16 (1999) 697–703. doi:10.1080/026520499288645.
- [29] X.-H. Wei, Y.-P. Niu, Y.-Y. Xu, Y.-Z. Du, F.-Q. Hu, H. Yuan, Salicylic Acid-grafted Chitosan Oligosaccharide Nanoparticle for Paclitaxel Delivery, *J. Bioact. Compat. Polym.* 00 (2010) 1–17. doi:10.1177/0883911510363548.
- [30] M. Mattioli-Belmonte, F. Greco, R.A.A. Muzzarelli, A. De Benedittis, N. Specchia, R. Politano, A. Buffa, G. Biagini, A. Gigante, N,N-dicarboxymethyl chitosan as delivery agent for bone morphogenetic protein in the repair of articular cartilage, *Med. Biol. Eng. Comput.* 37 (2007) 130–134. doi:10.1007/bf02513279.
- [31] K. Kaur, K. Kim, Studies of chitosan/organic acid/Eudragit RS/RL-coated system for colonic delivery., *Int. J. Pharm.* 366 (2009) 140–148. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.09.006.
- [32] B. Xu, W. Zhang, Y. Chen, Y. Xu, B. Wang, L. Zong, Eudragit® L100-coated mannosylated chitosan nanoparticles for oral protein vaccine delivery, *Int. J. Biol. Macromol.* 113 (2018) 534–542. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.02.016.
- [33] F. Khademi, R.A. Taheri, A. Yousefi Avarvand, H. Vaez, A.A. Momtazi-Borojeni, S. Soleimanpour, Are chitosan natural polymers suitable as adjuvant/delivery system for anti-tuberculosis vaccines?, *Microb. Pathog.* 121 (2018) 218–223. doi:10.1016/j.micpath.2018.05.035.
- [34] J. Bond, R.C. Read, R. Jennings, A. Fisher, I. Jabbal-Gill, L. Illum, C.W. Potter, S.C. Naylor, Effective nasal influenza vaccine delivery using chitosan, *Vaccine.* 23 (2005) 4367–4374. doi:10.1016/j.vaccine.2005.04.021.
- [35] L. Mengatto, J.A. Luna, M.I. Cabrera, Use of chitosan membranes to mimic human epidermis for the development of an estradiol delivery system, *J. Pharm. Innov.* 6 (2011) 241–248. doi:10.1007/s12247-011-9117-3.
- [36] L.N. Mengatto, J.A. Luna, F.A. Fookes, Procedimiento para la agregación de un concentrado vegetal en membranas poliméricas biodegradables de uso biomédico y la



- obtención de la membrana, AR089355A1, 2014.
- [37] I.M. Helbling, C.A. Busatto, S.A. Fioramonti, J.I. Pesoa, L. Santiago, D.A. Estenoz, J.A. Luna, Preparation of TPP-crosslinked chitosan microparticles by spray drying for the controlled delivery of progesterone intended for estrus synchronization in cattle, *Pharm. Res.* 35 (2018) 66. doi:10.1007/s11095-018-2363-z.
- [38] F.A. Fookes, A. Rigalli, J.A. Luna, Chitosan microparticles containing Sodium Fluoride prepared by fluidized bed technology, in: 4 Th Reun. Int. Ciencias Farm., International Journal of Pharmaceutical Science and Research, Rosario, Santa Fe, Argentina, 2016: p. 1.
- [39] L.N. Mengatto, J.I. Pesoa, N.S. Velázquez, J. a. Luna, Application of simultaneous multiple response optimization in the preparation of thermosensitive chitosan/glycerophosphate hydrogels, *Iran. Polym. J.* 25 (2016) 897–906. doi:10.1007/s13726-016-0475-z.
- [40] F.A. Fookes, L.N. Mengatto, A. Rigalli, J.A. Luna, Controlled fluoride release for osteoporosis treatment using orally administered chitosan hydrogels, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 51 (2019) 268–275. doi:10.1016/j.jddst.2019.03.004.
- [41] F.A. Fookes, L.N. Mengatto, A. Rigalli, J.A. Luna, Hidrogel de quitosano y glicerofosfato de sodio para la liberación oral de fluoruro de sodio. Estudios in vitro e in vivo., in: XII Simp. Argentino Polímeros - SAP, Los Cocos, Cordoba, Argentina, 2017: p. 1.
- [42] N.S. Velázquez, L.N. Turino, J.A. Luna, L.N. Mengatto, Progesterone loaded thermosensitive hydrogel for vaginal application: Formulation and in vitro comparison with commercial product, *Saudi Pharm. J.* (2019). doi:10.1016/j.jsps.2019.09.006.
- [43] A. prieto Padilla, Caracterización Hidrodinámica de un lecho fluido, Universidad Carlos III de Madrid, 2013. [http://enterprise.uc3m.es/redmine/files/101115153006\\_CV\\_MDdelamata.pdf%5Cnhttp://e-archivo.uc3m.es/bitstream/handle/10016/1161/pfc\\_lecho\\_fluidizado.pdf?sequence=1](http://enterprise.uc3m.es/redmine/files/101115153006_CV_MDdelamata.pdf%5Cnhttp://e-archivo.uc3m.es/bitstream/handle/10016/1161/pfc_lecho_fluidizado.pdf?sequence=1).
- [44] D. Kunii, O. Levenspiel, Fluidization Engineering, 2nd Editio, Elsevier, Stoneham, 1991. doi:10.1016/C2009-0-24190-0.

- [45] E. Teunou, D. Poncelet, Batch and continuous fluid bed coating – review and state of the art, *J. Food Eng.* 53 (2002) 325–340. doi:10.1016/S0260-8774(01)00173-X.
- [46] P.D. Hede, *Fluid Bed Particle Processing*, 1st Editio, BookBoon, Bookboon, 2013. <http://www.ltstemplustraining.com/pdfs/fluid-bed-particle-processing.pdf>.
- [47] M. Fernández Cervera, J. Heinämäki, E. Räsänen, O. Antikainen, O. Nieto, A. Iraizoz Colarte, J. Yliruusi, Determination of tackiness of chitosan film-coated pellets exploiting minimum fluidization velocity, *Int. J. Pharm.* 281 (2004) 119–127. doi:10.1016/j.ijpharm.2004.06.004.
- [48] D.M. Parikh, *Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology*, CRC Press, 2005. doi:10.1201/9780849354953.
- [49] B. Guignon, A. Duquenoy, E.D. Dumoulin, FLUID BED ENCAPSULATION OF PARTICLES: PRINCIPLES AND PRACTICE, *Dry. Technol.* 20 (2002) 419–447. doi:10.1081/DRT-120002550.
- [50] K. Dewettinck, A. Huyghebaert, Fluidized bed coating in food technology, *Trends Food Sci. Technol.* 10 (1999) 163–168. doi:10.1016/S0924-2244(99)00041-2.
- [51] S. Srivastava, G. Mishra, Fluid Bed Technology: Overview and Parameters for Process Selection, *Int. J. Pharm. Sci. Drug Res.* 2 (2010) 236–246.
- [52] L.W. Chan, E.S.K. Tang, P.W.S. Heng, Comparative study of the fluid dynamics of bottom spray fluid bed coaters, *AAPS PharmSciTech.* 7 (2006) E45–E53. doi:10.1208/pt070237.
- [53] G. Hudovornik, F. Vrečer, Impact of the curing parameters on drug release from Eudragit RS and RL 30D coated pellets: Design of experiments, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 30 (2015) 146–153. doi:10.1016/j.jddst.2015.09.021.
- [54] B.S. Silva, M. Santangelo, M.J. Colbert, C. Fauteux-Lefebvre, J.A. Bartlett, P.P. Lapointe-Garant, R. Gosselin, Building Process Understanding of Fluid Bed Taste Mask Coating of Microspheres, *AAPS PharmSciTech.* 20 (2019). doi:10.1208/s12249-019-1384-1.

- [55] F. Priese, T. Frisch, B. Wolf, Comparison of film-coated retarded release pellets manufactured by layering technique or by bed rotor pelletization, *Pharm. Dev. Technol.* 20 (2015) 417–425. doi:10.3109/10837450.2013.879883.
- [56] G. Kibria, K.M.A. Islam, R.-U. Jalil, Stability study of ambroxol hydrochloride sustained release pellets coated with acrylic polymer., *Pak. J. Pharm. Sci.* 22 (2009) 36–43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19168418>.
- [57] O.S. Silva, C.R.F. Souza, W.P. Oliveira, S.C.S. Rocha, In Vitro Dissolution Studies of Sodium Diclofenac Granules Coated with Eudragit L-30D-55® by Fluidized-Bed System, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 32 (2006) 661–667. doi:10.1080/03639040600637564.
- [58] H.F. Alotaibi, S. Elsamaligy, G.M. Mahrous, M.A. Bayomi, H.A. Mahmoud, Design of taste masked enteric orodispersible tablets of diclofenac sodium by applying fluid bed coating technology, *Saudi Pharm. J.* 27 (2019) 354–362. doi:10.1016/j.jsps.2018.12.003.
- [59] H.L. Lim, Y. Hwang, M. Kar, S. Varghese, Smart hydrogels as functional biomimetic systems, *Biomater. Sci.* 2 (2014) 603–618. doi:10.1039/C3BM60288E.
- [60] E. Caló, V. V. Khutoryanskiy, Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products, *Eur. Polym. J.* 65 (2015) 252–267. doi:10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024.
- [61] Z. Modrzejewska, K. Nawrotek, W. Maniukiewicz, T. Douglas, Structural characteristics of thermosensitive chitosan glutamate hydrogels in variety of physiological environments, *J. Mol. Struct.* 1074 (2014) 629–635. doi:10.1016/j.molstruc.2014.06.037.
- [62] H. Yan, H. Frielinghaus, A. Nykanen, J. Ruokolainen, A. Saiani, A.F. Miller, Thermoreversible lysozyme hydrogels: properties and an insight into the gelation pathway, *Soft Matter*. 4 (2008) 1313. doi:10.1039/b716966c.
- [63] A. Muxika, A. Etxabide, J. Uranga, P. Guerrero, K. de la Caba, Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications, *Int. J. Biol. Macromol.* 105 (2017) 1358–1368. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.07.087.
- [64] E.L. Mcconnell, S. Murdan, A.W. Basit, An Investigation into the Digestion of Chitosan (

- Noncrosslinked and Crosslinked ) by Human Colonic Bacteria, 97 (2008) 3820–3829.  
doi:10.1002/jps.
- [65] Y. Peng, J. Li, J. Li, Y. Fei, J. Dong, W. Pan, Optimization of thermosensitive chitosan hydrogels for the sustained delivery of venlafaxine hydrochloride, *Int. J. Pharm.* 441 (2013) 482–490. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.11.005.
- [66] C.M. Caramella, S. Rossi, F. Ferrari, M.C. Bonferoni, G. Sandri, Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 92 (2015) 39–52. doi:10.1016/j.addr.2015.02.001.
- [67] H.Y. Zhou, L.J. Jiang, P.P. Cao, J.B. Li, X.G. Chen, Glycerophosphate-based chitosan thermosensitive hydrogels and their biomedical applications, *Carbohydr. Polym.* 117 (2015) 524–536. doi:10.1016/j.carbpol.2014.09.094.
- [68] M.-H. Hsiao, M. Larsson, A. Larsson, H. Evenbratt, Y.-Y. Chen, Y.-Y. Chen, D.-M. Liu, Design and characterization of a novel amphiphilic chitosan nanocapsule-based thermogelling biogel with sustained in vivo release of the hydrophilic anti-epilepsy drug ethosuximide, *J. Control. Release.* 161 (2012) 942–948. doi:10.1016/j.jconrel.2012.05.038.
- [69] Q. Peng, X. Sun, T. Gong, C.-Y. Wu, T. Zhang, J. Tan, Z.-R. Zhang, Injectable and biodegradable thermosensitive hydrogels loaded with PHBHHx nanoparticles for the sustained and controlled release of insulin, *Acta Biomater.* 9 (2013) 5063–5069. doi:10.1016/j.actbio.2012.09.034.
- [70] P.G. Lawrence, P.S. Patil, N.D. Leipzig, Y. Lapitsky, Ionically Cross-Linked Polymer Networks for the Multiple-Month Release of Small Molecules, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 8 (2016) 4323–4335. doi:10.1021/acsami.5b10070.
- [71] G. de trabajo de la S.E. de I.Ó. y M. Mineral, Osteoporosis postmenopáusica. Guía de práctica clínica, *Rev. Española Enfermedades Metabólicas Óseas.* 11 (2002) 41–86.
- [72] C.D. Rubin, C.Y. Pak, B. Adams-Huet, H.K. Genant, J. Li, D.S. Rao, Sustained-release sodium fluoride in the treatment of the elderly with established osteoporosis., *Arch. Intern. Med.* 161 (2001) 2325–33. doi:10.1001 [pii].

- [73] G.G. Polat, O.M. Akgun, B. Simsek, M.A. Saracli, S. Heper, V. Hasircif, Fluoride-containing anti-caries pH-sensitive release system and its effect on streptococcus mutans, *Fluoride*. 49 (2016) 458–466.
- [74] National Research Council, *Fluoride in Drinking Water*, National Academies Press, Washington, D.C., 2006. doi:10.17226/11571.
- [75] R. Ullah, M.S. Zafar, Oral and dental delivery of fluoride: A review, *Fluoride*. 48 (2015) 195–204.
- [76] M.A.R. Buzalaf, A.L. Leite, N.T.A. Carvalho, M.H.C. Rodrigues, E.R. Takamori, D.B. Niconiello, F.M. Levy, V.E.S. Cardoso, Bioavailability of fluoride administered as sodium fluoride or monofluorophosphate to humans, *J. Fluor. Chem.* 129 (2008) 691–694. doi:10.1016/j.jfluchem.2008.06.005.
- [77] D. Sharma, A. Singh, K. Verma, S. Paliwal, S. Sharma, J. Dwivedi, Fluoride: A review of pre-clinical and clinical studies, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 56 (2017) 297–313. doi:10.1016/j.etap.2017.10.008.
- [78] I. Menoyo, A. Rigalli, R.C. Puche, Effect of fluoride on the secretion of insulin in the rat, *Arzneimittel-Forschung/Drug Res.* 55 (2005) 455–460.
- [79] A. Rigalli, C. Aguirre, M. Armendáriz, G. Cassiraga, *Formulación de modelos matemáticos de fenómenos biológicos, 1ª*, UNR EDITORA - Universidad Nacional de Rosario, Rosario. Argentina, 2003.
- [80] M.L. Xiao, *Study of drug release behaviour from HPMC matrix tablets and EC coated matrix reservoir system*, Fudan University (China), 2005.
- [81] P. Costa, J.M. Sousa Lobo, Modeling and comparison of dissolution profiles, *Eur. J. Pharm. Sci.* 13 (2001) 123–133. doi:10.1016/S0928-0987(01)00095-1.
- [82] D. Reddy, Formulation and in vitro evaluation of antineoplastic drug loaded nanoparticles as drug delivery system, *African J. Pharm. Pharmacol.* 7 (2013) 1592–1604. doi:10.5897/AJPP2013.3436.

- [83] R.W. Korsmeyer, R. Gurny, E. Doelker, P. Buri, N.A. Peppas, Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers, *Int. J. Pharm.* 15 (1983) 25–35. doi:10.1016/0378-5173(83)90064-9.
- [84] R.E. Harris, *Quitosanto, un biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de Fármacos*, Universidad Complutense de Madrid, 2010. doi:10.1016/S0141-0229(03)00220-5.L.
- [85] L.D. Simionato, L. Petrone, M. Baldut, S.L. Bonafede, A.I. Segall, Comparison between the dissolution profiles of nine meloxicam tablet brands commercially available in Buenos Aires, Argentina, *Saudi Pharm. J.* 26 (2018) 578–584. doi:10.1016/j.jsps.2018.01.015.
- [86] R.C. Team, A language and environment for statistical computing, *R Found. Stat. Comput.* 1 (2006) 2673. doi:10.1890/0012-9658.
- [87] J.M. Cimbala, Y. a. Cengel, *Mecánica de Fluidos: Fundamentos y Aplicaciones*, McGrawHill. Primera Ed (2001) 10–11. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- [88] C. Wu, J.W. McGinity, Influence of relative humidity on the mechanical and drug release properties of theophylline pellets coated with an acrylic polymer containing methylparaben as a non-traditional plasticizer, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50 (2000) 277–284. doi:10.1016/S0939-6411(99)00088-0.
- [89] M.T. Cook, G. Tzortzis, V. V. Khutoryanskiy, D. Charalampopoulos, Layer-by-layer coating of alginate matrices with chitosan–alginate for the improved survival and targeted delivery of probiotic bacteria after oral administration, *J. Mater. Chem. B.* 1 (2013) 52–60. doi:10.1039/C2TB00126H.
- [90] Y. Yang, L. Shen, F. Yuan, H. Fu, W. Shan, Preparation of sustained release capsules by electrostatic dry powder coating, using traditional dip coating as reference, *Int. J. Pharm.* 543 (2018) 345–351. doi:10.1016/j.ijpharm.2018.03.047.
- [91] E. Moghimipour, M. Rezaei, M. Kouchak, J. Fatahiasl, K.A. Angali, Z. Ramezani, M. Amini, F.A. Dorkoosh, S. Handali, Effects of coating layer and release medium on release

- profile from coated capsules with Eudragit FS 30D: an in vitro and in vivo study, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 44 (2018) 861–867. doi:10.1080/03639045.2017.1415927.
- [92] P. Pawar, P. Sharma, A. Chawla, R. Mehta, Formulation and in vitro evaluation of Eudragit S-100 coated naproxen matrix tablets for colon-targeted drug delivery system, *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 4 (2013) 31. doi:10.4103/2231-4040.107498.
- [93] A. Rigalli, L. Pera, V. Di Loreto, L. Brun, Determinación de la concentración de flúor en muestras biológicas, I, Universidad Nacional de Rosario, Rosario. Argentina, 2007. <http://hdl.handle.net/2133/6701>.
- [94] M. Pašić, G. Betz, Š. Hadžidedić, S. Kocova El-Arini, H. Leuenberger, Investigation and development of robust process for direct pelletization of lansoprazole in fluidized bed rotary processor using experimental design, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 20 (2010) 367–376. doi:10.1016/S1773-2247(10)50061-3.
- [95] C. Igathinathane, L.O. Pordesimo, E.P. Columbus, W.D. Batchelor, S.R. Methuku, Shape identification and particles size distribution from basic shape parameters using ImageJ, *Comput. Electron. Agric.* 63 (2008) 168–182. doi:10.1016/j.compag.2008.02.007.
- [96] L.S.C. Wan, P.W.S. Heng, G. Muhuri, Incorporation and distribution of a low dose drug in granules, *Int. J. Pharm.* 88 (1992) 159–163. doi:10.1016/0378-5173(92)90312-P.
- [97] G. Singh Rekhi, R. Sidwell, Sizing of Granulation, in: 2005: pp. 491–512. doi:10.1201/9780849354953.ch17.
- [98] M.M. Fernández Escobar, Desarrollo de geles a base de quitosano para su aplicación en lesiones cutáneas, Universidad de Concepción, 2006.
- [99] T. Zhu, T. Zhu, J. Gao, L. Zhang, W. Zhang, Enhanced adsorption of fluoride by cerium immobilized cross-linked chitosan composite, *J. Fluor. Chem.* 194 (2017) 80–88. doi:10.1016/j.jfluchem.2017.01.002.
- [100] R. Huang, B. Yang, Q. Liu, K. Ding, Removal of fluoride ions from aqueous solutions using protonated cross-linked chitosan particles, *J. Fluor. Chem.* 141 (2012) 29–34. doi:10.1016/j.jfluchem.2012.05.022.

- [101] N. Viswanathan, C.S. Sundaram, S. Meenakshi, Removal of fluoride from aqueous solution using protonated chitosan beads, *J. Hazard. Mater.* 161 (2009) 423–430. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.03.115.
- [102] H. Hu, L. Yang, Z. Lin, Y. Zhao, X. Jiang, L. Hou, A low-cost and environment friendly chitosan/aluminum hydroxide bead adsorbent for fluoride removal from aqueous solutions, *Iran. Polym. J. (English Ed.)* 27 (2018) 253–261. doi:10.1007/s13726-018-0605-x.
- [103] D. Geldart, Types of gas fluidization, *Powder Technol.* 7 (1973) 285–292. doi:10.1016/0032-5910(73)80037-3.
- [104] J. Kristensen, Direct Pelletization in a Rotary Processor Controlled by Torque Measurements . III . Investigation of Microcrystalline Cellulose and Lactose Grade, 6 (2005) 495–503.
- [105] B. Rambali, L. Baert, D. Massart, Using experimental design to optimize the process parameters in fluidized bed granulation on a semi-full scale, *Int. J. Pharm.* 220 (2001) 149–160. doi:10.1016/S0378-5173(01)00658-5.
- [106] C.M. Laot, E. Marand, H.T. Oyama, Spectroscopic characterization of molecular interdiffusion at a poly(vinyl pyrrolidone)/vinyl ester interface, *Polymer (Guildf.)* 40 (1999) 1095–1108. doi:10.1016/S0032-3861(98)80003-7.
- [107] J. Fernandez Aragon, R. González Santos, G. Estévez Fuentes, Cinética de liberación de cefalexiana desde un biomaterial compuesto, *An. R. Acad. Nac. Farm.* 75 (2009) 345–363.
- [108] C.N. Patra, R. Priya, S. Swain, G. Kumar Jena, K.C. Panigrahi, D. Ghose, Pharmaceutical significance of Eudragit: A review, *Futur. J. Pharm. Sci.* 3 (2017) 33–45. doi:10.1016/j.fjps.2017.02.001.
- [109] S. SHARMA, N. SETH, Exploring the Potential of Eudragit for Development of Microparticles of Water Soluble Drug Using Quality By Design Approach, *Int. J. Appl. Pharm.* 11 (2019) 110–116. doi:10.22159/ijap.2019v11i4.32816.



- [110] H. Piao, S. Liu, H. Piao, X. Li, F. Cui, Development of an osmotically-driven pellet coated with acrylic copolymers (Eudragit® RS 30 D) for the sustained release of oxyamtrine, a freely water soluble drug used to treat stress ulcers (I): in vitro and in vivo evaluation in rabbits, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 39 (2013) 1230–1237. doi:10.3109/03639045.2012.707206.
- [111] G. Kibria, M.A. Roni, M.S. Absar, R. Jalil, Effect of Plasticizer on Release Kinetics of Diclofenac Sodium Pellets Coated with Eudragit RS 30 D, *AAPS PharmSciTech.* 9 (2008) 1240–1246. doi:10.1208/s12249-008-9163-4.
- [112] M. Gibaldi, S. Feldman, Establishment of sink conditions in dissolution rate determinations. Theoretical considerations and application to nondisintegrating dosage forms, *J. Pharm. Sci.* 56 (1967) 1238–1242. doi:10.1002/jps.2600561005.
- [113] P.A.G. Soares, A.I. Bourbon, A.A. Vicente, C.A.S. Andrade, W. Barros, M.T.S. Correia, A. Pessoa, M.G. Carneiro-da-Cunha, Development and characterization of hydrogels based on natural polysaccharides: Policaju and chitosan, *Mater. Sci. Eng. C.* 42 (2014) 219–226. doi:10.1016/j.msec.2014.05.009.
- [114] Z. Modrzejewska, A. Skwarczyńska, W. Maniukiewicz, T.E.L. Douglas, Mechanism of formation of thermosensitive chitosan chloride hydrogels, *Prog. Chem. Appl. Chitin Its Deriv.* 19 (2014) 125–134. doi:10.15259/PCACD.19.15.
- [115] A. Deng, X. Kang, J. Zhang, Y. Yang, S. Yang, Enhanced gelation of chitosan/ $\beta$ -sodium glycerophosphate thermosensitive hydrogel with sodium bicarbonate and biocompatibility evaluated, *Mater. Sci. Eng. C.* 78 (2017) 1147–1154. doi:10.1016/j.msec.2017.04.109.
- [116] M.L. Olivares, G.A. Sihufe, M.L. Capra, A.C. Rubiolo, S.E. Zorrilla, Effect of protective atmospheres on physicochemical, microbiological and rheological characteristics of sliced Mozzarella cheese, *LWT.* 47 (2012) 465–470. doi:10.1016/j.lwt.2012.02.008.
- [117] M. Mehmet Ak, S. Gunasekaran, *Cheese Rheology and Texture*, CRC Press, 2002. doi:10.1201/9781420031942.

- [118] S. Supper, N. Anton, J. Boisclair, N. Seidel, M. Riemenschmitter, C. Curdy, T. Vandamme, Chitosan/glucose 1-phosphate as new stable in situ forming depot system for controlled drug delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 88 (2014) 361–373. doi:10.1016/j.ejpb.2014.05.015.
- [119] C. Schorsch, C. Garnier, J.-L. Dublier, Viscoelastic properties of xanthangalactomannan mixtures: comparison of guar gum with locust bean gum, *Carbohydr. Polym.* 34 (1997) 165–175. doi:10.1016/S0144-8617(97)00095-7.
- [120] A. Chenite, Rheological characterisation of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions, *Carbohydr. Polym.* 46 (2001) 39–47. doi:10.1016/S0144-8617(00)00281-2.
- [121] M.R.C. Marques, R. Loebenberg, M. Almukainzi, Simulated Biological Fluids with Possible Application in Dissolution Testing, *Dissolution Technol.* 18 (2011) 15–28. doi:10.14227/DT180311P15.
- [122] E.L. McConnell, A.W. Basit, S. Murdan, Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments, *J. Pharm. Pharmacol.* 60 (2008) 63–70. doi:10.1211/jpp.60.1.0008.
- [123] J.-R. Malagelada, G.F. Longstreth, W.H.J. Summerskill, V.L.W. Go, Measurement of Gastric Functions During Digestion of Ordinary Solid Meals in Man, *Gastroenterology.* 70 (1976) 203–210. doi:10.1016/S0016-5085(76)80010-8.
- [124] G.M. Keegan, J.D. Smart, M.J. Ingram, L.-M. Barnes, G.R. Burnett, G.D. Rees, Chitosan microparticles for the controlled delivery of fluoride, *J. Dent.* 40 (2012) 229–240. doi:10.1016/j.jdent.2011.12.012.
- [125] S. Nguyen, C. Escudero, N. Sediqi, G. Smistad, M. Hiorth, Fluoride loaded polymeric nanoparticles for dental delivery, *Eur. J. Pharm. Sci.* 104 (2017) 326–334. doi:10.1016/j.ejps.2017.04.004.
- [126] S.B. Butani, Development and Optimization of Venlafaxine Hydrochloride Sustained Release Triple Layer Tablets Adopting Quality by Design Approach, *Pharmacol. & Pharm.* 04 (2013) 9–16. doi:10.4236/pp.2013.43A002.

- [127] J. Murphy, J.P. Riley, A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters, *Anal. Chim. Acta.* 27 (1962) 31–36. doi:10.1016/S0003-2670(00)88444-5.
- [128] National Research Council, Pharmacokinetics of Fluoride, in: *Fluoride Drink. Water A Sci. Rev. EPA's Stand.*, The National Academies Press, Washington, DC, 2006: p. 530. doi:10.17226/11571.
- [129] B.L. O'Dell, *Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements*, CRC Press, 1997. doi:10.1201/9781482273106.
- [130] C. Tuleu, C. Andrieux, P. Boy, J.C. Chaumeil, Gastrointestinal transit of pellets in rats: effect of size and density., *Int. J. Pharm.* 180 (1999) 123–31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10089299>.
- [131] V. Loreto, A. Rigalli, R. Puche, Effect of Sodium Fluoride Administration to Rats on Bone Phosphorous Content and Phosphatemia, *Arzneimittelforschung.* 56 (2011) 760–766. doi:10.1055/s-0031-1296787.