



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

Facultad de Farmacia

Departamento de Farmacia y Tecnología
Farmacéutica y Parasitología

Programa de Doctorado en Biomedicina y Farmacia

Desarrollo y aplicaciones de hidrogeles para la administración y liberación modificada de fármacos

TESIS DOCTORAL

María Teresa Martínez Martínez

Directoras:

Dra. Virginia Merino Sanjuán
Dra. Marta González Álvarez
Dra. María del Val Bermejo Sanz

Valencia, 2016



Dña. VIRGINIA MERINO SANJUÁN, Profesora Titular de la Universidad de Valencia, Dña. MARTA GONZÁLEZ ÁLVAREZ, Profesora Contratada Doctor de la Universidad Miguel Hernández de Elche, y Dña. MARÍA DEL VAL BERMEJO SANZ, Catedrática de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado **“Desarrollo y aplicaciones de hidrogeles para la administración y liberación modificada de fármacos”**, presentado por Dña. María Teresa Martínez Martínez para optar al grado de Doctor, ha sido realizado bajo su dirección y asesoramiento y que, habiéndose concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizan la presentación de esta Tesis Doctoral para que sea juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firman el presente certificado en Valencia, a 7 de diciembre de 2016.

Fdo. Virginia
Merino Sanjuán

Fdo. Marta
González Álvarez

Fdo. María del Val
Bermejo Sanz

En primer lugar, agradecer al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte la financiación recibida para la realización de esta tesis doctoral a través de su programa de ayudas para la Formación de Profesorado Universitario.

Me gustaría agradecer a mis directoras, Marta, Virginia y Marival haberme permitido formar parte de vuestro grupo de investigación. Marta, gracias por haber creído en mí desde el principio, por tu apoyo, tu ayuda con los experimentos, por tu implicación y amistad. Virginia, gracias por tus enseñanzas, por tu paciencia con los trámites administrativos y correcciones y por tu guía en el experimental. Marival, gracias por tu ayuda y enhorabuena por este estupendo grupo que has formado.

A Isabel, que aunque no constes como tutora te siento como tal. Has sido mi profesora y mi amiga; has resuelto mis dudas a cualquier hora, tu sabes cuánto me has ayudado con los animales, se nos ha hecho de noche juntas en el labo entre trabajo y conversaciones, siempre alegre y dispuesta. Es una suerte encontrar gente como tú en el camino. Muchas gracias, de verdad.

Son muchos los compañeros y amigos con los que he tenido el placer de trabajar y compartir experiencias, nuestro Dream Team: Sarín, Isa, Víctor, Vero, Alejandro, Nacho, Andrés, Tere, Adrián, Estela y José Manuel.

Sarín, tu compañía y amistad fueron fundamentales para mí en los inicios de este camino y tus enseñanzas en el laboratorio esenciales para mi formación como investigadora. A pesar de la distancia que nos separa, sabes que siempre podrás contar conmigo.

Isa, después de 13 años desde que iniciamos nuestra aventura en el J'Hayton, hemos compartido grupo de amigos, clases de instituto, universidad y doctorado; hemos vivido nuestra evolución de adolescentes a doctoras!, siempre apoyándonos y ayudándonos. Sabes que siempre puedes contar conmigo.

Víctor, nuestro doctorando mayor, siempre has estado dispuesto a ayudarnos y aconsejarnos en todo lo que hemos necesitado, gracias.

Vero, nuestra murcianica, el alma de las fiestas, junto a ti di los primeros pasos de pipeteo y preparación de muestras para el HPLC... gracias por ser como eres y por hacernos reír y disfrutar con tu alegría.

Alejandro, nuestro mago, la otra alegría de las fiestas, desde siempre te recuerdo ayudando a los demás, apoyándonos, siempre con una palabra positiva y con un

abrazo cuando se necesita. Gracias por ser como eres. Suerte en la tesis.

Nacho, iniciamos juntos el doctorado y, aunque ahora ya no coincidimos, te agradezco tu ayuda cuando la he necesitado, tanto en trámites como en viajes a Valencia. Gracias y mucha suerte en tu final de tesis.

Andrés, has sido un buen amigo que me ha apoyado y acompañado durante muchas horas de labo. Muchas gracias por todas las veces que me has echado una mano y me has evitado viajes. Suerte en tu final de tesis.

Tere, gracias por los momentos vividos, te deseo mucha suerte, ilicitana.

Adrián, siempre te he considerado un chico que lucha por lo que quiere y eso te llevará lejos en la vida. Gracias por todo, suerte en la tesis.

Estela, aunque ya no estés en el grupo sabes que para mí eres una más; eres una buena persona y una buena amiga. Gracias por todos los momentos que hemos compartido, espero que mis consejos te hayan ayudado.

José Manuel, ha sido un placer conocerte y compartir vivencias, gracias.

Migue y Alcides, nuestros cubanos, os quiero agradecer vuestra ayuda cuando la he necesitado. Alcides, gracias por tu apoyo y amistad.

Le agradezco al Prof. Avelino Corma que me permitiera realizar una estancia en el Instituto de Tecnología Química (UPV-CSIC), en el marco de la colaboración para el desarrollo de hidrogeles para liberación controlada.

En Burjassot he tenido la oportunidad de conocer a gente estupenda que me ha hecho sentir como en casa: Iris, mi compi del labo de al lado, me has ayudado a preparar las clases, me has apoyado y acompañado, te agradezco tu ayuda y tu amistad. Laura, te agradezco todos los momentos que hemos compartido y tu disposición siempre a ayudar a los demás, eres un encanto. Debora, desde el principio tu luz y alegría me llamó la atención, en poco tiempo nos hicimos grandes amigas. Pasamos momentos mágicos en tu visita a Roma y seguimos manteniendo la amistad a pesar de la distancia. Gracias por tu cariño y por estar siempre ahí.

Me gustaría agradecer a Mati, Lucía, M^a José, Ana, Raquel y al resto de profesores, técnicos y administrativas del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología de la UV su ayuda cuando la he necesitado. Un cariño especial también a Pilar Abad.

Quisiera agradecer a Pedro y Emilio, de la UMH, su ayuda, apoyo y amistad, por escucharme y hacerme sentir valorada. También me gustaría agradecer al personal del animalario de San Juan (UMH) su enorme ayuda y disponibilidad, en especial a José Antonio, Paco, Emilio, Darío y Eva, quienes siempre me han recibido con una sonrisa y me han hecho sentir parte de su pequeña familia. Las visitas al animalario han sido un placer gracias a vuestra compañía y amistad, sois un gran equipo. Agradecer también a Inma Noguera e Inma Ballester, del animalario de Burjassot (UV), su amabilidad y ayuda con los experimentos con animales.

Special thanks to the group of the Department of Chemistry and Pharmaceutical Technology at Sapienza University in Rome: Prof. Franco Alhaique, Dr. Pietro Matricardi, Dr. Chiara di Meo, Claudia, Sabrina, Anna Laura, Pauline, Giulia, Virginia and Elita, for the warm welcome into your group; your kindness and help were very important for me at that stage. I have very nice memories of each of you: Anna Laura and Claudia trying to teach me italian...; Chiara, an excelent supervisor; Pauline, Giulia, Virginia, Elita, so nice and friendly. Pietro, always with a smile, always with a kind word, thank you for everything. Sabrina, thank you for your friendship and for your help with the thesis.

A mis amigos, en especial a Juan Jesús, Marisa y Paco, por vuestro cariño y apoyo, por estar siempre cuando os necesito.

A mi familia, a mis tíos y primos; a mi abuela. Conforme te haces mayor valoras más la importancia de tener una familia que te quiere y te apoya, que nunca te deja de lado. A Montse, que te siento como si fueras de mi familia, muchísimas gracias por tu acogida, por tu cariño, por tus atenciones... Muchas gracias a todos, os quiero.

A mis padres y mi hermana, qué puedo deciros, sabéis cuánto os quiero, sabéis que lo daría todo por vosotros. Muchas gracias por vuestro eterno apoyo y amor.

A Guillermo, sólo tengo palabras de agradecimiento para ti... no sólo me has ayudado con la tesis, explicándome la química y respondiendo pacientemente todas mis dudas, sino que durante estos años me has ayudado a crecer, superarme y aprender. Siempre has estado ahí, apoyándome, escuchándome, entendiéndome... gracias por todo, te quiero.

Gracias a todos, de corazón.

Abreviaturas

% EE: eficiencia de encapsulación
AIC: criterio de información de Akaike
ANOVA: análisis de varianza
APM: alto peso molecular
AUC: área bajo la curva
BCS: Sistema de Clasificación Biofarmacéutico
BPM: bajo peso molecular
Br-Rfv: 2'3'4'5'-tetrabutiril-3-(6-bromohexil)riboflavina
c.s.p: cantidad suficiente para
C: concentración
CAC: concentración de agregación crítica
Caco-2: células de carcinoma de colon humano
Cl: aclaramiento
CMC: carboximetilcelulosa
CPT: camptotecina
Cs: concentración de saturación
DLS: dispersión dinámica de la luz
DMSO: dimetilsulfóxido
Do: número de dosis
DTG: primera derivada de la curva de TGA
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
EMA: Agencia Europea del Medicamento
EPR: efecto de permeabilidad y retención aumentada
f2: factor de similitud
FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos
FESEM: microscopía electrónica de barrido de emisión de campo
FFLI: formas farmacéuticas de liberación inmediata
FFLM: formas farmacéuticas de liberación modificada
GD: grado de desacetilación
HA: ácido hialurónico / hialuronato
HA-Rfv: hialuronato modificado con riboflavina
HA-rho: hialuronato marcado con rodamina
HA-TBA: sal de hialuronato de tetrabutilamonio
HBSS: solución salina equilibrada de Hanks
HEPES: ácido N-2-hidroxietilpiperazina, N-2-etanosulfónico (tampón)

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución
ICP-MS: espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente
IPN: hidrogeles interpenetrados
 K_{∞} : constante de hinchamiento
 k_{ap} : constante aparente de velocidad de absorción
 k_{el} : constante de eliminación
 K_p : constante de permeabilidad
LC-MS: cromatografía líquida-espectrometría de masas
MPM: medio peso molecular
MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
MTX: metotrexato
NHs: nanohidrogeles
NHs-rho: nanohidrogeles marcados con rodamina
NLC: transportadores lipídicos nanoestructurados
NMP: *N*-metil-2-pirrolidona
NS: no existen diferencias estadísticamente significativas
p/v: peso/volumen
PBS: tampón fosfato salino
PDI: índice de polidispersión
 P_{eff} : permeabilidad efectiva
PEG: polietilenglicol
PHEMA: poli(2-hidroxietil metacrilato)
PLA: ácido poliláctico
PLGA: copolímero de ácido poli(láctico-co-glicólico)
PM: peso molecular
PSA: polímeros superabsorbentes
PVA: alcohol de polivinilo
 Q_{∞} : hinchamiento en equilibrio
 Q_t : hinchamiento a un tiempo t
 r : coeficiente de correlación
 r^2 : coeficiente de determinación
Rfv-Br: 2'3'4'5'-tetrabutiril-3-(6-bromohexil)riboflavina
RMN: resonancia magnética nuclear
rpm: revoluciones por minuto
S: existen diferencias estadísticamente significativas

SEM: microscopía electrónica de barrido

SSR: suma de cuadrados residuales

$t_{1/2}$: semivida biológica

T^a / T^a amb: temperatura / temperatura ambiente

TEER: resistencia eléctrica transepitelial

TER: resistencia eléctrica transcutánea

TGA: análisis termogravimétrico

THPC: cloruro de tetraquis(hidroximetil)fosfonio

$T_{m\acute{a}x}$: temperatura de máxima descomposición térmica

Top1: topoisomerasa 1

V_d : volumen de distribución

β -GP: β -glicerol fosfato

λ : longitud de onda

Resumen
Abstract

Resumen

Los hidrogeles son redes poliméricas tridimensionales obtenidas a partir de polímeros hidrófilos que pueden hincharse en un medio acuoso sin disolverse. Estos sistemas presentan una serie de propiedades óptimas para su aplicación en el campo biomédico. De hecho, en las últimas décadas se han investigado, patentado y comercializado distintas composiciones basadas en hidrogeles como sistemas de liberación de fármacos, apósitos para heridas, etc. La versatilidad de los hidrogeles radica en que sus propiedades y, por tanto, sus posibles aplicaciones, pueden modificarse en función del tipo de entrecruzamiento (físico o químico), naturaleza del polímero, agente entrecruzante, tamaño del sistema (hidrogeles, microgeles, nanogeles), etc.

Por todo ello, el objetivo de esta tesis ha sido obtener hidrogeles mediante distintos tipos de entrecruzamiento y estudiar sus potenciales aplicaciones como sistemas de liberación de fármacos.

En el capítulo 1 se realiza una amplia exposición de la información publicada sobre los hidrogeles, estudiando los tipos de polímeros que forman parte de su estructura, la clasificación de los hidrogeles atendiendo principalmente a los tipos de entrecruzamiento, sus principales características físicas y biofarmacéuticas como hinchamiento, mucoadhesividad y las particularidades de la liberación de los fármacos albergados en su interior, así como sus numerosas aplicaciones como sistemas para la liberación modificada de fármacos, ingeniería tisular, apósitos para heridas, lentes de contacto y productos de higiene.

En los siguientes capítulos, se exponen los trabajos para la obtención de tres modelos de hidrogeles mediante entrecruzamiento químico y físico de polímeros naturales. Los distintos tipos de hidrogeles se han caracterizado por diversas técnicas y se ha estudiado, mediante ensayos *in vitro*, *in situ* e *in vivo*, su aplicación como sistemas de liberación de fármacos para la vía oral, tópica e intravenosa.

En el capítulo 2 se presentan los resultados del empleo de cloruro de tetraquis(hidroximetil)fosfonio como agente entrecruzante para la obtención de hidrogeles covalentes basados en quitosán. Estos hidrogeles, obtenidos por reacción entre los grupos amino del quitosán y los grupos hidroximetilo del reticulante, muestran un hinchamiento de orden dos, dependiente de pH, poseen baja toxicidad,

son biocompatibles, mucoadhesivos y permiten una liberación prolongada del fármaco encapsulado, camptotecina, durante 48 horas. Este antitumoral se ha estudiado como fármaco de interés para el desarrollo de estrategias de administración en quimioterapia oral. De acuerdo con los resultados obtenidos, la administración oral de camptotecina mediante hidrogeles proporcionaría bajas concentraciones de fármaco en el lugar de absorción, evitando la saturación de los transportadores y reduciendo su toxicidad intestinal.

En el capítulo 3 se resumen los trabajos de obtención de hidrogeles iónicos a partir de quitosán entrecruzado con un reticulante aniónico. Dicha formulación se obtiene por interacción iónica del polímero catiónico con los aniones del reticulante. Los hidrogeles resultantes carecen de toxicidad, no provocan irritación dérmica, son fácilmente extensibles y tienen una fuerza de adhesión adecuada para ser aplicados como película polimérica sobre la piel. Esta formulación presenta una cinética de liberación de orden uno y puede aplicarse como vehículo para la administración tópica de sustancias o como apósito para favorecer la cicatrización de la piel.

En el capítulo 4 se estudia la obtención de nanohidrogeles autoensamblados basados en hialuronato modificado hidrofóbicamente con riboflavina. Estos nanohidrogeles presentan unas dimensiones adecuadas (200 nm) para ser administrados por vía intravenosa. Además, permiten prolongar el tiempo de retención en sangre hasta 48 horas frente al polímero de partida que a las 24 horas se ha eliminado de sangre casi por completo. Este sistema ha resultado ser útil como vehículo para la administración de fármacos por vía intravenosa ya que aumenta la permanencia del principio activo en sangre, frente al fármaco administrado en solución.

Abstract

Hydrogels are three-dimensional networks of hydrophilic polymers that are able to swell in aqueous media without dissolving. These systems have optimal properties for their application in the biomedical field. In fact, in last decades different hydrogel compositions have been investigated, patented and marketed as drug delivery systems, wound dressings, etc. The versatility of the hydrogels is based on the fact that their properties, and hence their possible applications, can be modified depending on the type of crosslinking (physical or chemical), polymer source, crosslinking agent, size of the system (hydrogels, microgels, nanogels), among others.

Therefore, the aim of the thesis was to obtain hydrogels using different types of crosslinking and to study their potential applications as drug delivery systems.

In chapter 1, an extensive presentation of the published information about hydrogels is done: kinds of polymers that form part of their structure, hydrogel classification mainly according to different types of crosslinking, its main physical and biopharmaceutical characteristics (swelling, mucoadhesiveness and drug release characteristics) and their numerous applications as modified drug delivery systems, tissue engineering, wound dressings, contact lenses and hygiene products.

In the following chapters, different works for the obtainment of three hydrogel models based on chemical and physical crosslinked natural polymers are exposed. The different types of hydrogels have been characterized by various techniques and their application as drug delivery systems for oral, topical and intravenous administration have been studied by *in vitro*, *in situ* and *in vivo* assays.

In chapter 2, results of the employment of tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium chloride as crosslinking agent to obtain covalent hydrogels based on chitosan are showed. These hydrogels are obtained by reaction of the amino groups of chitosan with the hydroxymethyl groups of the crosslinker molecule. They show a pH sensitive second order swelling kinetic, have low toxicity, are biocompatible, mucoadhesive and allow a modified release of the encapsulated drug, camptothecin, for 48 hours. This antitumor drug has been studied as a drug of interest to develop oral chemotherapy administration strategies. According to the obtained results, oral administration of camptothecin through hydrogels would provide low

concentrations of drug at the absorption site, avoiding carrier saturation and reducing its intestinal toxicity.

In chapter 3, studies of ionic hydrogels based on chitosan crosslinked with an anionic crosslinker are shown. This formulation is obtained by ionic interaction of cationic groups of polymer with anionic groups of crosslinker. These hydrogels are non-toxic, do not cause dermal irritation, are easy to extend and have an adequate adhesion force to be applied as polymeric film over the skin. This formulation exhibits a first order release kinetic and can be applied as drug vehicle for topical administration or as wound dressing for wound healing.

In chapter 4, the achievement of auto-assembled nanohydrogels based on hyaluronan hydrophobically modified with riboflavin are studied. These nanohydrogels have adequate size (200 nm) to be administered intravenously. In addition, they allow to prolong their retention time in blood up to 48 hours in comparison to the starting polymer which is removed almost completely from blood in 24 hours. This system is useful as a drug vehicle for intravenous administration because it increases drug retention in blood, compared to the drug administered in solution.

Prólogo
Prologue

Prólogo

Los hidrogeles son sistemas formados por polímeros entrecruzados con propiedades idóneas para su aplicación en diversos campos biomédicos. Siguiendo distintas estrategias sintéticas se pueden obtener hidrogeles con diferentes características y aplicabilidad. Así, una de las principales clasificaciones de los hidrogeles se basa en el tipo de entrecruzamiento de la red polimérica, pudiendo obtenerse hidrogeles químicos con enlaces covalentes o hidrogeles físicos reticulados por distintos tipos de interacciones (iónicas, hidrófobas, enlaces de hidrógeno, etc.).

El empleo de procesos de reticulación sin solventes orgánicos, codisolventes o técnicas que puedan afectar a la estructura o funcionalidad de fármacos, macromoléculas y células permite simultanear la obtención de los hidrogeles de baja toxicidad con el cargado de dichos elementos en su interior. Asimismo, el uso de polímeros naturales, y en concreto polisacáridos, permite la formación de hidrogeles biocompatibles, biodegradables, no tóxicos y con propiedades óptimas para su aplicación como sistemas de liberación de fármacos.

En la presente Tesis Doctoral se aborda el estudio de hidrogeles de quitosán y de ácido hialurónico como sistemas de liberación de fármacos con distintas aplicaciones y modos de administración, atendiendo a sus características derivadas del tipo de entrecruzamiento seleccionado: reticulación del quitosán covalentemente mediante tetraquis(hidroximetil)fosfonio e iónicamente mediante un reticulante aniónico y modificación hidrofóbica del hialuronato para promover su autoensamblaje. Respecto al trabajo de investigación sobre hidrogeles iónicos, en fecha 16/11/2016 se presentó la solicitud de patente con título "FORMULACIÓN PARA LIBERACIÓN MODIFICADA DE SUSTANCIAS ACTIVAS O FÁRMACOS, USO Y PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN" ante la Oficina Española de Patentes y Marcas con número de registro P201631463.

Prologue

Hydrogels are formed by crosslinked polymers with suitable properties for application in various biomedical fields. Following various synthetic strategies it is possible to obtain hydrogels with different characteristics and applicability. Thus, a major classification of hydrogels is based on the type of crosslinking of the polymer network, obtaining chemical hydrogels with covalent bonds or physical hydrogels crosslinked by different types of interactions (ionic, hydrophobic, hydrogen bonds, etc.).

The use of crosslinking processes without organic solvents, co-solvents or techniques that may affect the structure or functionality of drugs, macromolecules and cells allows the simultaneous achievement of low toxicity hydrogels with the loading of different elements inside. In addition, the use of natural polymers, in particular polysaccharides, allows the formation of biocompatible, biodegradable and non-toxic hydrogels with optimal properties for their application as drug delivery systems.

In this PhD Thesis, chitosan and hyaluronic acid based hydrogels are studied as drug delivery systems with different applications and administration methods, according to their characteristics derived from the selected crosslinking type: chitosan covalently crosslinked with tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium and ionically crosslinked with an anionic crosslinker, and hydrophobic modification of hyaluronan to induce its self-assembly. Regarding to the research work about ionic hydrogels, on 16/11/2016 the patent application entitled “FORMULACIÓN PARA LIBERACIÓN MODIFICADA DE SUSTANCIAS ACTIVAS O FÁRMACOS, USO Y PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN” was submitted to the Spanish Patent and Trademark Office with registration number P201631463.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	i
Resumen / Abstract	vii
Prólogo / Prologue.....	xiii
Objetivos / Objectives.....	1
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	5
I. POLÍMEROS	9
1. Quitosán	11
2. Ácido hialurónico	14
II. CONCEPTO DE HIDROGELES Y NANOHIIDROGELES	19
1. Hidrogeles	19
2. Nanohidrogeles	21
III. CLASIFICACIÓN DE LOS HIDROGELES	23
1. Hidrogeles entrecruzados químicamente.....	25
1.1. Polimerización radicalaria	26
1.2. Grupos funcionales reactivos	27
1.3. Método enzimático	30
2. Hidrogeles entrecruzados físicamente	31
2.1. Interacciones iónicas	32
2.2. Cristalización.....	34
2.3. Copolímeros anfifílicos	35
2.4. Enlaces de hidrógeno	37
2.5. Interacciones proteicas	38
IV. CARACTERÍSTICAS DE LOS HIDROGELES.....	41

1. Hinchamiento	41
1.1. Cinéticas de hinchamiento	43
1.2. Efecto de sobrehinchamiento	44
2. Liberación modificada	45
2.1. Capacidad de albergar fármacos	45
2.2. Mecanismos de liberación desde hidrogeles	45
2.2.1. Liberación controlada por difusión	46
2.2.2. Liberación controlada por hinchamiento	47
2.2.3. Liberación controlada químicamente	48
2.3. Modelos matemáticos de cinéticas de liberación	49
3. Mucoadhesividad	51
V. APLICACIONES DE LOS HIDROGELES	55
1. Sistemas de liberación de fármacos	55
1.1. Administración peroral	58
1.1.1. Administración en la cavidad bucal/sublingual	58
1.1.2. Administración oral	59
1.2. Administración sobre la piel: tópica y transdérmica	61
1.2.1. Administración tópica	62
1.2.2. Administración transdérmica	62
1.3. Administración rectal	64
1.4. Administración vaginal	65
1.5. Administración oftálmica	66
1.6. Administración ótica	68
1.7. Administración nasal	68
1.8. Administración parenteral	69
1.8.1. Administración subcutánea	69
1.8.2. Administración intramuscular	70
1.8.3. Administración intravenosa	70

2. Ingeniería tisular	73
3. Apósitos para heridas	76
4. Lentes de contacto	79
5. Productos de higiene	80
VI. BIBLIOGRAFÍA	83

CAPÍTULO 2. HIDROGELES COVALENTES BASADOS EN TETRAQUIS(HIDROXIMETIL)FOSFONIO.....	115
I. INTRODUCCIÓN.....	117
II. OBJETIVOS / OBJECTIVES	127
III. MATERIALES Y MÉTODOS	129
1. Materiales	129
2. Fármaco estudiado: camptotecina.....	130
2.1. Cuantificación del fármaco en las muestras	130
2.2. Estabilidad del fármaco	132
2.3. Clasificación biofarmacéutica de la camptotecina	134
2.3.1. Solubilidad	134
2.3.2. Permeabilidad <i>in vitro</i>	134
2.3.3. Permeabilidad <i>in situ</i>	138
3. Obtención de los hidrogeles.....	145
3.1. Método de formación de los hidrogeles.....	145
3.2. Método de cargado del fármaco.....	145
3.3. Marcaje del quitosán con rodamina	145
3.4. Nomenclatura de las muestras	146
4. Caracterizaciones.....	147
4.1. Análisis elemental.....	147
4.2. Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente	147
4.3. Análisis termogravimétrico	148

4.4. Difracción de rayos X.....	148
4.5. Microscopía de fluorescencia.....	148
4.6. Microscopía electrónica de barrido	149
5. Hinchamiento.....	149
6. Toxicidad en cultivos Caco-2.....	151
7. Citocompatibilidad.....	152
8. Mucoadhesividad.....	153
8.1. Mucoadhesividad <i>in vitro</i>	153
8.2. Mucoadhesividad <i>in vivo</i>	154
9. Liberación.....	156
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	159
1. Estabilidad de la camptotecina.....	159
2. Clasificación biofarmacéutica de la camptotecina	160
3. Reacción de síntesis de los hidrogeles y marcaje con rodamina	164
4. Caracterizaciones	166
4.1. Análisis elemental y espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente	166
4.2. Análisis termogravimétrico	168
4.3. Difracción de rayos X.....	171
4.4. Microscopía de fluorescencia.....	172
4.5. Microscopía electrónica de barrido	173
5. Hinchamiento.....	173
6. Toxicidad en Caco-2	180
7. Citocompatibilidad.....	181
8. Mucoadhesividad.....	182
8.1. Mucoadhesividad <i>in vitro</i>	182
8.2. Mucoadhesividad <i>in vivo</i>	183
9. Liberación.....	186

V. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS	191
VI. BIBLIOGRAFÍA	195

CAPÍTULO 3. HIDROGELES IÓNICOS BASADOS EN UN RETICULANTE ANIÓNICO	201
I. INTRODUCCIÓN.....	203
II. OBJETIVOS / OBJECTIVES	209
III. MATERIALES Y MÉTODOS	211
1. Materiales.....	211
2. Obtención de los hidrogeles	211
3. Método de cargado del fármaco	212
4. Caracterizaciones	213
4.1. Análisis elemental.....	213
4.2. Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente	213
4.3. Análisis termogravimétrico	213
4.4. Difracción de rayos X.....	213
4.5. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear.....	213
4.6. Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo	214
5. Hinchamiento	214
6. Liberación	215
6.1. Cuantificación del fármaco en las muestras	216
7. Toxicidad en cultivos Caco-2	217
8. Extensibilidad	218
9. Adhesión a la piel	218
10. Irritación dérmica	219
11. Permeabilidad	220
11.1. Preparación de la piel.....	220
11.2. Células de difusión.....	221

11.3. Protocolo experimental.....	221
12. Cicatrización	223
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	227
1. Mecanismo de reacción quitosán-reticulante X.....	227
2. Caracterizaciones	228
2.1. Análisis elemental y espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente.....	228
2.2. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear.....	229
2.3. Análisis termogravimétrico	229
2.4. Difracción de rayos X.....	231
2.5. Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo	232
3. Hinchamiento	233
4. Liberación	235
5. Toxicidad en Caco-2	239
6. Extensibilidad	240
7. Adhesión a la piel	242
8. Irritación dérmica	243
9. Permeabilidad	244
10. Cicatrización	246
V. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS	253
VI. BIBLIOGRAFÍA	257
CAPÍTULO 4. NHs AUTOENSAMBLADOS BASADOS EN HIALURONATO MODIFICADO HIDROFÓBICAMENTE.....	261
I. INTRODUCCIÓN.....	263
II. OBJETIVOS / OBJECTIVES	269
III. MATERIALES Y MÉTODOS	273
1. Materiales.....	273

2. Síntesis del derivado hialuronato-riboflavina	274
3. Formación de los NHs	274
4. Marcaje del polímero y los NHs con rodamina.....	274
5. Caracterizaciones	275
5.1. Dispersión dinámica de la luz	275
5.2. Microscopía de fluorescencia.....	276
6. Determinación de la concentración de agregación crítica	276
7. Optimización del cargado del fármaco en los NHs.....	276
7.1. Procedimiento	276
7.2. Cuantificación en cromatografía líquida de alta resolución	278
8. Conservación de los NHs: liofilización.....	278
9. Ajuste de osmolaridad y pH	279
10. Ensayo de biodistribución	279
11. Ensayo de farmacocinética	281
11.1. Protocolo del ensayo	281
11.2. Cuantificación en cromatografía líquida – espectrometría de masas	282
11.3. Tratamiento matemático de los datos.....	283
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	285
1. Síntesis del derivado HA-Rfv y formación de los NHs	285
2. Marcaje fluorescente del polímero y los NHs.....	286
3. Determinación de la concentración de agregación crítica	288
4. Optimización del cargado del fármaco	289
5. Estabilidad frente a la liofilización.....	291
6. Adecuación de los NHs para su administración intravenosa.....	293
7. Biodistribución de los NHs	295
8. Influencia de los NHs en la farmacocinética del piroxicam	299
V. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS	303

VI. BIBLIOGRAFÍA307

Conclusiones generales / General conclusions313

Objetivos
Objectives

Objetivos

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es obtener hidrogeles de quitosán y de ácido hialurónico mediante distintos tipos de entrecruzamientos y estudiar sus potenciales aplicaciones como sistemas de liberación de fármacos.

Para lograr el objetivo general se han establecido los siguientes objetivos específicos:

1. Clasificar la camptotecina según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico con objeto de determinar su adecuación para ser administrado por vía oral a través de un sistema de liberación modificada.
2. Desarrollar un sistema de liberación de fármacos que permita la liberación modificada de la camptotecina por vía oral, basado en el entrecruzamiento covalente de quitosán con cloruro de tetraquis(hidroximetil)fosfonio.
3. Desarrollar un sistema de liberación modificada de fármacos basado en quitosán, entrecruzado con una molécula aniónica, y explorar sus aplicaciones como sistema de administración tópica.
4. Obtener nanohidrogeles autoensamblados a partir de hialuronato modificado hidrofóticamente con riboflavina con características adecuadas para actuar como sistema de liberación de fármacos por vía intravenosa.

Objectives

The overall objective of this PhD Thesis is to obtain hydrogels through different types of crosslinking and to study their potential applications as drug delivery systems.

To achieve the overall objective the following specific objectives have been established:

1. To classify camptothecin according to the Biopharmaceutical Classification System in order to determine its suitability for orally administration through a modified release system.
2. To develop a drug delivery system that would allow oral modified release of camptothecin, based on chitosan covalently crosslinked with tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium chloride.
3. To develop a modified drug delivery system based on chitosan, crosslinked with an anionic molecule, and to explore its applications as a topical delivery system.
4. To obtain self-assembled nanohydrogels based on hyaluronan hydrophobically modified with riboflavin with suitable characteristics to act as intravenous drug delivery system.

Capítulo 1

Introducción general

El término hidrogel apareció por primera vez en la literatura a finales del siglo XIX para describir formulaciones coloidales de sales inorgánicas;¹ aunque el concepto de hidrogel tal y como se conoce en la actualidad fue introducido en 1960 por Wichterle y Lim cuando propusieron éstos como materiales para lentes de contacto blandas.² Durante más de cinco décadas el estudio de los hidrogeles ha experimentado un gran auge debido a sus potenciales aplicaciones en distintos campos científicos, principalmente en el ámbito biomédico.

Como idea general, los hidrogeles se pueden definir como sistemas compuestos por uno o varios polímeros hidrófilos cuyas cadenas están entrecruzadas por uniones físicas o químicas formando una red tridimensional. Se caracterizan principalmente por su capacidad para captar fluidos acuosos del medio que los rodea hinchándose hasta el equilibrio; gracias al entrecruzamiento de las cadenas poliméricas los hidrogeles captan agua sin llegar a disolverse. Debido a la ingente investigación en este campo, se ha desarrollado una amplia

variedad de hidrogeles de distintas composiciones, características de formación y propiedades.

El sector farmacéutico ha patentado y comercializado distintas composiciones basadas en hidrogeles con aplicaciones como lentes de contacto, apósitos para heridas, sistemas de liberación de fármacos, ingeniería tisular y productos de higiene (pañales, compresas, etc.).³ Se estima que para 2022 el mercado mundial de los hidrogeles alcanzará un volumen de 27200 millones de dólares. El I+D es la estrategia clave de las empresas farmacéuticas para expandir su cartera de productos basados en hidrogel; de hecho, la posibilidad de adaptar las propiedades de los hidrogeles a las necesidades del mercado ha estimulado grandes inversiones de capital para el desarrollo de nuevos productos.⁴

El objetivo del presente capítulo es proporcionar una amplia visión global del estado del arte de los hidrogeles para facilitar la comprensión de los trabajos de investigación desarrollados en la presente Tesis Doctoral. En primer lugar, se presentan los polímeros como elementos básicos en la composición de los hidrogeles y se detallan aquellos estudiados en este trabajo. A continuación, se introduce el concepto de hidrogeles y nanohidrogeles y sus propiedades fundamentales. Asimismo, se estudia la clasificación de los hidrogeles, sus características principales y sus múltiples aplicaciones.

I. POLÍMEROS

Los hidrogeles se definen como redes poliméricas tridimensionales obtenidas a partir de polímeros hidrófilos, naturales o sintéticos, que pueden absorber y retener una cantidad significativa de agua. Es por ello que el conocimiento de los polímeros constituye uno de los pilares fundamentales para el estudio de las propiedades y características de los hidrogeles.

Los polímeros son macromoléculas formadas por la unión repetida de una o varias moléculas unidas por enlaces covalentes. Estas moléculas se denominan monómeros y las reacciones a través de las cuales se obtienen se denominan reacciones de polimerización. Cuando se parte de un sólo tipo de molécula se habla de homopolimerización y de homopolímero. Cuando son dos o más moléculas diferentes las que se repiten en la cadena se nomina copolimerización, comonómeros y copolímero.⁵

Dependiendo de su origen, los polímeros pueden ser naturales o sintéticos. La tabla 1.1.1. resume algunos ejemplos de polímeros y monómeros usados en la síntesis de hidrogeles.

Polímeros naturales	Polímeros sintéticos	Monómeros
Aniónicos	Aniónicos	Ácido acrílico
Ácido hialurónico	Poli(ácido acrílico)	Ácido metacrílico
Ácido algínico	Poli(ácido metacrílico)	Ácido acrilamidofenilborónico
Carboximetilcelulosa		Acrilamida
Carragenina	Catiónicos	Butil acrilato
Sulfato de dextrano	Poliamidoamina	Dietilaminoetil metacrilato
Sulfato de condroitina	Poli(etil)enammina	Dimetilamino propilo
Xantano	Poli(etil)enimmina	Etilenglicol
Goma gelano	Poli(vinil)amina	Hidroxietil metacrilato
		Hidroxietoxietil metacrilato
Catiónicos	No iónicos	Hidroxidietoxietil metacrilato
Quitosa	Poli(etil)englicol (PEG)	Metoxietil metacrilato
Polilisina	Poli(glicol)	Metoxietoxietil metacrilato
	Poli(hidroxi)butirato	N-(2-hidroxi)propil) metacrilamida
No iónicos	Poloxámero	N-isopropilacrilamida
Metilcelulosa	Alcohol de polivinilo	N-vinil-2-pirrolidona
Etilcelulosa	Acetato de polivinilo	Oligo(etil)englicol metiléter
Hidroxietilcelulosa		metacrilato
Hidroxipropilcelulosa	Otros	PEG acrilato
Hidroxipropilmetilcelulosa	Poli(ácido láctico)	PEG metacrilato
Dextrano	Poli(ácido glicólico)	PEG diacrilato
Manano	Poli(ácido láctico-co-glicólico)	PEG dimetacrilato
Pululano	Poli(caprolactona)	Piridil disulfuro metacrilato
Escleroglucano	Poli(vinil)caprolactona	Vinil acetato
Goma guar	Polidimetilsiloxano	Vinil metacrilato
Goma garrofn	Poliestireno	
Anfóteros		
Gelatina		
Colágeno		
Fibrina		

Tabla 1.1.1. Polímeros naturales y sintéticos y monómeros utilizados en la preparación de hidrogeles, microgeles y nanogeles. Modificado de Escalona, O. ⁶

Los hidrogeles basados en polímeros naturales pueden tener propiedades mecánicas no óptimas y pueden contener patógenos (según la fuente de obtención) o provocar respuestas inmunes e inflamatorias, pero ofrecen ventajas frente a los polímeros sintéticos debidas a sus inherentes propiedades de

biocompatibilidad, biodegradabilidad y reconocimiento biológico celular. En cambio, los polímeros sintéticos no poseen estas propiedades bioactivas de forma inherente, pero presentan una estructura bien definida que puede modificarse para lograr determinada funcionalidad y controlar su biodegradabilidad.⁷

Los polipéptidos, polinucleótidos y polisacáridos son polímeros que derivan de fuentes naturales. En la bibliografía se encuentran innumerables publicaciones sobre las características y uso como sistemas de liberación de los polímeros naturales, y especialmente de los polisacáridos como alginato, carragenina, dextrano, goma gelano, goma guar, ácido hialurónico, pululano, escleroglucano, xantano, xiloglucano, quitosán, celulosa, almidón y pectinas. Los polisacáridos son los polímeros naturales más versátiles debido al amplio espectro de propiedades químicas, físicas y funcionales que confluyen en los organismos vivos.⁸

En general, los polisacáridos son biocompatibles, no tóxicos y tienen propiedades fisicoquímicas que los hacen adecuados para distinto tipo de aplicaciones, como sistemas de liberación de fármacos, encapsulación de células vivas para ingeniería tisular, etc. Además, los polisacáridos son abundantes y fácilmente disponibles a partir de fuentes renovables, como algas, plantas, cultivos de cepas microbianas seleccionadas, así como a través de técnicas de ADN recombinante. Es por ello que los polisacáridos tienen una gran variedad de composiciones y propiedades que no son fácilmente imitables en un laboratorio químico; además, la facilidad de su producción hace que muchos polisacáridos sean más baratos que los polímeros sintéticos.⁹

Este apartado se centra en la descripción y características del ácido hialurónico (HA) y el quitosán, ya que son los dos polímeros estudiados en este trabajo de investigación.

1. Quitosán

El quitosán es un aminopolisacárido obtenido por N-desacetilación (en medio básico) de la quitina, que es el segundo polímero más abundante en la naturaleza (después de la celulosa)¹⁰ y forma parte del exoesqueleto de crustáceos, insectos y también aparece en algunos tipos de hongos.¹¹ El quitosán se distingue de otros

polisacáridos por la presencia de nitrógeno en su estructura molecular y su carácter catiónico.¹² En la figura 1.1.1 se muestra su estructura.

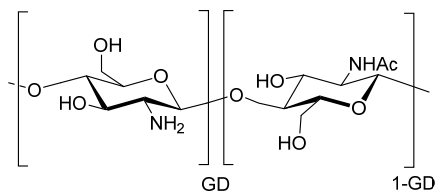


Figura 1.1.1. Estructura química de la unidad de repetición del quitosán (GD = grado de desacetilación)

Se trata de un polímero lineal compuesto por unidades de D-glucosamina (unidad desacetilada) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada), distribuidas aleatoriamente y unidas por enlaces β -(1-4).¹² Denominando “A” a las unidades acetiladas y “D” a las desacetiladas, el grado de desacetilación se puede expresar como la relación molar en porcentaje de unidades D frente al total (A+D). Por tanto, el grado de desacetilación se puede entender como el porcentaje de grupos amino libres en la molécula de quitosán. Este factor está estrechamente vinculado con su solubilidad, ya que el grupo amino libre se protona en medios acuosos ácidos, confiriéndole mayor hidrofilia y solubilidad y un carácter altamente reactivo.¹³ De hecho, el quitosán es una base débil con un valor de pKa de 6.3 ($pK_a=6.2-7.0$, según autores), insoluble a pH neutro y alcalino, así como en solventes orgánicos, ácidos a altas concentraciones, en álcalis y en soluciones acuosas con valores de pH superiores a 6, excepto cuando su peso molecular es bajo. Es soluble con medios acuosos ácidos ($pH < 6$), como soluciones ácidas diluidas de acético, fórmico, clorhídrico, glutámico y láctico, entre otras, debido a la protonación de los grupos amino del polímero.^{14 10}

Habría que aclarar que la quitina ya se encuentra parcialmente desacetilada en la naturaleza, aunque en una proporción mucho menor que el quitosán, es por ello que se considera que el polímero es quitosán a partir de grados de desacetilación de un 50%, aproximadamente.¹⁰

El quitosán no se encuentra presente de forma natural en el organismo de los mamíferos pero éstos pueden degradarlo mediante varias enzimas, entre ellas, las

quitinasas y la lisozima presente en superficies mucosas y en suero humano¹⁵⁻¹⁸ así como enzimas gástricas como la papaína, pepsina, y lipasa A.¹⁹

El quitosán presenta propiedades biológicas que lo hacen idóneo para aplicaciones biomédicas, entre las que destacan su biocompatibilidad,²⁰ biodegradabilidad,²¹ baja toxicidad,²² citocompatibilidad,²³ mucoadhesividad,²⁴ actividad hemostática,²⁵ actividad antiinflamatoria,²⁶ actividad antibacteriana,^{27, 28} actividad antifúngica,²⁹ immunoestimulación,³⁰⁻³² actividad antitumoral,³³ actividad hipolipidémica,³⁴ actividad cicatrizante de heridas,³⁵ capacidad para facilitar la absorción de macromoléculas biológicas a través de barreras epiteliales por la apertura transitoria de las uniones estrechas celulares,^{36, 37} incluso se le han atribuido propiedades analgésicas.³⁸

La estructura química del quitosán ofrece múltiples posibilidades de modificación química, ya que posee un grupo amino, un hidroxilo primario y un hidroxilo secundario. En general, los grupos hidroxilo originan reacciones inespecíficas, especialmente eterificación y esterificación/sulfatación, mientras que el grupo amino participa en reacciones específicas como la *N*-carboxialquilación, formación de bases de Schiff, sustitución enzimática, cuaternización del grupo amino, aminación reductora (reacción con un aldehído), etc.¹⁰ Así se pueden introducir diversos grupos para diseñar derivados de quitosán con propiedades mejoradas (solubilidad, mucoadhesividad, aumentar la permeabilidad de fármacos, inhibición de la bomba de secreción (como la glicoproteína P), dirigirse a dianas celulares, etc.).³⁹ La tabla 1.1.2 recoge las modificaciones químicas a las que puede ser sometido este polímero.

El quitosán se comercializa para distintas aplicaciones, por ejemplo, en más de 50 países está aprobado como suplemento dietético (como atrapador de grasa para reducir el colesterol),^{8, 40} está aprobado por la FDA como base para apósitos de heridas (por ejemplo, HemCon Patch PRO),⁴¹ y la Farmacopea Europea⁴² incluyó una monografía en 2002 para el uso biomédico de la sal de clorhidrato de quitosano.

Objetivo	Reacción
Reducir PM (menor viscosidad, mayor solubilidad)	Despolimerización
Aumentar carácter catiónico	Desacetilación, cuaternización, adición de grupos catiónicos
Mejorar la solubilidad en agua	Acilación, alquilación, pegilación, hidroxialquilación, carboxialquilación
Poliectrolitos anfóteros	Carboxialquilación, fosforilación, sulfatación
Dirigirlo a dianas celulares	Alquilación, entrecruzamiento
Derivados fotosensibles	Azidación
Derivados anfífilicos	Introducción de grupos hidrófobos (alquilación, acilación, entrecruzamiento, etc)
Miscelánea	Tiolación, adición de Michael, etc

Tabla 1.1.2. Posibles modificaciones químicas del quitosán según el objetivo deseado. Modificado de Aranaz I. y col. ⁴³

Las aplicaciones del quitosán como sistema para liberación de fármacos se han investigado ampliamente ya que es capaz de encapsular, proteger y liberar fármacos de forma controlada, además de promover su absorción a través del epitelio. La toxicidad por vía oral es baja ya que no se absorbe en el tracto gastrointestinal; se ha descrito una LD50 (dosis letal para el 50% de un conjunto de animales de prueba) de 16 g/kg en ratones.^{15, 22} Este polímero se ha empleado también en tratamientos cosméticos, como antiacnéicos, protectores epidérmicos, para mantener la humedad de la piel, etc.¹⁰

2. Ácido hialurónico

El HA es un polisacárido polianiónico lineal compuesto por unidades disacáridas de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina unidas por enlaces β -1,3 y β -1,4, figura 1.1.2.

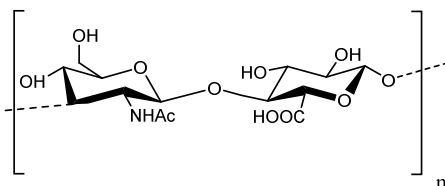


Figura 1.1.2. Estructura química de la unidad de repetición del ácido hialurónico (HA)

El HA es el único glicosaminoglicano que no tiene grupos sulfato en su estructura y que no se une covalentemente a proteínas del núcleo de proteoglicanos, además puede tener un peso molecular mucho mayor que el resto de glicosaminoglicanos.⁴⁴ En el organismo el HA se encuentra en forma polianiónica ya que los grupos carboxílicos tienen un pK_a 3-4, por lo que en condiciones fisiológicas (pH 7.4) estos grupos están ionizados;⁴⁵ el contra-ion suele ser sodio, ya que es el más abundante en los tejidos de los seres vivos.

A nivel industrial puede obtenerse por extracción desde tejidos animales o por fermentación microbiana usando cepas bacterianas. El primer proceso aplicado a escala industrial fue la extracción de HA desde animales (principalmente crestas de gallo, pero también cordones umbilicales humanos, humor vítreo del ganado y fluido sinovial bovino) y, aunque todavía se sigue realizando, está limitado debido a problemas en su obtención y al riesgo de infección por virus y proteínas. La obtención de HA por esta vía tiene un bajo rendimiento debido a su baja concentración en los tejidos; además la polidispersión de los productos es alta y no se puede controlar su degradación durante la extracción. La producción de HA por fermentación bacteriana ha evolucionado desde los años 80; en los inicios del desarrollo de esta técnica se usaban estreptococos del grupo A y C que producían HA de mayor peso molecular y pureza, pero existía riesgo de contaminación con endotoxinas, proteínas, ácidos nucleicos y metales pesados. En la década de los 90, la identificación de los genes implicados en la biosíntesis de HA y sus precursores permitió desarrollar cepas de microorganismos recombinantes no patogénicas mediante la introducción de enzimas de síntesis de HA. En concreto, se ha desarrollado un proceso de producción de hialuronato sódico ultrapuro a partir de la cepa recombinante de *Bacillus subtilis*,⁴⁶ considerado un microorganismo seguro (GRAS, *Generally Recognized As Safe*), cultivable a gran escala y que no produce hialuronidasas ni exo o endotoxinas.⁴⁷

A diferencia del quitosán, el HA está presente en todos los organismos vivos, tanto a nivel intracelular⁴⁸ como a nivel extracelular y en la matriz pericelular, como en los tejidos conectivos, cartílago, fluido sinovial, humor vítreo, etc. De hecho, este polímero desempeña múltiples funciones en el organismo: retiene un gran volumen de agua en el espacio extracelular, hidrata los tejidos, lubrica las partes móviles, como las articulaciones y los músculos, y es el responsable de la

humedad de la piel. Además, regula el equilibrio de agua y la presión osmótica (lo que favorece la expansión del tejido frente a las constricciones de la matriz de fibras colágenas) manteniendo la visco-elasticidad de los tejidos conectivos (función reológica y estructural) y organiza los complejos de proteoglicanos en la matriz extracelular. Asimismo, participa en funciones mediadas por receptor como la proliferación celular, mitosis, migración, desarrollo tumoral, metástasis e inflamación, de modo que actúa en procesos fundamentales como el desarrollo embrionario y la morfogénesis, la cicatrización de heridas y la progresión tumoral.^{44, 49}

Una persona de 70 kg tiene unos 15 g de HA, de los cuales un tercio se renueva diariamente;⁴⁹ la semivida en los tejidos es de 0.5 a 3 días. Cuando alcanza la circulación sanguínea el 85-90% se elimina en el hígado catabolizado en el interior de las células endoteliales sinusoidales que lo captan por endocitosis mediada por receptores; los riñones reciben un 10% pero excretan sólo un 1-2% en orina; y en algunas especies el bazo también juega un papel importante en su metabolismo.⁴⁴

Este polímero se degrada enzimáticamente produciendo fragmentos de dimensiones definidas que tienen funciones biológicas específicas. De hecho, las funciones biológicas del HA dependen de su peso molecular; en general, el HA de bajo peso molecular induce señales intracelulares mediadas por receptor, mientras que los de alto peso molecular mantienen la integridad celular y la organización de la matriz.⁵⁰ Más específicamente, el HA de alto peso molecular (> 500 KDa), tiene funciones como relleno espacios, antiangiogénicas e inmunosupresoras; las cadenas medias (20-200 KDa) están implicadas en ovulación, embriogénesis y reparación de heridas; las cadenas de 15-50 unidades de repetición (6-20 KDa) tiene funciones inflamatorias, inmunoestimuladoras y angiogénicas; y los oligómeros de HA (< 4 KDa) son anti-apoptóticos e inducen proteínas de choque térmico.⁵¹

El HA interacciona directamente con las células a través de ciertas proteínas, entre las que destacan el receptor CD44, el receptor para la motilidad mediada por hialuronato (RHAMM) implicado en el movimiento de las células, y la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1) expresada por células endoteliales y del sistema inmune e implicada en reacciones inflamatorias.⁵²

El principal receptor para el HA es el CD44, se trata de una familia de glicoproteínas transmembrana expresadas en una amplia variedad de tipos celulares (leucocitos, fibroblastos, células epiteliales, queratinocitos, células endoteliales, etc.) con las que interacciona para mediar numerosos procesos tanto fisiológicos como patológicos, como la regulación de la respuesta inmune, regulación del crecimiento, diferenciación, migración y supervivencia celular, tumorigénesis y metástasis.⁵³⁻⁵⁵ La unión del HA a los receptores CD44 permite su internalización por endocitosis y su posterior degradación enzimática intracelular originando oligómeros bioactivos que pueden ser excitados.⁵⁶ Estos receptores (en sus distintas isoformas) están sobreexpresados en muchos tipos de cáncer y células inflamatorias activadas.^{54, 57, 58}

La estructura del HA puede modificarse para obtener derivados con distintas propiedades físico-químicas (hidrofobicidad, anfifilicidad, etc.) con un amplio rango de aplicaciones biomédicas. La estructura química del HA posee varios grupos funcionales: ácido carboxílico, grupos hidroxilo primario y secundario y el grupo amino (tras desacetilación del N-acetilo). La modificación del grupo carboxílico suele ser por reacciones de esterificación y amidación mediadas por carbodiimidas u otros activadores; y la de los grupos hidroxilo, por eterificación, esterificación así como entrecruzamientos mediante epoxidaciones y divinilsulfonas.⁵⁹

El HA puede modificarse mediante la adición de moléculas hidrófobas (como colesterol,⁶⁰ riboflavina⁶¹ o éster bencílico⁶²) o hidrófilas; en el último caso, la reacción se suele realizar en un ambiente acuoso con hialuronato sódico. En cambio, si se quiere modificar con moléculas hidrófobas, la reacción ha de realizarse en un medio orgánico y, debido a la baja solubilidad del HA en este tipo de medios, se necesita usar en forma de sal de tetrabutilamonio.⁶³

Debido a sus excelentes propiedades (visco-elasticidad, biocompatibilidad y biodegradabilidad) este polisacárido es uno de los más usados en el campo biomédico e industrial en distintas aplicaciones: reparación de tejidos, curación de heridas, tratamiento de artritis, dispositivos para liberación de fármacos (especialmente útiles para antitumorales) e ingeniería tisular, entre otros.⁵⁹

II. CONCEPTO DE HIDROGELES Y NANOHIDROGELES

1. Hidrogeles

Los hidrogeles son redes poliméricas tridimensionales obtenidas a partir de polímeros hidrófilos, naturales o sintéticos, que pueden absorber y retener una cantidad significativa de agua. Esta capacidad de hinchamiento les permite hidratarse hasta el equilibrio en presencia de un exceso de agua o fluidos biológicos, siendo este equilibrio el resultado de un balance entre hidratación y fuerzas elásticas.⁶⁴

Los hidrogeles son de naturaleza hidrófila debido a que en su estructura presentan grupos funcionales como -OH, -COOH, -CONH₂, -CONH-, -SO₃H; en un ambiente acuoso estos grupos hidrófilos se hidratan sin que se disuelva el hidrogel debido al entrecruzamiento entre las cadenas de polímero.⁶⁵

Estos sistemas presentan una serie de propiedades óptimas para su aplicación en el campo biomédico tales como:⁶⁶

- Alto contenido en agua o fluidos biológicos que los hace compatibles con la mayoría de los tejidos vivos.
- Naturaleza blanda y elástica que minimiza la irritación de los tejidos.^{67, 68}
- Superficie hidrófila que origina una baja tensión interfacial en contacto con los fluidos biológicos, lo que contribuye a una reducción de la adherencia de las proteínas y las células a esta superficie.⁶⁹
- Estructura altamente porosa que puede modularse mediante el control de la densidad de reticulación. Esta porosidad constituye un reservorio con alta capacidad de carga de activos terapéuticos (fármacos, proteínas, etc.) que le permite protegerlos de la degradación ambiental y posteriormente liberarlos por diferentes mecanismos.
- Capacidad de hinchamiento que proporciona alta permeabilidad para fármacos y metabolitos de bajo peso molecular.^{70, 71, 72}

Los hidrogeles poseen múltiples ventajas como sistemas de liberación modificada de fármacos en biomedicina y como matrices en ingeniería tisular, entre las que se encuentran:^{73, 66}

- Mantenimiento de niveles plasmáticos terapéuticos durante más tiempo debido a la liberación prolongada.
- Selectividad terapéutica.
- Protección de las mucosas frente a fármacos irritantes.
- Reducción de la dosis administrada debido a un mayor aprovechamiento del fármaco.
- Disminución de los efectos secundarios.
- Mejora de la adherencia terapéutica de los pacientes.
- Menor coste terapéutico por paciente debido a que se requieren menos unidades de dosificación.
- Reducción de la pérdida de fármaco cuando el metabolismo de primer paso es elevado.
- Capacidad de adhesión celular mediante ligandos unidos a la red.
- Capacidad de transporte de nutrientes a las células y otros productos desde las células.

- Protección frente a la degradación ambiental y enzimática de fármacos, péptidos, proteínas, oligonucleótidos y material genético.
- Posibilidad de cambio de estado líquido/gel (temperatura ambiente/temperatura fisiológica) lo que permite su administración mediante inyección *in vivo* (hidrogeles termosensibles).

2. Nanohidrogeles

Los nanogeles o nanohidrogeles (NHs) son redes tridimensionales de tamaño nanométrico capaces de absorber gran cantidad de agua e hincharse en medios acuosos sin perder su integridad debido a los enlaces entre sus cadenas; es decir, son hidrogeles a escala nanométrica cuyas dimensiones medias se sitúan en el rango de 10-1000 nm.^{74, 75}

En general, los NHs son nano-sistemas hidrófilos, biocompatibles y con gran versatilidad, capaces de retener y liberar moléculas bioactivas como fármacos con distinto grado de solubilidad, polipéptidos y material genético.⁷⁶ Debido a su consistencia blanda y elástica, los NHs pueden ser deformados reversiblemente; asimismo, pueden entrar en las células huésped por endocitosis y liberar el fármaco dentro de la célula.

Los NHs combinan las características de los hidrogeles macroscópicos y de las nanopartículas. Al igual que sus análogos macroscópicos, tienen la capacidad de absorber gran cantidad de agua o fluidos biológicos debido a la presencia de grupos hidrófilos en el polímero.⁶⁵ Además, su alto contenido en agua en el estado hinchado y la baja tensión superficial entre el medio y los NHs minimiza las interacciones inespecíficas, como la adhesión celular y la adhesión a proteínas, mejorando su biocompatibilidad.⁷⁷

En los últimos años, ha aumentado el interés por la nanotecnología aplicada a los sistemas de liberación debido a la multitud de ventajas que suponen las dimensiones nanométricas.⁷⁷ En general, las nanopartículas presentan una serie de ventajas tales como:

- Aumentar la biodisponibilidad del fármaco.
- Disminuir la toxicidad o los efectos adversos de los tratamientos.

- Liberar el agente terapéutico de manera controlada.
- Mejorar la solubilidad de fármacos hidrófobos.
- Mejorar la estabilidad de agentes terapéuticos frente a la degradación química y enzimática.
- Posibilidad de cargar el fármaco sin reacciones químicas, preservando la estructura y actividad de la molécula.
- Por su reducido tamaño, capacidad de circular por los capilares, atravesar barreras e internalizarse en las células.
- Posibilidad de dirigir el fármaco a su diana terapéutica mediante modificación de la superficie con ligandos unidos física o químicamente o control del tamaño de las nanopartículas.
- Mejorar la acumulación de fármacos en los tumores.
- Posibilidad de administración por diferentes vías: oral, nasal, intravenosa, intraocular, intraarticular, entre otras.

En concreto, los NHs aportan ciertas ventajas frente a otros tipos de nanopartículas debido a una alta capacidad de carga, estabilidad, biocompatibilidad y capacidad de responder a distintos estímulos ambientales (como temperatura, pH y fuerza iónica, entre otros).⁷⁷ Estos sistemas pueden ser utilizados para mejorar la solubilidad, biodisponibilidad, toxicidad y/o estabilidad del fármaco en el interior del organismo; también puede mejorar la internalización celular del fármaco con respecto al fármaco libre.

III. CLASIFICACIÓN DE LOS HIDROGELES

Los hidrogeles se pueden clasificar en función de multitud de criterios: tipo de entrecruzamiento, tamaño, sensibilidad a estímulos, carga iónica, degradabilidad, origen de los polímeros y método de preparación. A continuación, se describen brevemente las distintas clasificaciones (figura 1.III.1.):

- Según el tipo de entrecruzamiento, se distinguen hidrogeles reticulados físicamente e hidrogeles reticulados químicamente. Los hidrogeles físicos son reversibles y están formados por enlaces no covalentes. En cambio, los hidrogeles químicos son más estables e irreversibles y se forman por enlaces covalentes entre las cadenas de polímero.⁶⁹ Este apartado se explica con mayor detalle más adelante.
- En función de su tamaño, se pueden distinguir hidrogeles macroscópicos, microgeles o nanohidrogeles.⁷⁸

- En función de su sensibilidad a los estímulos, existen hidrogeles no sensibles a estímulos, que se hinchan por absorción de agua sin responder a cambios del ambiente, e hidrogeles sensibles a estímulos o hidrogeles inteligentes que se hinchan en respuesta a alteraciones sutiles del medio ambiente como temperatura, pH, fuerza iónica, luz, campo eléctrico o presencia de biomoléculas.⁷⁹
- Atendiendo a la carga, los hidrogeles pueden ser no iónicos, catiónicos, aniónicos y anfóteros, según los grupos funcionales presentes en los polímeros que los constituyen.^{80, 81}
- Según su degradabilidad, existen hidrogeles biodegradables o no biodegradables. En el campo de la biomedicina los materiales biodegradables son muy útiles ya que no requieren cirugía para su extracción.^{82, 83}
- En función del origen de los polímeros, como ya se ha explicado, pueden ser naturales o sintéticos. Algunos ejemplos de polímeros naturales son gelatina, quitosán, HA, colágeno, dextrano, alginato, etc.; y de polímeros sintéticos, el ácido metacrílico y sus derivados, ácido acrílico, vinil acetato, N-vinilpirrolidona, etcétera.^{84, 85}
- Dependiendo del método de preparación, pueden ser homopolímeros, copolímeros o hidrogeles interpenetrados (IPN) o semi-IPN.⁸⁴ Los hidrogeles homopoliméricos están formados por un solo tipo de monómeros. Los hidrogeles copoliméricos están formados por dos o más monómeros diferentes con al menos un componente hidrófilo dispuesto de forma aleatoria, alterna o en bloque a lo largo de las cadenas del polímero. Los hidrogeles IPN (*Interpenetrating Polymer Network*) se definen por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) como un polímero que comprende dos o más redes parcialmente entrelazadas a escala molecular sin enlaces covalentes entre ellas y que no pueden separarse excepto por rotura de enlaces químicos. Los semi-IPN comprenden una o más redes y uno o más polímeros lineales o ramificados y se caracterizan por la penetración a escala molecular de, al menos, alguna de las macromoléculas lineales o ramificadas en, al menos, una de las redes. A diferencia de los IPN, en los semi-IPN los polímeros lineales o

ramificados se pueden separar de la red sin necesidad de romper enlaces químicos.⁸⁶

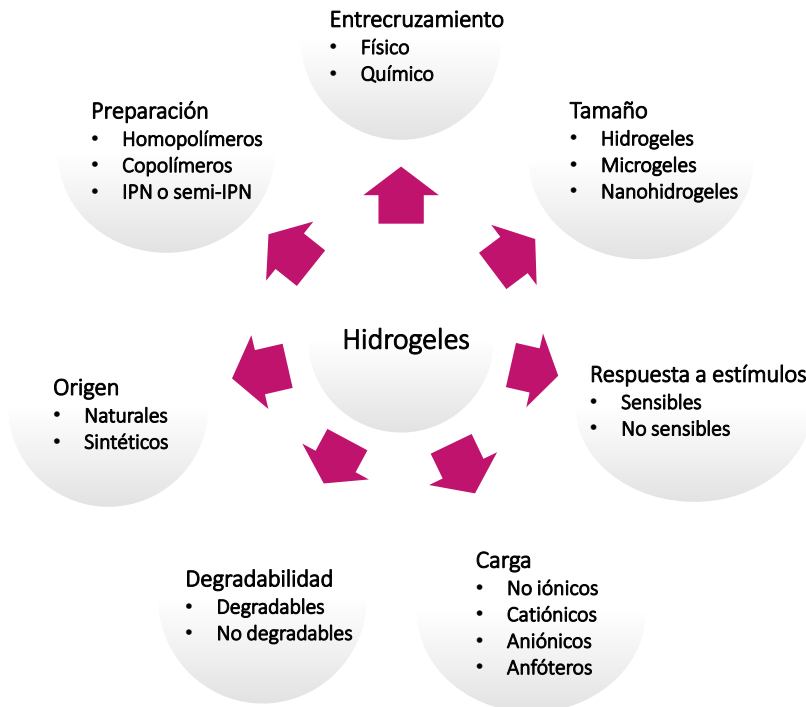


Figura 1.III.1. Esquema de las distintas clasificaciones de los hidrogeles

Asimismo, la reticulación puede tener lugar en dos condiciones:⁸⁷ a) *in vitro* durante la preparación del hidrogel b) *in vivo/in situ* tras la aplicación en una ubicación precisa en el organismo.

A continuación, se describe la clasificación de los hidrogeles atendiendo al tipo de entrecruzamiento entre sus cadenas.

1. Hidrogeles entrecruzados químicamente

Los hidrogeles químicos o permanentes están reticulados covalentemente. La reticulación química generalmente produce hidrogeles más estables con mejores propiedades mecánicas en comparación con los hidrogeles físicos, pero algunos de los agentes de reticulación utilizados pueden ser tóxicos.

En función del tipo de entrecruzamiento, los hidrogeles químicos pueden obtenerse mediante polimerización radicalaria, por reacción de grupos funcionales reactivos o mediante el uso de enzimas.^{69, 88}

1.1. Polimerización radicalaria

Se obtienen hidrogeles reticulados químicamente por polimerización radicalaria de monómeros de bajo peso molecular en presencia de agentes entrecruzantes. Es un método muy utilizado en aplicaciones biológicas y se puede realizar de varias maneras. Las propiedades de estos hidrogeles pueden modularse por la cantidad de agente reticulante usado; además, se pueden obtener hidrogeles sensibles a estímulos como al pH y a la temperatura, como los de ácido metacrílico⁸⁹ y los de N-isopropilacrilamida,⁹⁰ respectivamente.

La polimerización se suele iniciar generando compuestos con radicales libres o usando radiaciones (UV, gamma o por haz de electrones). La polimerización en tres dimensiones suele originar materiales que contienen niveles significativos de monómeros residuales. Estos monómeros que no han reaccionado generalmente son tóxicos y pueden liberarse del hidrogel continuamente, por lo que el producto obtenido debe purificarse. La purificación suele realizarse por extracción en exceso de agua y puede tardar varias semanas para completarse.^{84, 91} Se puede evitar el proceso de purificación si se realiza un proceso adicional para maximizar la cantidad de monómeros que reaccionan (como tratamiento térmico o irradiación del sistema resultante).^{92, 93} Otra opción es trabajar con monómeros no tóxicos, como oligómeros o macromonómeros (por ejemplo, PEG dimetacrilato).⁹⁴

Un hidrogel muy estudiado es el poli(2-hidroxietil metacrilato) (PHEMA) que se obtiene por la polimerización de 2-hidroxietil metacrilato con un agente reticulante adecuado, por ejemplo etilenglicol dimetacrilato.² También se han derivatizado polímeros hidrosolubles con grupos (met)acrílicos mediante el método propuesto por Edman y col.;⁹⁵ ejemplos de ello son el dextrano,⁹⁵ (hidroxietil)almidón,⁹⁶⁻⁹⁸ poli-aspartamida,⁹⁹⁻¹⁰¹ alcohol de polivinilo (PVA)¹⁰² y HA.¹⁰³

La polimerización inducida por radiación UV también se usa frecuentemente para preparar hidrogeles.¹⁰²⁻¹⁰⁵ Con este tipo de polimerización se pueden formar *in situ*,¹⁰⁶ se pueden preparar estructuras moldeadas e incluso sistemas

fotorreversibles que se fotodegraden por exposición a luz UV de forma que se controle la liberación de los fármacos.¹⁰⁷

La limitación de la polimerización por luz UV es que los radicales formados pueden producir daños en la estructura de los fármacos¹⁰⁸ y proteínas⁶⁹. Las células expuestas a una irradiación UV de alta intensidad durante un tiempo prolongado pueden ver afectada su actividad metabólica.¹⁰⁹ Asimismo, se debe tener precaución tanto con el tipo de fotoiniciador como con el solvente en el que se disuelve, ya que éstos pueden liberarse del hidrogel.

1.2. Grupos funcionales reactivos

Se trata de reacciones covalentes entre los grupos funcionales de los polímeros (principalmente -OH, -COOH, -NH₂) que son los que aportan solubilidad a los polímeros hidrosolubles.^{88, 109} Los enlaces covalentes entre las cadenas de polímeros se establecen por reacción de grupos funcionales que tienen reactividad complementaria; las reacciones típicas son la formación de bases de Schiff,¹¹⁰ adiciones de tipo Michael,¹¹¹ enlaces peptídicos¹¹² y reacciones tipo click.¹¹³

Los polímeros que contienen grupos hidroxilo y grupos amino se pueden entrecruzar mediante moléculas que contienen grupos funcionales aldehído en su estructura (figura 1.III.2). De estos métodos, la formación de una base de Schiff entre un aldehído y un grupo amino es la técnica más utilizada. Una de las moléculas reticulantes aldehídicas más estudiadas de este campo es el glutaraldehído, que reacciona en condiciones suaves con grupos amino. Ejemplos de esta reacción para la formación de hidrogeles son el entrecruzamiento de proteínas (albúmina,¹¹⁴ colágeno¹¹⁵ y gelatina,¹¹⁶ entre otras) y el entrecruzamiento de polisacáridos (quitosán,^{117, 118} goma guar,¹¹⁹ alginato sódico¹²⁰ y carragenina¹²¹).

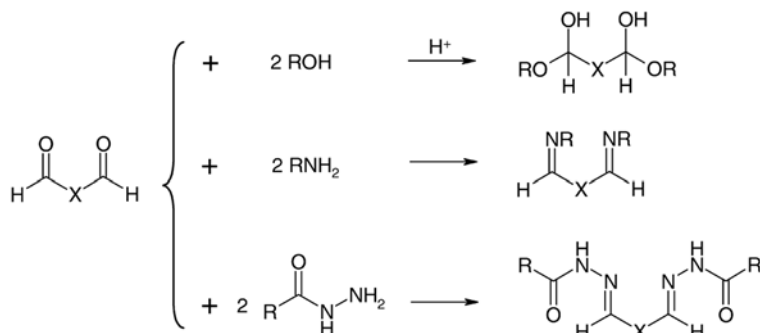


Figura 1.III.2. Entrecruzamiento mediado por agentes reticulantes con grupos aldehído en polímeros que contienen grupos hidroxilo, amina o hidracida (R representa la cadena polimérica, X cualquier espaciador (en el caso del glutaraldehído X = CH). Tomado de Hennink W.E. y col.⁶⁹

Sin embargo, la desventaja del glutaraldehído es su toxicidad, incluso a bajas concentraciones, ocasionando una posible lixiviación en el cuerpo durante la degradación de la matriz que resultaría en la inhibición del crecimiento celular.⁷¹ Debido a la toxicidad de este compuesto, se han propuesto otras moléculas pequeñas bifuncionales para ser usadas como agentes entrecruzante (diglicidil éter, diisocianato, diacrilatos, etc.), algunas de ellas se muestran en la tabla 1.III.1.

De igual modo, el proceso de entrecruzamiento también se puede realizar mediante reacciones de adición cuando se van agregando unidades de agente entrecruzador sin pérdida de átomos; es decir, la composición química de las cadenas resultantes es igual a la suma de las composiciones químicas del polímero y la molécula orgánica reticulante. Ejemplos ampliamente desarrollados para este tipo de hidrogeles son los polisacáridos entrecruzados con 1,6-hexametilendiisocianato,¹²² divinilsulfona¹²³ o 1,6-dibromuro de hexano,¹²⁴ entre otros.¹²⁵ Normalmente, estas reacciones de adición se llevan a cabo en disolventes orgánicos para evitar que el agua reaccione con el agente reticulante. Estos agentes suelen ser tóxicos por lo que el hidrogel debe ser tratado para eliminar las moléculas entrecruzadoras que no hayan reaccionado. Por este motivo, los fármacos o proteínas que se vayan a encapsular se deben cargar posteriormente.¹²³ Esto implica que para cargar proteínas es necesario emplear matrices de tamaño de poro mayor que dicha proteína, por lo que la consiguiente liberación es generalmente de orden uno y con una duración limitada.⁶⁹

Agente reticulante	Grupos funcionales diana	Enlace de entrecruzamiento	Condiciones de reacción	Comentarios
Glutaraldehído	Aminas primarias y aldehídos		pH básico y neutro	Reacción completada en 1 h; dificultad para eliminar las trazas de reticulante
Formaldehído	Aminas primarias y aldehídos		pH básico y neutro	Reacción completada en 1 h; dificultad para eliminar las trazas de reticulante
Genipina	Aminas primarias y aldehídos		Independiente del pH	No tóxico; puede sufrir autopolimerización
Dietil escuarato	Aminas primarias		pH 4.5-5.5 Temperatura elevada	No tóxico; su elevado tiempo de reacción imposibilita su uso para gelificación <i>in situ</i>
Etilenglicol diglicidileter	Aminas primarias y oxiranos		pH básico Temperatura elevada	Dificultad para eliminar las trazas del reticulante
Diisocianato	Aminas primarias		pH básico Temperatura elevada	El pH básico y su elevado tiempo de reacción imposibilitan su uso para gelificación <i>in situ</i>

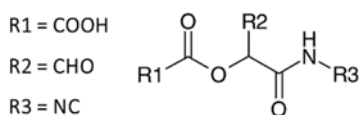
Tabla 1.III.1. Ejemplos de moléculas bifuncionales para la formación de hidrogeles covalentes. Adaptado de Bhattarai N. y col.¹²

Otro tipo de entrecruzamiento entre grupos reactivos es el que se origina por reacciones de condensación entre grupos hidroxilo o amino con grupos carboxilo o derivados, que son frecuentemente utilizados en la síntesis de polímeros para obtener poliésteres o poliamidas, respectivamente.

Uno de los reactivos más utilizados para entrecruzar polímeros solubles en agua mediante enlaces amida es la N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida, añadiendo N-hidroxisuccinimida para reducir las posibles reacciones laterales y tener un mejor control sobre la densidad de entrecruzamiento que se produce en el hidrogel. Mediante el uso de dichos compuestos se han entrecruzado polímeros biocompatibles como la gelatina¹²⁶ y el HA,¹²⁷ entre otros.

Otras de las reacciones de condensación más utilizadas dentro del campo de la síntesis de hidrogeles covalentes son las reacciones de Passerini y Ugi (figura 1.III.3). En la reacción de Passerini se hacen reaccionar un isocianuro, un aldehído (o cetona) y un ácido carboxílico para formar una α -aciloxiamida. Esta reacción multicomponente permite obtener entrecruzamientos poliméricos mediante enlaces tipo éster funcionalizados en posición α degradables a distintos rangos de temperatura y pH en función de la naturaleza de los sustituyentes. El tiempo de degradación varía de 1 a 8 días. De manera similar, la reacción de Ugi permite la formación de un enlace α -(acilamina)amida, añadiendo a la reacción de Passerini una amina primaria. En este caso, el entrecruzamiento obtenido es de tipo amida, otorgando al hidrogel mayor estabilidad y consistencia.⁶⁹ Crescezi y col. describieron la síntesis de hidrogeles basados en polisacáridos mediante el uso de este tipo de reacciones de condensación.^{128, 129}

a) Passerini



b) Ugi

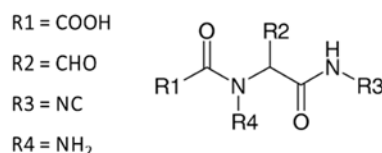


Figura 1.III.3. Reacciones de condensación de Passerini y de Ugi. Modificado de Hennink W.E. y col.⁶⁹

1.3. Método enzimático

Las enzimas a menudo presentan un alto grado de especificidad por el sustrato, evitando potencialmente reacciones secundarias durante la reticulación. Con esta ventaja, es posible controlar y predecir la cinética de reticulación, y con ello

controlar la tasa global de entrecruzamiento. Por este motivo, este método es adecuado para los sistemas de gelificación *in situ*.^{130, 131}

La ventaja del método enzimático consiste en que la reticulación del hidrogel se da en condiciones suaves sin la necesidad de la utilización de compuestos de bajo peso molecular (monómeros, iniciadores, agentes de reticulación), irradiación, o funcionalización previa del polímero para favorecer su entrecruzamiento.^{69, 130}

Un ejemplo de esta técnica es el propuesto por Chen y col.¹³⁰ que estudiaron la reticulación de gelatina y quitosán en presencia de transglutaminasa y de tirosinasa. Demostraron que la transglutaminasa cataliza la formación de hidrogeles de gelatina resistentes y permanentes (irreversibles térmicamente) sin ser necesaria la presencia de quitosán, aunque su presencia hace que la reacción sea más rápida y los hidrogeles sean más fuertes. Se estudió que la tirosinasa también cataliza la reacción quitosán-gelatina; aunque en este caso es necesaria la presencia de quitosán para la formación del hidrogel. Estos hidrogeles tienen la capacidad de cambiar de consistencia con la temperatura, de forma que se hacen más fuertes cuando se enfrían y se debilitan cuando se calientan por encima de la temperatura de fusión de la gelatina. La resistencia de los hidrogeles catalizados por ambas enzimas se puede modular modificando la composición de gelatina y quitosán.

Otro ejemplo de esta técnica es el propuesto por Sperinde y col.¹³² en el que se usó la transglutaminasa en una solución de PEG (PEG tetrahidroxilo funcionalizado con grupos glutaminil) y polilisina-fenilalanina. Esta enzima cataliza la reacción entre el grupo γ -carboxiamida del PEG y el grupo ϵ -amina de la lisina para obtener un enlace amida entre los polímeros. Las propiedades del sistema se pueden modular cambiando las proporciones de PEG y lisina.

2. Hidrogeles entrecruzados físicamente

Como se ha explicado anteriormente, en los métodos químicos el agente reticulante puede ser tóxico, requiriendo su eliminación del hidrogel previamente a su uso, con la posible alteración de su integridad. Frente a los métodos de reticulación química, la reticulación física supone ciertas ventajas, como unas condiciones de reacción más suaves debido a que no hay necesidad de usar

agentes de reticulación química, iniciadores ni foto-irradiación que puedan afectar a la integridad de células o proteínas y que sea necesario extraer antes de su aplicación.^{71, 133} El principal inconveniente de los hidrogeles de reticulación física es su inestabilidad relativa y la posible desintegración rápida e impredecible.¹³⁴

En los hidrogeles físicos o reversibles las redes se mantienen unidas por enredos moleculares y/o fuerzas secundarias como enlaces iónicos, puentes de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas. En estos hidrogeles la disolución se evita mediante las interacciones físicas que existen entre las diferentes cadenas de polímero.⁶⁹ Todas estas interacciones son reversibles y pueden romperse por cambios en las condiciones físicas (como el pH, la fuerza iónica de la solución o la temperatura) o aplicación de tensión.⁶⁴

Dependiendo de la naturaleza del sistema de reticulación, el entrecruzamiento puede producirse por interacciones iónicas, por cristalización, por entrecruzamiento de copolímeros anfifílicos, por enlaces de hidrógeno o por interacciones proteicas.

2.1. Interacciones iónicas

Estos hidrogeles se forman cuando un polímero iónico se combina con un ion multivalente de carga opuesta, ya sea otro polímero iónico, ion metálico o molécula iónica.

Cuando los polímeros aniónicos interactúan con cationes pueden formar hidrogeles. Por ejemplo, el alginato es un polímero formado por residuos de ácido glucurónico y residuos de manurónico que puede reticularse con iones de calcio divalente a temperatura ambiente y pH fisiológico. Este sistema se ha usado como apósitos para heridas,¹¹⁰ encapsulación de bacterias (como *Lactobacillus*),¹³⁵ encapsulación de células (como fibroblastos),¹³⁶ liberación de proteínas¹³⁷ e incluso se ha inyectado en tejidos cardiacos infartados para su reticulación *in situ*.¹³⁸ Dicho hidrogel se puede degradar a pH fisiológico por disipación de los iones calcio o por quelación, originando productos de degradación del alginato solubles en agua y no tóxicos que pueden ser excretados por orina.¹³⁶ Otros polímeros tipo alginato, como el polímero sintético poli-(di(carboxilatofenoxi)fosfaceno), también pueden entrecruzarse con cationes calcio.¹³⁹

Las moléculas cargadas también pueden reticular polímeros iónicos formando hidrogeles; por ejemplo, el quitosán se puede entrecruzar con moléculas con grupos aniónicos sulfatos, citratos y fosfatos (como el tripolifosfato).¹⁴⁰ Un caso especial son las moléculas entrecruzadoras que forman hidrogeles termosensibles, es decir, que reticular el polímero a temperatura corporal. En este sentido, se han propuesto distintos agentes, como la glucosa 1-fosfato¹⁴¹ y el hidrogenofosfato de amonio,¹⁴² aunque uno de los más conocidos y estudiados es el glicerol fosfato (β -GP). El β -GP forma hidrogeles termosensibles con el quitosán; esta formulación de pH fisiológico (pH 7.2) es líquida a temperatura ambiente y gelifica a 37°C.¹⁴³ Se ha demostrado que es biocompatible y estimula la proliferación de células madre mesenquimales,¹⁴⁴ además, puede encapsular condrocitos y liberar factores de crecimiento,¹⁴³ etc. por lo que puede servir como vehículo para encapsular células y aplicarse en ingeniería de tejidos. El mecanismo de reticulación no se conoce completamente, Chenite y col.¹⁴⁵ descartaron que la formación del hidrogel se deba exclusivamente a un entrecruzamiento iónico como ocurre en otros aniones divalentes, ya que en esos casos el hidrogel no es termosensible. Asimismo, se ha observado que el β -GP difunde libremente tras la gelificación y no es retenido en la red.

En el caso de la interacción entre polímeros de diferentes cargas, cuando se mezcla un polianión (polímero cargado negativamente) con un policatión (polímero cargado positivamente), pueden formarse hidrogeles o precipitar, en función de su concentración, la fuerza iónica y el pH de la solución. El principio subyacente de este método es que los polímeros con cargas opuestas se unen y forman complejos solubles o insolubles en función de la concentración y el pH de las soluciones respectivas. La formación de este tipo de hidrogeles se denomina coacervación o complejación iónica.

Por ejemplo, el quitosán es un polímero catiónico que puede entrecruzarse con polianiones naturales o sintéticos, como proteínas (gelatina,^{146, 147} colágeno, queratina, albúmina, fibroína, etc.), polisacáridos (como HA,^{148, 149} alginato,¹⁵⁰ pectina, heparina,¹⁴⁹ xantano, dextrano sulfato, sulfato de condroitina,¹⁴⁸ fucoidano,¹⁵¹ carboximetilcelulosa (CMC)) y polianiones sintéticos (como el ácido poliacrílico).¹⁵²

A modo de ejemplo se describe la formación de un coacervado de xantano (polianión) con quitosán (policación).^{153, 154} La formación de este hidrogel se lleva a cabo en varios pasos, brevemente: 1) mezcla de dos soluciones de polímeros (quitosán y xantano); 2) modificación de la concentración de los polímeros en la solución final y modificación de la estructura de éstos ya que hay un cambio de pH (a pH 6.8) debido a la mezcla de soluciones de diferente pH; 3) formación de interacciones entre los grupos $-\text{NH}_3^+$ del quitosán y los $-\text{COO}^-$ del xantano; 4) modificación estructural de las cadenas poliméricas y formación del hidrogel. Los pasos 2 y 3 corresponden a la coacervación, que consiste en la separación de soluciones poliméricas acuosas en dos fases inmiscibles: una fase coacervada (concentrada en polímeros) y una fase diluida.¹⁵⁵ En la primera capa del coacervado (superficie del polímero) las moléculas de agua se orientan por enlaces de hidrógeno. Existe una segunda capa en la que las moléculas no se orientan y que se elimina en el paso 4.¹⁵³ En definitiva, este hidrogel estaría formado por enlaces iónicos y por interacciones Van der Waals entre los dos polímeros.^{156, 157}

2.2. Cristalización

La reticulación física de un polímero para formar un hidrogel también se puede lograr por cristalización mediante el uso de ciclos de congelación-descongelación en sistemas homopoliméricos o por la formación de estereocomplejos.

La cristalización por congelación-descongelación implica la formación de microcristales en la estructura. Ejemplos de este tipo de reticulación son los hidrogeles de xantano^{66, 158} o los de PVA.^{159, 160} La formación de geles de PVA elásticos y resistentes se atribuye a la formación de cristalitas de PVA que actúan como sitios de reticulación física de la red. Las propiedades del hidrogel dependen de la concentración y peso molecular del PVA, temperatura, tiempo de congelación y número de ciclos de congelación-descongelación.¹⁵⁹ Se ha estudiado que mediante la adición de alginato a la solución de PVA antes de someterla al proceso congelación-descongelación, se pueden modificar las propiedades del sistema (al aumentar la concentración de alginato, aumenta la resistencia mecánica, lo que provoca una disminución de la liberación de los fármacos).¹⁶⁰

Otra forma de cristalización es la formación de estereocomplejos.⁶⁹ Los estereocomplejos se forman por interacciones estereoselectivas entre polímeros

con estructura estereoregular (el grupo funcional se ubica solamente en un lado del monómero) complementaria que interaccionan formando un sistema de propiedades diferentes a las de los constituyentes originales. Se ha sugerido que las fuerzas involucradas en la formación del complejo son fuerzas de Van der Waals.¹⁶¹ La formación y la composición de los complejos entre polímeros estéricamente complementarios están condicionadas por variables como la composición del medio o la temperatura.¹⁶²

Por ejemplo, Ikada y col.¹⁶³ describieron por primera vez la capacidad del ácido poliláctico (PLA) para formar estereocomplejos. El grupo de Slager y col.^{164, 165} formaron micropartículas mezclando soluciones de D-PLA y L-PLA con leuprolida y observaron que la liberación de ésta depende del método de formación del complejo, del peso molecular del PLA, de los ratios leuprolida:polímero y D-PLA:L-PLA y otros aditivos. Otro sistema fue creado por Bos y col.^{166, 167} que unieron al dextrano oligómeros de ácido D-láctico y ácido L-láctico, separadamente. La formación de este hidrogel se da a temperatura ambiente, pH fisiológico y en ambiente acuoso; la formación no es instantánea, lo que permite su inyección y gelificación *in situ*. El sistema demostró ser biocompatible, biodegradable y actuar como sistema de liberación de Interleukina-2 recombinante humana.

2.3. Copolímeros anfifílicos

Los copolímeros de carácter anfifílico pueden agregarse en agua para formar micelas e hidrogeles en los que los segmentos hidrofóbicos del polímero se autoensamblan.¹⁶⁸ Normalmente los hidrogeles se forman por copolímeros con fragmentos de distinta naturaleza o copolímeros modificados. Estos últimos pueden estar formados por un polímero hidrosoluble al que se le han unido fragmentos hidrofóbicos, o bien cadenas hidrofóbicas modificadas por fragmentos hidrosolubles.⁶⁹

Debido a la biocompatibilidad del PEG y la biodegradabilidad del PLA (o su copolímero con ácido glicólico (PLGA)) se ha investigado ampliamente la formación de hidrogeles compuestos por estos copolímeros en bloque. La liberación de fármacos puede darse por difusión pasiva y por degradación del sistema. Se han propuesto múltiples sistemas de polímeros tribloque con segmentos hidrofóbicos en medio, por ejemplo, PEG-PLGA-PEG a bajas concentraciones en agua forman

micelas y a altas concentraciones forman hidrogeles termorreversibles. La concentración crítica de gelificación y la temperatura de transición sol-gel depende en gran medida de los pesos moleculares y la composición de los bloques. Los copolímeros PEG-PLGA-PEG gelifican cuando se produce un cambio de temperatura ambiente a 37°C si la concentración es suficientemente alta. Se piensa que la reticulación ocurre por interacciones hidrofóbicas¹⁶⁹.

Otro ejemplo son los copolímeros de PLA y polioxietileno (PEO), PLA-PEO-PLA, formados por polimerización del L-láctido con PEG. Se ha sugerido que estos hidrogeles pueden retener fármacos hidrófilos en la fase PEG y fármacos hidrofóbicos en los dominios PLA. Asimismo, pueden aplicarse por inyección para la administración de cierto tipo de proteínas.¹⁷⁰⁻¹⁷³

También se han investigado los copolímeros que contienen fragmentos de distinta naturaleza compuestos por PEG y polibutileno tereftalato (un poliéster hidrofóbico). Feijen, Bezemer y colaboradores¹⁷⁴⁻¹⁷⁸ estudiaron que mediante la modificación de la emulsión se pueden formar películas o microsferas y ensayaron la liberación de varias proteínas (lisozima, albumina sérica bovina).^{176, 177} También estudiaron la degradación hidrolítica de los polímeros, concluyendo que a mayor porcentaje de polibutileno tereftalato, menor degradación. Además, modificando la relación agua/polímero durante la emulsificación se pudo controlar la liberación de proteínas.¹⁷⁶

Los polímeros con dominios hidrófobos también se pueden reticular en ambientes acuosos a través de gelificación térmica inversa (transición sol-gel). Los polímeros u oligómeros con esta capacidad se conocen como gelificantes y son moderadamente hidrófobos.^{134, 179, 180} La gelificación se produce cuando un segmento hidrófobo se acopla a un polímero hidrófilo formando un polímero anfifílico. Los polímeros anfifílicos generalmente son solubles en agua a bajas temperaturas; a medida que aumenta la temperatura, los dominios hidrófobos se agregan para minimizar el área de superficie hidrofóbica, reduciendo la cantidad de agua estructurada en torno a éstos.^{72, 181} La temperatura a la que se produce la gelificación depende de la concentración del polímero, la longitud del bloque hidrófobo y la estructura química del polímero. Algunos segmentos hidrófobos que pueden experimentar gelificación térmica inversa a una temperatura cercana a la

fisiológica son: PLGA, óxido de polipropileno, poli N-isopropilacrilamida, polipropileno fumarato, policaprolactona, poliuretano, poliorganofosfaceno.¹⁷⁹

También se pueden modificar distintos polisacáridos (como quitosán, dextrano, pululano, carboximetil curdlano) añadiendo segmentos hidrófobos que se autoensamblan formando nanohidrogeles. El grupo de Sunamoto¹⁸²⁻¹⁸⁵ obtuvo nanopartículas de pululano modificado con colesterol. Estas nanopartículas (nanohidrogeles) de 20-30 nm se pueden cargar con distintas proteínas como α -quimotripsina, albúmina bovina sérica, insulina,¹⁸⁴ o fármacos como adriamicina.¹⁸⁶ Mediante la unión covalente de lactósido o galactósido al pululano se obtienen nanopartículas cuya diana celular es la lectina RCA₁₂₀ (receptor específico de β -D-galactosa).¹⁸³

Otro ejemplo es el glicol quitosán modificado con cadenas palmitoilo que se ensamblan en vesículas poliméricas unilamelares en presencia de colesterol.¹⁸⁷ Estas vesículas son biocompatibles y hemocompatibles, y pueden encapsular fármacos hidrosolubles.¹⁸⁸ El quitosán también se ha modificado con distintos fragmentos hidrófobos para formar hidrogeles sensibles al pH o a la temperatura; por ejemplo, D,L-ácido láctico¹⁸⁹ y/o ácido glicólico,¹⁹⁰ ácido poliacrílico¹⁹¹ y poli(N-isopropilacrilamida).¹⁹² Otros polímeros como el carboximetil dextrano también se han modificado con poli(N-isopropilacrilamida)-co-N,N-dimetilacrilamida para formar hidrogeles termosensibles.¹⁹³ Por último, otro ejemplo en la misma línea es la modificación del carboximetil curdlano (polisacárido con actividad antitumoral) con una sulfonilurea para formar nanohidrogeles por autoensamblaje.¹⁹⁴

2.4. Enlaces de hidrógeno

Los hidrogeles formados por enlaces de hidrógeno pueden obtenerse por reducción del pH de soluciones acuosas de polímeros con grupos carboxilo. En este caso, los enlaces de hidrógeno sólo se forman cuando se protonan los grupos carboxílicos; esto implica que el hinchamiento de los hidrogeles es dependiente del pH.

Por ejemplo, los hidrogeles de CMC se forman mediante la dispersión de este polímero en HCl 0.1 M.¹⁹⁵ El mecanismo consiste en reemplazar el contenido de sodio presente en la CMC por protones para favorecer los puentes de hidrógeno,

disminuyendo la solubilidad del polímero en agua y formando un hidrogel de propiedades elásticas.

El ácido poliacrílico y el ácido polimetacrílico forman hidrogeles con el PEG, el enlace de hidrógeno se produce entre el oxígeno del PEG y el grupo carboxílico del ácido poli(met)acrílico.¹⁹⁶ Otro ejemplo es el hidrogel basado en ácido poliacrílico y óxido de polietileno preparado mediante la reducción del pH para formar enlaces de hidrógeno en solución acuosa.⁶⁶

Los hidrogeles formados por enlaces de hidrógeno tienen propiedades viscoelásticas debido a las extensas interacciones de estos enlaces. Estas uniones son relativamente débiles y pueden alterarse por las fuerzas de cizalla permitiendo su administración mediante inyección.¹³⁴ Sin embargo, estos hidrogeles se pueden diluir y dispersar tras unas pocas horas *in vivo* debido a la afluencia de agua desde los tejidos circundantes, por lo que su uso como sistemas de liberación de fármacos se limita a una acción corta.^{134, 179}

2.5. Interacciones proteicas

El entrecruzamiento por interacciones proteicas se puede realizar mediante el uso de proteínas de ingeniería genética o por medio de interacciones antígeno-anticuerpo.

Mediante la ingeniería genética se puede diseñar un código genético que origine secuencias peptídicas con determinadas propiedades físico-químicas e incluso se pueden obtener aminoácidos sintéticos.¹⁹⁷ En este campo fueron pioneros Tirrell¹⁹⁸ y Cappello.¹⁹⁹

Cappello y col.²⁰⁰ crearon un polímero proteico de alto peso molecular basado en una secuencia de aminoácidos tipo seda y elastina, en las que los segmentos tipo seda insolubles se asocian en hojas o hebras unidas por puentes de hidrógeno. Un cierto subconjunto de estas composiciones proteicas tipo seda-elastina, denominado ProLastins, se gelificó en una solución fisiológica. La transición sol-gel se puede controlar modificando la temperatura, las condiciones de la solución y los aditivos, los cuales pueden impedir o favorecer la cristalización de la cadena mediante puentes de hidrógeno.

Tirrell y col.²⁰¹ utilizaron métodos de ADN recombinante para crear proteínas artificiales que se someten a gelificación reversible en respuesta a cambios en el pH o la temperatura. Las proteínas están compuestas por dominios en cremallera de leucina terminales que flanquean un segmento central flexible formado por un polielectrolito soluble en agua. La formación de agregados enrollados de los dominios terminales en soluciones acuosas casi neutras y a temperatura ambiente desencadena la formación de una red polimérica tridimensional, en la que el polielectrolito retiene el solvente y evita la precipitación de la cadena. Aumentando el pH o la temperatura se disocian los agregados terminales, provocando la disolución del hidrogel. Las condiciones suaves de pH y temperatura en las que se forma el hidrogel sugieren que estos hidrogeles se podrían aplicar en encapsulación o liberación controlada de fármaco y células.

Otro tipo de entrecruzamiento por interacciones proteicas es el formado por las interacciones antígeno-anticuerpo. Por ejemplo, Miyata y col.²⁰² propusieron modificar un hidrogel de poliacrilamida para conferirle la capacidad de hincharse reversiblemente en una solución tampón en respuesta a un antígeno específico (figura 1.III.4). El sistema se preparó uniendo un antígeno y el anticuerpo correspondiente a la red polimérica; de esta forma, la unión antígeno-anticuerpo aumenta los entrecruzamientos del hidrogel de poliacrilamida. La unión competitiva del antígeno libre en el medio provoca un cambio en el volumen del hidrogel debido a la rotura de estas reticulaciones no covalentes. Además, se demostró que el hidrogel se comporta con memoria de forma, y que los cambios graduales en la concentración de antígeno pueden inducir una permeación pulsátil a través de la red.

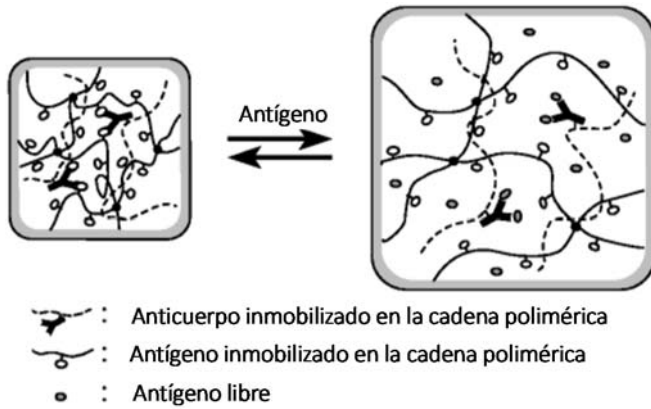


Figura 1.III.4. Diagrama del mecanismo de hinchamiento de un hidrogel semi-IPN entrecruzado por interacciones antígeno-anticuerpo en respuesta al antígeno libre. Adaptado de Miyata T. y col.²⁰²

IV. CARACTERÍSTICAS DE LOS HIDROGELES

Entre las principales características de los hidrogeles destacan su capacidad de hinchamiento y su idoneidad como sistemas de liberación controlada de fármacos. Éstas, junto con su capacidad de albergar fármacos y su mucoadhesividad, se describen en este apartado.

1. Hinchamiento

La propiedad más característica de los hidrogeles y que los hace adecuados para cualquiera de sus aplicaciones es su capacidad de hinchamiento. En el estado deshidratado, el hidrogel (xerogel) tiene una estructura cristalina y cuando entra en contacto con un medio acuoso tiende a absorber agua. En la matriz del hidrogel, el contenido en agua aumenta desde el núcleo hacia la superficie, pudiendo distinguirse tres regiones: gomosa blanda (principalmente agua), gomosa relativamente dura (hidrogel y agua) y cristalina (principalmente hidrogel). La primera región está altamente hinchada y es mecánicamente débil, esta capa actúa

de barrera frente a la difusión del agua restante; a continuación, la segunda región de la matriz está moderadamente hinchada y es relativamente fuerte; mientras que la tercera región aún no ha sido alcanzada por el agua y permanece en estado cristalino por más tiempo.²⁰³

Cuando un hidrogel se pone en un medio líquido se hincha o se deshincha hasta alcanzar el equilibrio, que es el resultado del balance entre las fuerzas osmóticas originadas por el agua al entrar en la red macromolecular y las fuerzas cohesivas-elásticas ejercidas por las cadenas de polímero que se oponen a esa expansión. Cuando el hidrogel está cargado también contribuyen a la presión osmótica las interacciones electrostáticas con el medio debidas a los grupos iónicos del polímero. Esto es debido a que el polímero cargado atrae iones de carga contraria del medio exterior para que se cumpla la electroneutralidad del sistema, lo que incrementa la presión osmótica y favorece el hinchamiento.^{204, 205} Por lo tanto, la propiedad de absorción y desorción reversible de líquido permite que el hidrogel alcance un equilibrio de hinchamiento en el que la presión osmótica sea nula; si inicialmente la presión es positiva, el hidrogel absorberá líquido y se expandirá, mientras que si la presión es negativa, expulsará fluido y se contraerá.

La penetración del agua depende de la rapidez de relajación de las cadenas de polímero, que está condicionada por distintos factores como el tipo de polímero (grupos funcionales, carga iónica, carácter hidrófilo), el secado previo del hidrogel, el tipo de entrecruzante, la densidad de entrecruzamiento y el tamaño de poro.²⁰³

En los hidrogeles con grupos funcionales ionizables, la variación del pH del medio juega un papel importante en el hinchamiento. Cuando la variación del pH del medio provoca que el pH sea superior al pK_a del grupo ionizable aniónico ($-\text{COO}^-$, $-\text{OPO}_3^-$, $-\text{OSO}_3^-$, $-\text{SO}_3^-$, $-\text{OCS}_2^-$, $-\text{OPO}_3^{2-}$, $-\text{PO}_3^{2-}$, $-\text{PO}_2^{2-}$, $-\text{SiO}_2^{2-}$) o sea inferior al pK_b del grupo ionizable catiónico ($-\text{NH}_3^+$, $-\text{NRNH}_2^+$, $-\text{NR}_2\text{H}^+$, $-\text{NR}_3^+$, $-\text{S}^+$, $-\text{P}^+$), aumenta el grado de ionización, el número de cargas fijadas en la red y las repulsiones electrostáticas entre las cadenas. Esto conlleva un aumento de la hidrofilia y del hinchamiento del hidrogel, a causa del cual aumenta el tamaño de los poros de la red polimérica y facilita la migración de las moléculas de fármaco hacia el exterior del hidrogel (liberación).²⁰⁶

El grado de hinchamiento es directamente proporcional a la cantidad de agua captada. Experimentalmente se puede determinar por una diferencia de pesos, según la ecuaciones 1.IV.1 y 1.IV.2 que describen el hinchamiento a tiempo t (Q_t) y el hinchamiento en equilibrio (Q_∞), respectivamente:

$$Q_t = \frac{m_t - m_0}{m_0} \quad (1.IV.1)$$

$$Q_\infty = \frac{m_\infty - m_0}{m_0} \quad (1.IV.2)$$

donde m_0 es el peso inicial del hidrogel seco (xerogel), m_t es el peso del hidrogel a tiempo t y m_∞ es el peso del hidrogel en equilibrio.

El grado de hinchamiento en equilibrio influye en la fuerza mecánica del hidrogel y la permeabilidad a los solutos. Aumentando el grado de entrecruzamiento se reduce el hinchamiento del hidrogel y el tamaño de poro, lo que limita la movilidad de los fármacos; por tanto, modificando el grado de entrecruzamiento se puede controlar la liberación del fármaco.

1.1. Cinéticas de hinchamiento

Dado que el hinchamiento es la característica principal de los hidrogeles, es muy útil conocer la cinética que rige este comportamiento para mejorar el diseño de los sistemas de liberación. Existen distintos modelos matemáticos para describir el hinchamiento de los hidrogeles, entre ellos la cinética de orden uno y la de orden dos.²⁰⁶ La cinética de orden uno puede describirse mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = 1 - e^{(-k_1 t)} \quad (1.IV.3)$$

O lo que es lo mismo:

$$\frac{Q_\infty}{Q_\infty - Q_t} = e^{k_1 t} \quad (1.IV.4)$$

donde Q_t es el hinchamiento a tiempo t , Q_∞ es el hinchamiento en equilibrio y k_1 es la constante de velocidad de hinchamiento de orden uno.

Otro de los modelos estudiados es la cinética de orden dos, que tiene en cuenta la superficie interior del hidrogel que aún no ha interactuado con el agua a tiempo t pero que se hidratará a medida que pasa el tiempo; esta cinética puede calcularse mediante la ecuación de Schott.²⁰⁷

$$\frac{t}{Q_t} = \frac{1}{kQ_\infty^2} + \frac{t}{Q_\infty} \quad (1.IV.5)$$

Considerando $k \cdot Q_\infty^2 = K_\infty$ (constante de velocidad aparente de hinchamiento en equilibrio) se expresa:

$$\frac{t}{Q_t} = \frac{1}{K_\infty} + \frac{t}{Q_\infty} \quad (1.IV.6)$$

Por lo que representando el cociente t/Q_t en función del tiempo, se obtiene una recta cuya ordenada en el origen es $1/K_\infty$ y cuya pendiente es $1/Q_\infty$.

1.2. Efecto de sobrehinchamiento

Este efecto, llamado *overshooting effect* en inglés, consiste en un sobrehinchamiento inicial del hidrogel seguido de una disminución del mismo hasta alcanzar el equilibrio (figura 1.IV.1). Se han descrito distintas explicaciones posibles de este efecto. Por ejemplo, Peppas y col.²⁰⁸⁻²¹¹ y Lee y col.²¹² propusieron que el agua difunde en la red antes de que la cadena se relaje (máximo en la curva de hinchamiento), cuando las cadenas se relajan el sistema alcanza el equilibrio y el agua que estaba en exceso tiende a abandonar el hidrogel. Otra explicación puede ser que se generen fuerzas intermoleculares que aumenten el grado de entrecruzamiento, pudiendo establecerse entrecruzamientos físicos adicionales por formación de enlaces de hidrógeno²¹³ o por pares iónicos.²¹⁴ Otra explicación a este fenómeno se basa en el hecho de que durante la formación de *clusters* de moléculas de agua (aglomerados de moléculas) en la matriz del hidrogel, las celdas de hidratación ion-dipolo se aproximan y se superponen originando una expulsión de moléculas de agua debido a compatibilidad termodinámica.²¹⁵

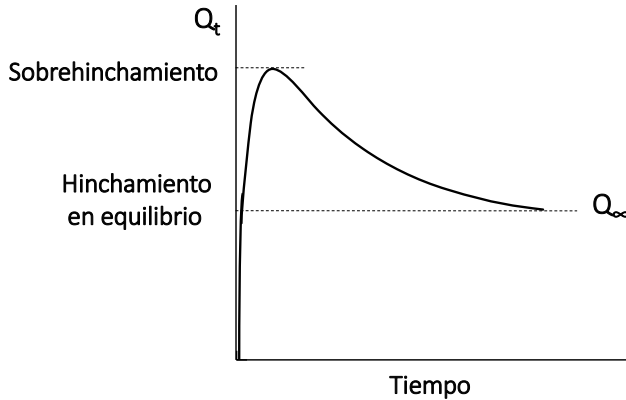


Figura 1.IV.1. Representación del proceso de sobrehinchamiento de un hidrogel

2. Liberación modificada

2.1. Capacidad de albergar fármacos

Debido a la estructura tridimensional de los hidrogeles es posible albergar fármacos u otras moléculas en su interior. La incorporación de fármacos puede realizarse por dos técnicas:⁷

- Cargado posterior a la formación del hidrogel: Tras la formación del hidrogel, el fármaco se carga por absorción. Si el hidrogel es inerte, la liberación de los fármacos será por difusión y/o hinchamiento; si el hidrogel tiene ligandos de unión al fármaco se ha de tener en cuenta la interacción polímero-fármaco en su liberación.
- Cargado *in situ*: Los fármacos o los conjugados fármaco-polímero se mezclan con el polímero antes de la formación del hidrogel, por lo que la gelificación y la encapsulación del fármaco se dan simultáneamente. En estos sistemas la liberación de los fármacos puede ser por difusión, hinchamiento o por control químico.

2.2. Mecanismos de liberación desde hidrogeles

Los hidrogeles, como sistemas de liberación controlada, pueden clasificarse en tres tipos según se trate de sistemas controlados por difusión, hinchamiento o

químicamente. La figura 1.IV.2 recoge los principales tipos de liberación controlada.

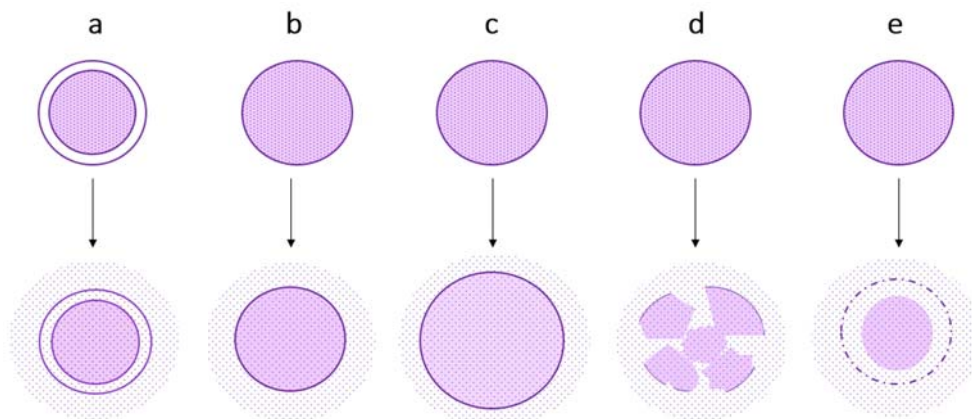


Figura 1.IV.2. Esquemas de liberación controlada por: a) difusión a partir de un sistema reservorio, b) difusión a partir de un sistema matricial, c) hinchamiento, d) químicamente por erosión homogénea, e) químicamente por erosión heterogénea

2.2.1. Liberación controlada por difusión

Este es el mecanismo de liberación más común en los hidrogeles. La difusión se define como el movimiento de moléculas individuales desde la zona de mayor concentración de soluto a la zona de menor concentración cuando el sistema está separado por una membrana polimérica; este fenómeno de difusión se atribuye principalmente al movimiento browniano.²¹⁶ La difusión se puede describir mediante las leyes de Fick.

En los hidrogeles porosos, cuando el tamaño de los poros es mucho mayor que las dimensiones moleculares del fármaco, el coeficiente de difusión está relacionado con la porosidad y la tortuosidad del hidrogel.²¹⁷ En los hidrogeles con tamaño de poro similar al tamaño de la molécula y en los no porosos, el coeficiente de difusión del fármaco disminuye debido al impedimento estérico causado por las cadenas de polímero; en estos casos, el volumen disponible para la movilidad disminuye y la resistencia hidrodinámica aumenta, lo que aumenta la longitud de la trayectoria de difusión del fármaco comparado con los hidrogeles con tamaño de poro grande.⁷

Los sistemas de liberación que utilizan este fenómeno pueden clasificarse en sistemas reservorio o sistemas matriciales.²¹⁶

A. Sistemas reservorio

En los sistemas de liberación tipo reservorio, el fármaco se encuentra en el núcleo rodeado por una membrana polimérica uniforme tipo hidrogel que permite la difusión del fármaco a su través.^{206, 218} Cuando el sistema entra en contacto con el agua, ésta difunde y disuelve el fármaco hasta su concentración de saturación (C_s); entonces, el fármaco difunde a través de la membrana hasta el exterior debido al gradiente de concentración (primera ley de Fick), disminuyendo la concentración del núcleo. Simultáneamente, el agua sigue disolviendo el fármaco del núcleo de nuevo hasta la C_s . En teoría, la liberación permanece constante en el tiempo siguiendo una cinética de orden cero, y una vez que el fármaco va agotándose en el interior la liberación es dependiente de la concentración y sigue una cinética de orden uno.²¹⁶ La representación de este tipo de sistemas se ilustra en la figura 1.IV.2 a.

B. Sistemas matriciales

En los sistemas de liberación matriciales, el fármaco está disperso homogéneamente en la matriz del hidrogel. Cuando el hidrogel se encuentra en un medio acuoso, el agua difunde a través de la matriz hidratándola desde la superficie al interior, el fármaco se disuelve y sale por difusión al exterior a través de la matriz o de los poros.²¹⁶ La velocidad de liberación del fármaco disminuye con el tiempo debido, principalmente, a que el recorrido de difusión aumenta continuamente. Para sistemas matriciales donde el fármaco está uniformemente disperso en una matriz de geometría plana, la difusión del fármaco se describe por la segunda ley de difusión de Fick o modificaciones de esta ecuación.²⁰⁶ La figura 1.IV.2 b ilustra la liberación a partir de un sistema matricial.

2.2.2. Liberación controlada por hinchamiento

Estos sistemas consisten en matrices hidrófilas en las que la cesión del principio activo está controlada por la entrada de moléculas de solvente que producen el hinchamiento de la matriz polimérica. En estos sistemas los fármacos están

disueltos o formando una dispersión en los polímeros en estado cristalino o vítreo. Como se ha explicado, los hidrogeles en hinchamiento tienen una fase de transición del estado cristalino, donde las moléculas permanecen inmóviles, a un estado gomoso, donde las moléculas difunden rápidamente. El proceso de liberación controlado por hinchamiento se representa en la figura 1.IV.2 c.

En los sistemas de liberación controlada por hinchamiento, el parámetro que limita la relajación de las cadenas γ , por tanto, la liberación del fármaco es la velocidad de hinchamiento; a diferencia de lo que ocurre en los sistemas controlados por difusión, donde la velocidad de difusión es el paso limitante. El número Deborah (De) se usa para comparar estos dos mecanismos de liberación: $De = \lambda/t$, donde λ es el tiempo para la relajación del polímero; si $De \gg 1$ es liberación por hinchamiento y $De \ll 1$ es liberación por difusión.⁷

2.2.3. Liberación controlada químicamente

Estos sistemas se pueden dividir en dos subclases:⁷

A. Sistemas erosionables

En ellos la liberación del fármaco ocurre por la degradación (hidrolítica o enzimática) y/o disolución de la matriz, que exponen el fármaco al medio de disolución. Existe dos tipos de erosión, homogénea o heterogénea, dependiendo del grado de hidrofobicidad y morfología del polímero; en la erosión homogénea la degradación tiene lugar en toda la matriz mientras que en la erosión heterogénea la degradación se produce únicamente en la superficie. Cuanto más hidrófilo sea el polímero es más probable que la erosión sea homogénea debido a que tiene capacidad de absorber mayor cantidad de agua; cuanto más cristalino sea el polímero más heterogénea será la erosión ya que las regiones cristalinas excluyen al agua. La figura 1.IV.2 d-e representa la liberación de fármacos por erosión homogénea y por erosión heterogénea, respectivamente.

B. Sistemas con cadenas laterales

En estos sistemas el fármaco está unido químicamente a las cadenas poliméricas de la que posteriormente se libera por rotura hidrolítica o enzimática de los enlaces.

2.3. Modelos matemáticos de cinéticas de liberación

Los modelos matemáticos permiten determinar los mecanismos de liberación de un fármaco desde el hidrogel y los parámetros que rigen ese modelo, lo que resulta útil para caracterizar y comparar diferentes perfiles de liberación, y facilita el diseño de nuevas matrices poliméricas como sistemas de liberación modificada. Existen varios modelos para representar los perfiles de liberación que relacionan la cantidad de fármaco liberado en función del tiempo transcurrido.

Mediante el ajuste de los datos experimentales de un perfil de liberación a los modelos matemáticos, es posible determinar el mecanismo (o combinación de mecanismos) predominante en la cinética de liberación de un fármaco.

Korsmeyer, Peppas y col.²¹⁹ desarrollaron un modelo que relaciona la liberación del fármaco con el tiempo a través de una ecuación exponencial y es especialmente útil cuando se desconoce el mecanismo de liberación o cuando ésta ocurre por más de un mecanismo. Este modelo, que se ajusta principalmente al 60-70% de la cantidad de fármaco liberada, se describe mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (1.IV.7)$$

donde t es el tiempo de liberación, M_t es la cantidad de fármaco liberada en el tiempo t , M_∞ es la cantidad total de fármaco liberada o la que se liberaría a tiempo infinito (por tanto, M_t/M_∞ es la fracción de fármaco liberado a tiempo t), k es una constante cinética que depende de las características estructurales y geométricas de la matriz polimérica, y n es el exponente difusional. La representación del logaritmo de M_t/M_∞ en función del logaritmo de t dará lugar a una línea recta si el sistema se ajusta a este modelo.

El valor de n es un indicador del mecanismo de liberación, toma distintos valores dependiendo de la geometría de la matriz, pero en general:²²⁰⁻²²²

- Valores cercanos a 0.5 (0.43-0.5, según geometría de la matriz) indican que la liberación es por difusión de Fick. En este caso, el estudio se puede continuar aplicando el modelo de Higuchi (liberación proporcional a la raíz cuadrada del tiempo).
- Valores cercanos a 1 (0.85-1, según geometría de la matriz) indican que la liberación está controlada por procesos de relajación de las cadenas del polímero, lo que se denomina transporte "Caso II". Estos perfiles presentan una liberación constante en el tiempo que se ajusta al modelo cinético de orden cero cuya liberación es independiente de la cantidad de fármaco remanente.
- Valores comprendidos entre los dos anteriores (variables según geometría) indican que en la liberación influye tanto la difusión como la relajación de las cadenas poliméricas, y se denomina "Transporte anómalo". En este caso, se puede estudiar el perfil de liberación empleando el modelo cinético de orden uno o mediante el modelo aditivo de Peppas-Sahlin, que indica la contribución de cada proceso al mecanismo global de liberación.
- Valores superiores a 1 (0.85- 1, según geometría de la matriz) aparecen generalmente cuando los tiempos de liberación son muy elevados, denominándose "Transporte Super Caso II".²²¹

Cuando n toma valores inferiores a 0.5 (o 0.45, según geometría de la matriz) puede concluirse que el mecanismo de liberación es por difusión de Fick²²³⁻²²⁶ o difusión casi fickiana^{227, 228} posiblemente debida a una combinación de mecanismos de difusión a través de la matriz hinchada y difusión a través de poros llenos de agua.²²⁹ Estos valores se suelen obtener en perfiles con efecto *burst*, que presentan una liberación inicial muy rápida.²³⁰

Además de los modelos matemáticos descritos, existen otros modelos para predecir los perfiles de liberación desde hidrogeles como la cinética de orden uno (liberación proporcional a la cantidad de fármaco remanente en la matriz), el

modelo de Hixson-Crowell o de la raíz cúbica (cuando la forma farmacéutica disminuye proporcionalmente conservando la misma geometría inicial), el de Weibull (modelo empírico sin fundamento cinético), el de Baker–Lonsdale (liberación del fármaco a partir de una matriz esférica) y el de Hopfenberg (liberación por erosión de la superficie de la matriz), principalmente.²³¹⁻²³³

3. Mucoadhesividad

La bioadhesión se puede definir como un proceso en el que dos materiales, al menos uno de ellos de naturaleza biológica, se unen por un periodo de tiempo prolongado debido a la presencia de fuerzas interfaciales; cuando en esta adhesión interviene el mucus o la membrana mucosa se denomina mucoadhesión.²³⁴ La mucoadhesividad está presente en algunos hidrogeles, en función de su composición polimérica; de hecho, el polímero es el que confiere dicha característica al sistema.

El estudio de estas propiedades ha permitido el diseño de distintos sistemas para la liberación de fármacos en piel y mucosas (tracto gastrointestinal, vía nasal, ocular, bucal, vaginal y rectal) ya que permiten prolongar el tiempo de residencia de dicho sistema en una determinada localización, reteniéndolo en un lugar de acción (acción local) o manteniéndolo en íntimo contacto con el lugar de absorción (acción sistémica).

La mucosa es el tejido que reviste las paredes internas de los órganos que están en contacto con el exterior del cuerpo; está compuesta por una capa de tejido conectivo (lámina propia) recubierta por células epiteliales cuya superficie se mantiene húmeda, lubricada y protegida de daños físicos y químicos gracias a una capa de mucus. Éste se compone de glicoproteínas (mucinas), lípidos, sales inorgánicas y agua (más del 95% del peso del mucus es agua). La mayoría de las mucinas están cargadas negativamente debido a la presencia de ácido siálico y éster-sulfatos que están totalmente ionizados a $\text{pH} > 2.6$.^{24, 234}

El mecanismo de la mucoadhesión se divide generalmente en dos etapas: la etapa de contacto y la etapa de consolidación. La primera etapa se caracteriza por el contacto entre el polímero y la membrana mucosa, humectación e hinchamiento de la formulación para permitir un contacto íntimo con la capa de moco. En la

etapa de consolidación, los materiales mucoadhesivos se activan por la presencia de humedad, lo que plastifica el sistema y permite la formación de enlaces entre las cadenas.²³⁵

Existen varias teorías para explicar los mecanismos implicados en el complejo proceso de bioadhesión; estas teorías se describen brevemente a continuación:^{234, 236}

- **Teoría electrónica:** esta teoría considera que tanto el material bioadhesivo como el tejido presentan diferente carga eléctrica, lo que origina una doble capa eléctrica en la interfase entre ambos. En este caso, las fuerzas de atracción electrostática se deben a la transferencia de electrones entre las glicoproteínas de la mucina y el polímero.
- **Teoría de adsorción:** propone que las fuerzas principales que contribuyen a la interacción adhesiva se deben a fuerzas de Van der Waals y enlaces de hidrógeno.
- **Teoría mecánica:** asume que la adhesión surge del anclaje de un adhesivo líquido sobre las irregularidades superficiales del sustrato rugoso que suponen un aumento del área superficial disponible para su interacción.
- **Teoría de la humectación:** esta teoría se aplica principalmente a líquidos y sistemas adhesivos de baja viscosidad. Explica la capacidad bioadhesiva de un polímero en función de su coeficiente de dispersión (es decir, de su capacidad para distribuirse sobre la superficie biológica) con el fin de desarrollar contacto y uniones por interacciones intermoleculares y tensión interfacial.
- **Teoría de la difusión:** también conocida como teoría de la interpenetración, entiende la bioadhesión como resultado de un gradiente de concentración entre las moléculas del sustrato biológico y las cadenas flexibles del polímero hasta desarrollar un enredamiento físico entre ambas. Durante el contacto inicial se establecen fuerzas débiles que propician la movilidad de las cadenas poliméricas; la segunda etapa implica la interpenetración de las cadenas de polímero en la capa de mucus, cuya profundidad de

penetración depende del coeficiente de difusión, del tiempo de contacto y la fuerza adhesiva del polímero.

- **Teoría de la fractura:** difiere de las otras cinco en que ésta relaciona la fuerza de adhesión con la fuerza requerida para despegar las superficies adheridas, asumiendo que la rotura ocurre en la interfase entre ambas superficies; el esfuerzo de fractura asociado al punto de rotura es equivalente a la fuerza de unión bioadhesiva.

La unión entre el sistema bioadhesivo y la mucina está determinada por factores relacionados con el polímero, factores ambientales y fisiológicos. Entre los factores ambientales destaca el pH, la fuerza aplicada, el tiempo de contacto y el hinchamiento; como factores fisiológicos influyen la renovación de mucina y estados patológicos. En cuanto a los factores relacionados con el polímero, se encuentran el peso molecular, longitud de la cadena, densidad de entrecruzamiento, disposición espacial, flexibilidad, hidratación, enlaces de hidrógeno, concentración del polímero, carga y grado de ionización del polímero. La capacidad bioadhesiva del polímero aumenta con el peso molecular hasta ciertos límites, ya que los pesos moleculares altos impiden la interacción de los grupos del polímero con el sustrato; la flexibilidad del polímero permite una mayor interpenetración y enredamiento con la capa mucosa; el entrecruzamiento limita la flexibilidad de las cadenas y su hinchamiento, por lo que a mayor grado de entrecruzamiento menor interpenetración entre el polímero y la mucina; el grado de ionización del polímero guarda relación con el pH del medio, ya que como se ha comentado, las moléculas de mucina tienen cargas negativas a pH neutro lo que origina fuertes interacciones con polímeros policatiónicos.²³⁷

Un sistema mucoadhesivo ideal debe cumplir las siguientes características:^{235, 237, 238}

- El polímero y sus productos de degradación deben ser biocompatibles, no tóxicos ni irritantes para la mucosa, ni deben ser absorbibles en el tracto gastrointestinal.
- Debe formar preferiblemente enlaces no covalentes fuertes con las superficies de las células epiteliales y la mucina.
- Debe adherirse rápidamente y poseer especificidad de sitio.

- Debe tener capacidad de hincharse y liberar el fármaco.
- No debe interactuar con el principio activo para que éste pueda liberarse y absorberse a través de la superficie de la mucosa.
- No debe descomponerse en el almacenamiento o durante la vida útil de la forma de dosificación.
- El coste de polímero no debe ser elevado para que la forma de dosificación preparada sea económicamente competitiva.

Los polímeros mucoadhesivos pueden clasificarse atendiendo a su origen en sintéticos y naturales; entre los polímeros naturales se encuentran proteínas y polisacáridos como HA y quitosán, y los polímeros sintéticos se dividen en biodegradables (poliésteres, polianhídridos, poliamidas, polímeros fosforilados, entre otros) y no biodegradables (derivados de celulosa, siliconas, entre otros).²³⁷

En el caso del quitosán, su mucoadhesividad se debe principalmente a las interacciones electrostáticas entre los grupos catiónicos del polímero con los grupos aniónicos de la mucina; no obstante, se ha descrito la existencia de interacciones hidrofóbicas e interacciones no electrostáticas que contribuirían a esa mucoadhesividad. Respecto a estas últimas, cuando los grupos amino están desprotonados, el polímero puede formar puentes de hidrógeno con la mucina a través de los grupos hidroxilo no iónicos.²⁴ La intensidad de la mucoadhesión de este polímero depende de múltiples factores como el grado de desacetilación, el peso molecular y su concentración; en general, cuanto mayor es el grado de desacetilación y su peso molecular mayor es la mucoadhesión.²³⁹

V. APLICACIONES DE LOS HIDROGELES

Tras más de cincuenta años de investigación en este campo, desde 1960 cuando Wichterle y Limm propusieron el primer hidrogel aplicado como lentes de contacto² hasta la actualidad, los hidrogeles se han estudiado ampliamente en distintos campos de la ciencia. Las principales áreas de aplicación de los hidrogeles en el campo de la biomedicina y la salud se pueden clasificar, según algunos autores,³ en: sistemas de liberación de fármacos, ingeniería tisular, lentes de contacto de hidrogel, apósitos para heridas y productos de higiene. A continuación, se ofrece una visión global de dichas áreas en mayor o menor profundidad según los temas tratados en el presente trabajo de investigación.

1. Sistemas de liberación de fármacos

La administración de fármacos en el organismo supone una herramienta de indudable utilidad en el tratamiento de innumerables enfermedades; sin embargo, no está exenta de riesgos ya que los fármacos pueden ocasionar múltiples efectos

secundarios. Es por ello que se hace necesario desarrollar estrategias farmacéuticas que mejoren las características de los tratamientos.

Las formas farmacéuticas de liberación convencional, también llamadas formas farmacéuticas de liberación inmediata (FFLI), son preparaciones en las que la liberación de la sustancia o sustancias activas no está deliberadamente modificada por un diseño de formulación particular ni por un método de fabricación especial.²⁴⁰ En las FFLI la administración de una dosis única provoca un aumento de concentraciones plasmáticas hasta un valor máximo que a continuación empieza a decaer, en función de sus parámetros farmacocinéticos. Para conseguir un efecto terapéutico duradero en el caso de las FFLI, es necesario recurrir a dosis múltiples, que pueden producir fluctuaciones acusadas en los niveles plasmáticos, situándose por debajo o incluso por encima de los niveles terapéuticos, como se muestra en la figura 1.V.1.

Las formas farmacéuticas de liberación modificada (FFLM) son aquellas en las que la velocidad y/o el lugar de liberación de la sustancia o sustancias activas es diferente del de la FFLI, administrada por la misma vía.²⁴⁰ Las FFLM, también llamadas de liberación controlada, son una alternativa a los sistemas de liberación convencionales para lograr una concentración terapéutica estable en el tiempo sin la necesidad de recurrir a administraciones sucesivas (figura 1.V.1) y para obtener una liberación dirigida a dianas terapéuticas o lugares específicos. Esta última tiene como objetivo evitar o reducir la presencia del agente terapéutico en el resto del organismo, disminuyendo de esta forma los efectos secundarios. Por tanto, las FFLM presentan interesantes ventajas frente a las FFLI, tales como: a) disminución de la frecuencia de administración del medicamento, mejorando el cumplimiento terapéutico del paciente, b) reducción de los efectos secundarios relacionados con dosis elevadas, c) disminución de la fluctuación de niveles plasmáticos, d) efecto terapéutico más uniforme.

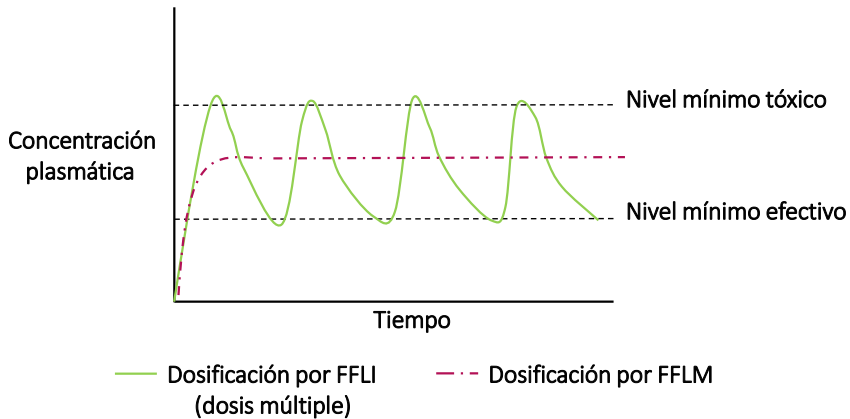


Figura 1.V.1. Perfil general de los niveles plasmáticos de fármaco tras la administración de dosis múltiples de una FFLI comparado con el perfil obtenido con la administración de una FFLM

En la bibliografía se describen innumerables ejemplos de hidrogeles como sistemas de liberación de fármacos para administración peroral (bucal y gastrointestinal), tópica, transdérmica, rectal, vaginal, oftálmica, nasal, ótica y parenteral (subcutánea, intramuscular e intravenosa). A su vez, la mayoría pueden tener efecto local o sistémico, a excepción de aquellas que, por su definición, implican la actuación del fármaco a uno de estos niveles.

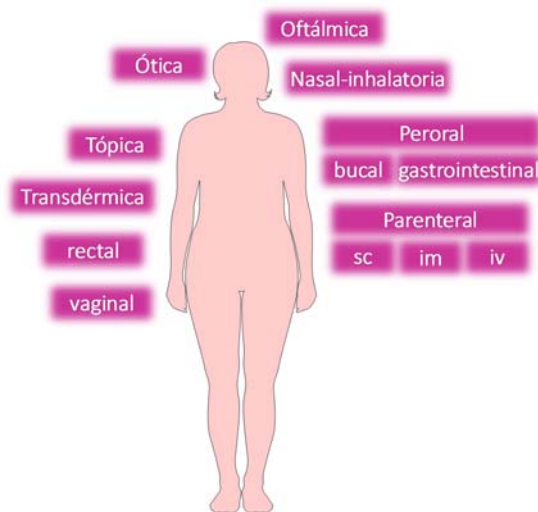


Figura 1.V.2. Esquema de las principales vías de administración de los hidrogeles. (sc: subcutánea, im: intramuscular, iv: intravenosa)

1.1. Administración peroral

En la administración peroral, la liberación de los fármacos puede ser en la boca o en el tracto gastrointestinal (estómago, intestino delgado y/o colon). Los hidrogeles pueden actuar como sistemas de liberación controlada modulando sus propiedades bioadhesivas y de hinchamiento, ya que la adhesión a una región específica del tracto gastrointestinal aumenta el tiempo de permanencia en esa zona y, por tanto, la concentración de fármaco liberada en ese lugar. Esto se puede utilizar para el tratamiento local o para aumentar la absorción sistémica.

1.1.1. Administración en la cavidad bucal/sublingual

La administración en la cavidad bucal tiene una gran variedad de aplicaciones en el tratamiento de afecciones locales bucales y/o sistémicas, donde la vía sublingual es la vía principal de absorción en la cavidad bucal. En el caso de absorción a nivel sistémico, el fármaco se incorpora a la circulación en la vena cava superior, evitando el efecto de primer paso.

La administración bucal y sublingual poseen ventajas comunes, como fácil administración y/o eliminación del lugar aplicado y adherencia terapéutica del paciente. Los inconvenientes de esta vía de administración son la pérdida de parte del fármaco para la absorción en la cavidad bucal debido a la dilución del mismo en la saliva, tiempo de retención bajo y que la mucosa actúa como una barrera para los fármacos, especialmente los macromoleculares.²⁴¹ Entre las ventajas en la absorción a nivel sistémico, destaca un inicio rápido de la acción farmacológica debido a la rápida absorción directamente a la circulación sistémica (vía venas maxilares y sublinguales) evitando el primer paso por el hígado (útil en fármacos que sufren un gran metabolismo de primer paso) y la degradación ácida y/o enzimática que sufren los fármacos en estómago e intestino, respectivamente.²⁴¹

En tratamientos de acción sistémica, se han estudiado hidrogeles en forma de ungüentos para administración bucal de β -estradiol para la osteoporosis.²⁴² Un ensayo clínico con pacientes con el síndrome Sjögren demostró la eficacia de un dispositivo basado en un hidrogel no biodegradable para el tratamiento sistémico con pilocarpina que queda retenido en el lugar de aplicación durante 3 horas debido a la mucoadhesividad del polímero y al hinchamiento del hidrogel.²⁴³

Los hidrogeles también pueden aplicarse para el tratamiento local de enfermedades periodontales, estomatitis, infecciones fúngicas y virales y cánceres en la cavidad oral, entre otras. Por ejemplo, se han desarrollado hidrogeles de quitosán y laurocapram (potenciador de la permeación) con celecoxib para prevención del cáncer oral o en el tratamiento de lesiones en la mucosa oral, con mayor tiempo de retención debido a la mucoadhesividad del polímero y reducción de la absorción del fármaco a nivel sistémico, permitiendo un efecto local al quedar retenido en la mucosa.²⁴⁴

Asimismo, se ha estudiado la combinación de diferentes sistemas tecnológicos para mejorar las propiedades de las formulaciones en distintas vías de aplicación; así, se han formulado hidrogeles como vehículo para administrar liposomas,²⁴⁵ transportadores lipídicos nanoestructurados (NLC), etc. Por ejemplo, en la formulación de hidrogeles con NLC que contienen miconazol, el sistema polimérico mejora las propiedades reológicas aumentando el tiempo de retención y facilita la aplicación tópica en la mucosa bucal, mientras que los NLC proporcionan una liberación controlada del fármaco y aumentan su actividad antifúngica en la cavidad oral.²⁴⁶

1.1.2. Administración oral

La ruta gastrointestinal es la vía preferida para la administración de fármacos ya que es más fácil y cómoda para el paciente, por lo que aumenta la adherencia al tratamiento. Asimismo, esta vía presenta una amplia superficie para la absorción sistémica de los principios activos. Los hidrogeles que tienen como diana el tracto gastrointestinal pueden diseñarse para la administración local o sistémica de los fármacos.

Existen distintas estrategias para conseguir la liberación de fármacos en estómago, como hidrogeles sensibles a pH, mucoadhesivos, sistemas flotantes, etc. Por ejemplo, para el tratamiento de las infecciones por *Helicobacter pylori* en úlceras pépticas, se han propuesto hidrogeles sensibles al pH (quitosán-óxido de polietileno, semi-IPN) que liberan antibióticos como amoxicilina y metronidazol en el ambiente ácido del estómago, mientras que la liberación a pH intestinal es significativamente menor.²⁴⁷ Para la administración de estos fármacos también se ha desarrollado un hidrogel mucoadhesivo de quitosán y ácido poliacrílico

entrecruzados por complejación iónica con los cuales se modula la liberación de dichos activos en función de la proporción de quitosán.²⁴⁸

Otra de las estrategias para aumentar el tiempo de retención gástrica es desarrollar sistemas flotantes cuya densidad es menor que la del jugo gástrico. Por ejemplo, Cavda y col.²⁴⁹ desarrollaron un hidrogel superporoso a partir de CMC, ácido acrílico y acrilamida para la administración de clorhidrato de ranitidina cuya flotación en el medio de disolución demostró ser superior a 18 horas.

El desarrollo de sistemas dirigidos a liberar el activo terapéutico en el intestino, evitando la degradación ácida del estómago, se ha estudiado por muchos autores. Dai y col.²⁵⁰ propusieron hidrogeles iónicos en forma de microesferas de N-succinil quitosán y alginato que contienen nifedipino; este fármaco se libera a pH neutro, mientras que a valores de pH inferiores, como en estómago, la liberación es mínima. Como tratamiento para la enfermedad inflamatoria intestinal, Knipe y col.²⁵¹ propusieron un complejo sistema de microgeles basados en ácido metacrílico y N-vinil-pirrolidona degradables enzimáticamente a pH 6-7.5, que contienen en su interior NHs cargados con siARN (ARN interferente pequeño). Los microgeles protegen los NHs en el estómago y se degradan en intestino, donde los macrófagos endocitan los NHs, y éstos liberan el siARN en el citosol provocando la inactivación del TNF- α , diana terapéutica de este tratamiento.

La administración de péptidos y proteínas en el tracto gastrointestinal se ha investigado ampliamente, principalmente con objeto de evitar la inactivación de proteínas por enzimas digestivas y mejorar su permeabilidad intestinal. Por ejemplo, Akiyama y col.²⁵² propusieron un hidrogel con actividad inhibitora de la proteasa utilizando carbopol (C934P), que es un polímero de ácido poliacrílico con efecto inhibitor sobre la actividad hidrolítica de la tripsina. Lowman y col.²⁵³ desarrollaron un hidrogel en forma de micropartículas basado en copolímeros reticulados de ácido polimetacrílico modificados con cadenas de PEG que contenían insulina. Las micropartículas protegen esta hormona polipeptídica del ambiente ácido del estómago y la liberan en el intestino delgado. El ensayo en ratas demostró que los niveles de glucemia se redujeron significativamente durante al menos 8 horas debido a la absorción de la insulina en el tracto gastrointestinal.

Existen distintas causas por las que es necesario formular sistemas de liberación específicos de colon para la administración de fármacos, péptidos o proteínas: tratamiento de enfermedades localizadas en el colon (como cáncer de colon), baja permeabilidad en intestino delgado, degradación en el ambiente ácido del estómago y por las enzimas del intestino delgado, entre otras.²⁵⁴

La incapacidad de las enzimas digestivas del tracto gastrointestinal para digerir ciertos polisacáridos junto con la capacidad de las enzimas bacterianas del colon para degradarlos ha supuesto la clave para desarrollar hidrogeles para liberación específica en colon. Estos hidrogeles están compuestos por polisacáridos como pectina,²⁵⁵ goma guar,^{256, 257} inulina,²⁵⁸ dextrano,²⁵⁹ sulfato de condroitina,²⁶⁰ quitosán²⁶¹ o alginato,^{262, 263} entre otros.

Otra estrategia para la liberación en colon es entrecruzar los polímeros con enlaces azo, de forma que las azoreductasas bacterianas presentes principalmente en colon degraden el enlace y liberen los agentes terapéuticos.²⁶⁴⁻²⁶⁷

También se ha recurrido a los hidrogeles sensibles al pH para tratamientos específicos de colon. Por ejemplo, se han propuesto NHs basados en polímeros metacrílicos obtenidos por polimerización en microemulsión para el tratamiento de cáncer de colon con 5-fluorouracilo. Estos NHs han conseguido una mayor citotoxicidad que el fármaco libre para una misma concentración de 5-fluorouracilo y una liberación del antitumoral dependiente de pH (mayor liberación a pH 7-8 que a pH ácido).²⁶⁸

1.2. Administración sobre la piel: tópica y transdérmica

La administración de una formulación sobre la piel puede dar lugar a un efecto local (administración tópica) cuando el fármaco queda retenido en la misma, con una absorción a nivel sistémico despreciable, o un efecto sistémico (administración transdérmica) cuando el fármaco penetra a través de los estratos y llega a los vasos sanguíneos desde donde accede a la circulación sistémica.

1.2.1. Administración tópica

En cuanto a la vía tópica entendida como la aplicación de fármacos directamente sobre la piel con actividad local, sin finalidad de efecto sistémico, se ha investigado el uso de hidrogeles en curación de heridas (explicado en el apartado “Apósitos para heridas”) y para el tratamiento con antibacterianos, antifúngicos, corticoides y antiinflamatorios, principalmente. Por ejemplo, para el tratamiento tópico de infecciones fúngicas se propuso un hidrogel de carbopol con microesponjas (microesferas porosas) conteniendo fluconazol de forma que se evitan los efectos secundarios asociados a la vía oral (ardor, irritación gástrica, úlceras gástricas, etc.) y las interacciones con otros fármacos que a menudo se dan por esa vía.²⁶⁹ Para el tratamiento antibacteriano son numerosos los ejemplos de hidrogeles aplicados tópicamente, principalmente en la curación de heridas. Vila y col.²⁷⁰ propusieron un hidrogel de PVA entrecruzado con glutaraldehído para el tratamiento tópico antibacteriano con nitrofurazona. Este grupo de investigación²⁷¹ también estudió distintos tipos de hidrogeles compuestos por combinaciones de PVA con distintos grados de hidrólisis y dextrano entrecruzados por criogelificación o covalentemente mediante glutaraldehído para el tratamiento con sulfadiazina argéntica. Otra de las propuestas para liberar antimicrobianos fue el uso de liposomas estabilizados en su superficie por nanopartículas de oro carboxiladas integrados en un hidrogel de acrilamida; este sistema polimérico, que demostró no irritar la piel en ratones, mantiene la integridad estructural de los liposomas y permite controlar su velocidad de liberación mediante la variación de la concentración de reticulante.²⁷² Para el tratamiento con corticoides también se puede recurrir al uso de liposomas. Kim y col.²⁷³ estudiaron hidrogeles de carbopol con liposomas de fosfatidilcolina que liberan hidrocortisona; estos hidrogeles, a diferencia de las formulaciones convencionales, obtuvieron una permeabilidad percutánea y unos niveles plasmáticos de fármaco significativamente menores y unas concentraciones en piel mayores y constantes durante 8 horas.

1.2.2. Administración transdérmica

La administración transdérmica consiste en la aplicación sobre la piel de un fármaco que permea a través de las estructuras cutáneas, alcanzando la zona vascularizada y accediendo a la circulación sistémica. Esta vía presenta una serie de

ventajas frente a las vías convencionales:²⁷⁴⁻²⁷⁶ a) evita el efecto de primer paso hepático y la degradación a nivel gastrointestinal, b) es útil cuando la absorción intestinal es errática o incompleta o cuando está dificultada por vómitos o mala deglución, c) permite la obtención de niveles terapéuticos constantes de fármaco en sangre durante un largo período de tiempo, d) gracias a esto se requiere menor frecuencia de dosificación y se evitan los efectos secundarios derivados de las fluctuaciones en las concentraciones plasmáticas de fármacos, lo que permite su uso en principios activos con estrecho margen terapéutico, e) posibilidad de interrumpir fácilmente el tratamiento mediante la retirada del sistema transdérmico, f) existencia de una amplia superficie epidérmica, f) mejora el cumplimiento terapéutico ya que supone mayor comodidad para el paciente.

No obstante, la vía transdérmica presenta inconvenientes que limitan su uso:^{274, 275} a) la piel es una barrera que dificulta la penetración de agentes externos a través del estrato córneo, b) esta vía está limitada a sustancias farmacológicamente potentes, c) el flujo transdérmico es relativamente bajo y la absorción es lenta, d) no se pueden administrar fármacos que irriten la piel o provoquen reacciones alérgicas, e) la distribución de los sistemas enzimáticos endógenos de la piel es variable según la zona del organismo, lo que afecta al metabolismo o biotransformación de los fármacos.

Para la administración de fármacos antiinflamatorios por esta vía se han estudiado distintos tipos de hidrogeles. Por ejemplo, se han desarrollado hidrogeles de goma guar y carbopol para administración transdérmica de diclofenaco sódico.²⁷⁷ Chen y col.²⁷⁸ estudiaron hidrogeles de goma xantana que contienen una microemulsión de etil oleato, propilenglicol y Tween 80; ésta demostró aumentar la solubilidad del ibuprofeno y su permeabilidad a través de la piel; a su vez, el hidrogel aumenta la viscosidad de la microemulsión para mejorar su aplicación en la piel.

Para el tratamiento antihipertensivo con clorhidrato de prazosina, se ensayaron hidrogeles interpenetrados compuestos por alginato sódico y PVA entrecruzados con glutaraldehído, con limoneno y cineol como potenciadores de la penetración, demostrando que proporcionaban una liberación prolongada del fármaco durante 24 horas; además el sistema demostró no causar irritación de la piel en ratas.²⁷⁹

Para tratamiento preventivo de la angina de pecho se puede administrar nitroglicerina por vía transdérmica; con esta finalidad, Sun y col.²⁸⁰ desarrollaron membranas de PHEMA sobre un soporte de poliéster no tejido.

Como se ha comentado, una de las principales limitaciones de esta vía de administración es la baja permeabilidad que ofrece el estrato córneo al paso de agentes externos. Una de las técnicas para aumentar la permeabilidad es la utilización de microagujas (de 25-2000 μm de longitud) que, aplicadas sobre la piel, generan microperforaciones indoloras en la epidermis alcanzando la dermis. Se han desarrollado parches con microagujas basadas en hidrogeles que pueden cargar el fármaco en las agujas, en los parches o en ambos.²⁸¹ Donnelly y col.²⁸² desarrollaron parches con microagujas de hidrogel que una vez introducidas en la piel se hinchan produciendo un conducto continuo para el paso del fármaco desde el parche hasta la microcirculación dérmica, permitiendo una administración transdérmica prolongada. Este sistema demostró ser biocompatible y no irritante *in vitro*, fue bien tolerado por voluntarios sanos y se elimina sin dejar restos en la piel. Además, se realizaron distintos ensayos *in vivo* en ratas para comprobar la efectividad de la administración de distintos compuestos: insulina, metronidazol y albúmina bovina sérica marcada con fluoresceína isotiocianato, y los efectos de la combinación de esta técnica con la iontoforesis.

De hecho, otros métodos para aumentar la permeabilidad de la piel son la iontoforesis y la electroporación, que pueden combinarse con dispositivos de liberación del fármaco basados en hidrogeles. Se han estudiado estas técnicas para la liberación de distintos compuestos como la hormona liberadora de gonadotropina,²⁸³ buprenorfina,²⁸⁴ neostigmina,²⁸⁵ acetato de nonivamida sódica,²⁸⁶ nicotina²⁸⁷ y enoxacina,²⁸⁸ entre otros.

1.3. Administración rectal

La administración de fármacos por vía rectal puede indicarse en el tratamiento local de afecciones asociadas al recto, por ejemplo en el tratamiento de hemorroides, o tener efecto a nivel sistémico ya que una fracción del fármaco absorbido en la parte baja del recto accede directamente a circulación sistémica, evitando en parte el metabolismo de primer paso hepático. La desventaja principal de esta vía es la incomodidad asociada a la administración.

Los supositorios convencionales son sólidos a temperatura ambiente y se deshacen o se reblandecen a la temperatura corporal. El inconveniente de estos supositorios es que los fármacos se liberan de forma incontrolada y pueden migrar hacia el colon, originando una biodisponibilidad variable en ciertos fármacos, especialmente aquellos que sufren una gran eliminación de primer paso hepático.²⁸⁹

Los hidrogeles pueden resolver el problema de los supositorios convencionales, ya que pueden diseñarse para ser bioadhesivos tras su administración rectal. Ryu y col.²⁹⁰ aumentaron la biodisponibilidad del propranolol (fármaco con alto metabolismo de primer paso) añadiendo polímeros mucoadhesivos a unos supositorios que gelificaban por cambio de temperatura. Los polímeros con mejor mucoadhesividad de los ensayados fueron el policarbófilo y el alginato sódico; esta mayor mucoadhesividad implica una menor migración de los supositorios dentro del recto, mejorando por ende la biodisponibilidad del propranolol. Miyazaki y col.²⁹¹ propusieron usar hidrogeles de xiloglucano para administración rectal de indometacina; este polímero tiene una temperatura de transición sol-gel de 22-27°C, por lo que se puede administrar de forma líquida y gelifica dentro del recto. Cabe destacar que en los dos ejemplos descritos, el alginato sódico y el xiloglucano no produjeron irritación de la mucosa tras la administración rectal, aspecto que se debe tener en cuenta ya que algunas formulaciones pueden causar irritación rectal. En este sentido, Watanabe y col.²⁹² prepararon hidrogeles con fibras dietéticas solubles en agua, goma xantana y goma garrofin con la que se obtuvo una reducción de la irritación rectal comparado con los supositorios basados en PEG.

1.4. Administración vaginal

La vía vaginal se usa principalmente para tratamiento y prevención de distintas enfermedades locales, ya que, a pesar de que esta vía posee múltiples ventajas para la administración sistémica, no ha sido muy explorada con este fin debido a la especificidad de género y a las variaciones en el ciclo menstrual (pH, grosor de la pared vaginal, secreciones y actividad enzimática).²⁹³

Una formulación ideal para administración vaginal es aquella que cumple una serie de requisitos, como: facilidad de aplicación, ausencia de reacciones adversas

como irritación de tejidos, distribución uniforme del fármaco en la superficie de la vagina, elevado tiempo de retención del fármaco (incluso cuando la paciente está de pie), compatibilidad con anticonceptivos, mínima interferencia en la actividad sexual y que no manche la piel y la ropa.

Se ha estudiado la aplicación de hidrogeles para el tratamiento y prevención de diversas patologías. Por ejemplo, Almomen y col.²⁹⁴ desarrollaron un hidrogel termosensible mucoadhesivo basado en glicol quitina para la administración de progesterona, que demostró no causar daños en el tejido epitelial ni alterar la flora vaginal y prevenir la progresión de la hiperplasia endometrial simple a la atípica compleja en ratones.

Los hidrogeles también se han investigado en la prevención de enfermedades de transmisión sexual. Recientemente se ha publicado un estudio de un hidrogel que contiene un inhibidor no nucleósido de la transcriptasa inversa (IQP-0528) para reducir el riesgo de infección por VIH durante el coito. El hidrogel, que puede ser aplicado vía vaginal y/o rectal, se ensayó vía vaginal en macacos Rhesus demostrando que esta formulación inhibía la actividad viral del VIH y protegía de la infección a las células mononucleares activadas humanas de sangre periférica cocultivadas *ex vivo* con los tejidos vaginales de los primates tratados.^{295, 296}

Como se ha comentado anteriormente, los hidrogeles se han combinado con otros sistemas tecnológicos para mejorar sus propiedades, como el caso de los liposomas. Estos últimos son sistemas adecuados para liberar fármacos con acción local, pero su consistencia líquida supone un importante problema cuando se aplican por vía tópica o vaginal. Para aumentar su viscosidad, los liposomas se han incorporado en hidrogeles como los de ácido poliacrílico (carbopol) que además poseen capacidad mucoadhesiva. Por ejemplo, se han estudiado hidrogeles de carbopol con liposomas que contienen aciclovir para el tratamiento de herpes genitales.²⁹⁷

1.5. Administración oftálmica

La administración oftálmica supone un reto debido a los mecanismos de protección fisiológicos, como son el drenaje lagrimal, el parpadeo y la baja permeabilidad de la córnea. Los colirios convencionales contienen fármacos que se

eliminan rápidamente del ojo, causando una absorción limitada y baja biodisponibilidad oftálmica, haciendo necesaria una dosificación frecuente para alcanzar niveles terapéuticos. Por tanto, la investigación en este campo se centra en desarrollar sistemas que aumenten el tiempo de residencia ocular de los fármacos. Se han propuesto formulaciones basadas en pomadas y suspensiones que aumentan la retención en el ojo; no obstante, al ser sólidos o semi-sólidos provocan una sensación molesta tras la administración.^{216, 289}

Los hidrogeles son una buena alternativa para administración ocular ya que producen una menor sensación de raspado o arenilla en el ojo; además, sus propiedades elásticas les confieren una mayor resistencia al drenaje lagrimal. Los hidrogeles que gelifican *in situ* son especialmente útiles en este caso ya que son fácilmente dosificables como líquido y permiten aumentar el tiempo de permanencia tras la gelificación. Gupta y col. desarrollaron hidrogeles de quitosán y goma gelano transparentes que aumentan su viscosidad al ser aplicados en el ojo, de forma que prolongan el tiempo de retención y la liberación de esparfloxacino, disminuyendo la absorción sistémica del mismo.²⁹⁸ Para reducir la presión intraocular se han estudiado NHs basados en HA modificado que contienen liposomas cargados con latanoprost; el sistema polimérico ayuda a retardar de 2 a 3 veces la liberación del fármaco comparado con los liposomas sin hidrogel.²⁹⁹

Otra estrategia para aumentar el tiempo de retención del hidrogel es formar un depósito. Por ejemplo, Fedorchak y col³⁰⁰ han desarrollado un hidrogel (poli N-isopropilacrilamida-PEG) que contiene micropartículas de PLGA con tartrato de brimonidina. Este sistema se administra en gotas que forman en la parte inferior del ojo un gel opaco y estable, el cual permite la liberación del fármaco durante un mes. Esta formulación, ensayada en conejos, ha demostrado no ser irritante y reducir significativamente la absorción sistémica del fármaco frente a los colirios convencionales que se aplican diariamente.

Existen distintas formulaciones oftálmicas basadas en hidrogeles en el mercado, las más comunes incluyen hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, PVA, carbopol, polivinilpirrolidona, PEG, dextrano o HA. Por ejemplo, el Tiacil® es un colirio de hidroxipropilmetilcelulosa con gentamicina y dexametasona para el tratamiento de infecciones oculares en veterinaria.³⁰¹

1.6. Administración ótica

La administración de fármacos por esta vía se realiza mediante la aplicación de gotas óticas, cuyo principal problema es su tiempo de retención en el lugar de acción. Lee y col.³⁰² desarrollaron un hidrogel de gelatina que libera un factor de crecimiento insulínico tipo I recombinante humano (rhIGF-1) para reducir los daños funcionales e histológicos de la pérdida de audición inducida por ruido.

TriLogic Pharma, LLC. patentaron un hidrogel de poloxámero y goma xantana que gelifica *in situ* a temperatura corporal cuando se administra en una cavidad corporal y que forma una barrera que evita la entrada de patógenos.³⁰³ Este hidrogel, llamado TRI-726, cargado con ketoconazol y acetato de hidrocortisona demostró efectividad en el tratamiento de infección ótica por *Malassezia* en perros.³⁰⁴ Actualmente se comercializa con el nombre de KETOCORT® OTIC para el tratamiento de la otitis externa aguda y crónica en perros y gatos.³⁰⁵

1.7. Administración nasal

La administración de hidrogeles por la cavidad nasal puede tener como diana terapéutica los pulmones, el cerebro, la propia cavidad nasal o efecto a nivel sistémico.

Por ejemplo, se desarrollaron microgeles basados en quitosán modificados con Pluronic® F-108 y PEG, inhalables cuando están secos y que evitan ser captados por los macrófagos debido a su gran aumento de tamaño al hincharse en contacto con los pulmones. Estos microgeles se degradan enzimáticamente (90% degradado a los 10 días) y han demostrado *in vitro* una liberación sostenida del fármaco durante 20 días.³⁰⁶

Para el tratamiento de la diabetes tipo 2 por vía inhalatoria, Lee y col.³⁰⁷ desarrollaron NHs autoensamblados de glicol quitosán modificado con ácido deoxicólico cargados con exenadina-4 modificada que administraron a ratones diabéticos tipo 2, observando que se depositan en los pulmones produciendo efecto hipoglucémico durante 2 días.

Chen y col.³⁰⁸ estudiaron hidrogeles termosensibles gelificables *in situ* de Pluronic® F-127 y F-68, que retardaban el transporte mucociliar aumentando el tiempo de residencia en la cavidad nasal de ratas Sprague-Dawley. Este hidrogel intranasal demostró aumentar la distribución de curcumina a cerebro, cerebelo, hipocampo y bulbo olfatorio, comparado con la administración intravenosa de una solución de curcumina.

Nochi y col.³⁰⁹ y Kong y col.³¹⁰ propusieron NHs catiónicos (pululano-colesterol) para la vacunación con proteínas antigénicas: neurotoxina tipo A de *Clostridium Botulinum* (Nochi) y proteína de superficie A de *Streptococcus pneumoniae* (Kong), que inducen respuesta inmune antígeno-anticuerpo en enfermedades infecciosas en ratones. Ambos grupos demostraron que este tratamiento no afectaba a los bulbos olfatorios ni al sistema nervioso central.

1.8. Administración parenteral

1.8.1. Administración subcutánea

Como se ha descrito en el apartado II, los hidrogeles presentan una serie de propiedades que los hacen óptimos para la administración subcutánea, como la biocompatibilidad, irritación mínima de tejidos, baja adsorción a proteínas, etc.^{289, 311}

ReGel® (MacroMed, Inc.) es un sistema de liberación basado en un hidrogel biodegradable termosensible e inyectable, apto para liberación local y sistémica, que solubiliza y estabiliza fármacos de baja solubilidad y proteínas. Este sistema puede inyectarse subcutáneamente, permitiendo una liberación controlada de fármacos de 1 a 6 semanas. Basándose en dicho sistema, desarrollaron OncoGel® (ReGel® con paclitaxel) (Diatos S.A., MacroMed, Inc.) que puede inyectarse directamente en tumor para el tratamiento de tumores sólidos y está siendo estudiado en distintos tipos de tumores y en ensayos clínicos en cáncer de esófago.³¹²⁻³¹⁸

La farmacéutica Endo (Endo Pharmaceuticals Solutions Inc.) comercializa Supprelin® LA³¹⁹ y Vantas®,³²⁰ implantes subcutáneos compuestos por un hidrogel que actúa como reservorio de acetato de histrelina, agonista de la hormona

liberadora de gonadotropina, que produce la inhibición de la secreción de la hormona luteinizante y la disminución de la concentración de testosterona sérica. Se trata de un dispositivo no biodegradable que libera fármaco durante un año y está indicado como paliativo en el cáncer de próstata avanzado (Vantas[®]) y en el tratamiento de la pubertad precoz central (Supprelin[®] LA).

Uno de los problemas de los implantes subcutáneos es la reacción de cuerpo extraño que forma una cápsula de colágeno denso alrededor del implante, aislándolo del cuerpo. Zhang y col.³²¹ desarrollaron hidrogeles zwitteriónicos que resisten la formación de la cápsula al menos tres meses tras su implantación en ratones y que promueven la angiogénesis en los tejidos circundantes, por lo que pueden utilizarse como implantes subcutáneos en multitud de indicaciones.

1.8.2. Administración intramuscular

En la literatura se describen ejemplos de hidrogeles diseñados para ejercer su efecto cuando se administran por vía intramuscular. Por ejemplo, Sacchi y col.³²² desarrollaron un hidrogel de fibrina enlazado covalentemente a un factor de crecimiento endotelial vascular recombinante que se libera por escisión enzimática del enlace; este sistema inyectado intramuscularmente demostró mejorar la angiogénesis, la perfusión tisular y la curación en ratones con isquemia de los miembros inferiores y en heridas isquémicas.

Otros ejemplos de hidrogeles intramusculares son los hidrogeles termosensibles de poloxámero gelificables *in situ* tras inyección intramuscular, ensayados en ratas para la liberación de macromoléculas hidrófilas (PEG de distintos pesos moleculares)³²³ y en conejos para liberación sostenida de piroxicam, obteniendo concentraciones plasmáticas de fármaco durante 4 días.³²⁴

1.8.3. Administración intravenosa

Los hidrogeles a micro y nano escala han demostrado ser útiles como sistemas de liberación de agentes terapéuticos en distintas enfermedades debido a sus propiedades. Como ya se ha explicado, la porosidad de los NHs permite cargar fármacos, evitar una liberación temprana de éstos, y protegerlos frente a la degradación ambiental. Además, los NHs pueden cambiar ligeramente de forma,

de esfera a elipse asemejándose a los eritrocitos, de forma que aumentan el tiempo de circulación en sangre y pueden pasar por microcapilares, o alargándose cuando la velocidad de cizalla es alta, lo que reduce la viscosidad aparente de la sangre.⁷⁷

Una de las aplicaciones más estudiadas y prometedoras de los hidrogeles intravenosos es la terapia antitumoral. En el tratamiento antitumoral, los NHs pueden acumularse en el tumor de forma activa o pasiva: modificando la superficie para que se dirija específicamente a tumores o aprovechando el efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR), respectivamente (figura 1.V.3).

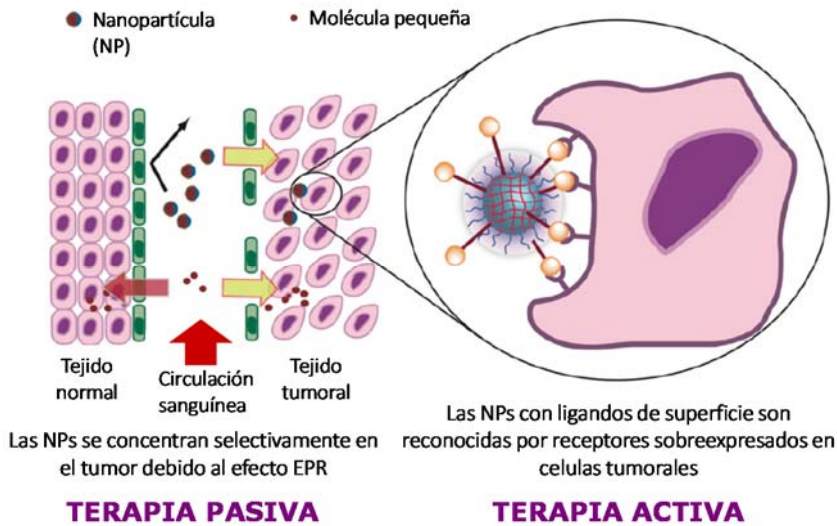


Figura 1.V.3. Concepto de terapia pasiva y activa en el tratamiento antitumoral. Modificado de Chacko R.T.³²⁵

En la terapia antitumoral activa, los NHs tienen ciertas características que los dirigen al tumor. Por ejemplo, Lu y col.³²⁶ investigaron NHs híbridos de poliacrilamida con nanopartículas de oro, funcionalizados con metotrexato (MTX) o ácido fólico. El ácido fólico y el MTX actúan como ligandos de superficie para la dirigirlos a la diana terapéutica, y el MTX y el oro como agentes antitumorales. Los ensayos *in vitro* demostraron alta eficacia antitumoral en células KB, capacidad de impedir la recuperación de las células cancerosas y de prolongar el tiempo de

circulación de los NHs (debido a que su hidrofilia y pequeño tamaño reducen su captación por los macrófagos).

El glioblastoma es uno de los tumores cerebrales más frecuentes y agresivos; Baklaushev y col.³²⁷ desarrollaron NHs conjugados con anticuerpos monoclonales de Cx43 (proteína de membrana) y BSAT1 (transportador aniónico específico de cerebro) para el tratamiento con cisplatino. Los ensayos en ratas con gliomas intracraneales mostraron una reducción significativa del volumen del tumor y una supervivencia media de 27 días más que el grupo control.

Respecto a la terapia antitumoral pasiva, los NHs llegan al tumor por el efecto EPR. Cuando la masa tumoral es de 2-3 mm, comienza la inducción de la angiogénesis para satisfacer la mayor demanda de oxígeno y nutrientes para su crecimiento. Esta neovasculatura difiere ampliamente de la de un tejido sano: los vasos son irregulares, con poros y fenestraciones, la luz es más ancha y el drenaje linfático deficiente. Todo ello supone una mayor permeabilidad a los componentes plasmáticos y su retención en el tumor por un retorno venoso y aclaramiento linfático insuficientes, conocido como efecto EPR.³²⁸

En la terapia antitumoral pasiva, la difusión de los NHs se limita a la región periférica ya que no puede penetrar en el espacio intersticial profundo del tumor. Para mejorar la penetración del fármaco en tumores heterogéneos, Yim y col.³²⁹ idearon un complejo sistema basado en NHs catiónicos degradables cargados con paclitaxel, formados por polietilenimina y pululano acetilado y recubiertos por HA. El HA (aniónico) mantiene la estabilidad de los NHs en la circulación sanguínea y los dirige a la zona tumoral; una vez allí, el exceso de hialuronidasas expresadas en el tumor lo degradan, permitiendo actuar las cargas catiónicas de la superficie de los NHs, las cuales alteran las membranas celulares y producen necrosis. Esto facilita la penetración de los NHs en la masa tumoral profunda, liberando el paclitaxel, que produce apoptosis celular.

Una de las estrategias para aumentar el tiempo de circulación sanguínea, y con ello asegurar la extravasación y la acumulación pasiva en tejidos tumorales, es la reducción de la opsonización de los NHs por las células del sistema retículo endotelial mediante la pegilación. Esta técnica, en la que se funcionaliza la superficie de los NHs con PEG, permite también reducir la agregación de los

mismos y aumentar su estabilidad.^{330, 331} Por ejemplo, Yadav y col.³³² estudiaron nanopartículas de PLGA pegiladas que contienen citarabina, demostrando mediante ensayos de biodistribución un aumento de las concentraciones de fármaco en sangre, cerebro y huesos, evitando la captación por el sistema retículo-endotelial.

Otra aproximación terapéutica aprovechando las características de los hidrogeles es la respuesta a los cambios de pH, ya el tejido tumoral tiene un microambiente extracelular ligeramente ácido. Por ejemplo, se han diseñado NHs IPN de quitosán y PEG que cambian la carga de su superficie de neutra a positiva en el ambiente cercano al tumor (pH 6.0-6.2), lo que facilita la internalización celular; en los compartimentos celulares el pH es más ácido (pH 5), lo que facilita la liberación del fármaco encapsulado, 5-fluorouracilo.³³³

En el caso de la quimioterapia cerebral, el principal problema es la baja biodisponibilidad de los fármacos en este órgano debido a la baja permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Para mejorar el paso de los fármacos a través de dicha barrera, se han investigado distintas opciones; por ejemplo, NHs de quitosán y tripolifosfato sódico funcionalizados en su superficie con Tween 80 para el tratamiento con MTX.³³⁴

2. Ingeniería tisular

La ingeniería tisular consiste en la mejora o sustitución de tejidos u órganos específicos utilizando materiales de ingeniería y estrategias sintéticas. Los hidrogeles son materiales interesantes en este campo debido a sus características de biocompatibilidad, porosidad, consistencia blanda, alto contenido en agua y capacidad de respuesta ante cambios en las condiciones ambientales, tales como el pH, la temperatura, enzimas y campos eléctricos.³³⁵ Estos sistemas poliméricos se pueden aplicar como implantes médicos para rellenar espacios, como vehículos para la liberación de sustancias bioactivas o como estructuras tridimensionales que organizan células y estímulos.

La biocompatibilidad se considera una propiedad indispensable para cualquier material aplicado; cumpliendo dicha característica, se han desarrollado hidrogeles con polímeros tanto naturales como sintéticos. Entre los polímeros naturales

usados se encuentran la agarosa, alginato, quitosán, colágeno, fibrina, gelatina y HA; y entre los sintéticos, el óxido de polietileno, PVA, ácido poliacrílico, poli(fumarato de propileno-co-etilenglicol) y polipéptidos sintéticos.³

Una de las aplicaciones más estudiadas en este campo es el andamiaje celular. A este respecto, la encapsulación de células en hidrogeles biodegradables permite su uso en ingeniería tisular debido a su facilidad de manejo, a su estado altamente hidratado que se asemeja al ambiente tisular y que permite el crecimiento de células y tejidos, y a la capacidad de formarse y degradarse en el interior del organismo. Existen dos estrategias para integrar las células en el soporte: a) sembrar las células sobre el material poroso ya formado o b) encapsular las células durante la formación del sistema de andamiaje celular. Para la primera opción pueden utilizarse mayor variedad de solventes y reactivos siempre que el producto final sea citocompatible; en cambio, si la encapsulación celular es simultánea a la formación del hidrogel, el proceso de formación debe darse en condiciones suaves y que permitan la viabilidad celular, lo que limita el número de materiales adecuados para tal fin. Cabe destacar también que los productos derivados de la degradación del hidrogel no deben afectar a las células encapsuladas.³³⁶

La regeneración tisular mediada por la implantación de células encapsuladas en un andamiaje adecuado supone que, tras la formación del hidrogel, su estructura porosa debe permitir la difusión de las nuevas moléculas que formarán parte de la matriz extracelular. Por este motivo, la degradación del hidrogel y la síntesis de esta matriz deben producirse coordinadamente para permitir el desarrollo del tejido macroscópico.

La facultad de controlar la estructura del hidrogel permite modificar las características relevantes en el diseño del andamiaje como el hinchamiento, las propiedades mecánicas, la difusión y la degradación. Estas propiedades están estrechamente relacionadas con el grado de reticulación del polímero, ya que cuanto mayor es la densidad de entrecruzamiento mayor es la fuerza mecánica y menor es el hinchamiento y el tamaño de poro. Este último parámetro es la medida de la distancia entre puntos de entrecruzamiento y es determinante en las propiedades difusivas del hidrogel y la capacidad de retención de células. El tamaño de poro es, generalmente, menor que las dimensiones celulares por lo que permite la encapsulación y retención de las células. Asimismo, controla la difusión

de los nutrientes y otras moléculas de señalización biológica (por ejemplo, factores de crecimiento) entre el medio ambiente y las células, y controla la difusión hacia el exterior de moléculas específicas secretadas por las células. De hecho, varios estudios han demostrado que la estructura del hidrogel influye determinantemente en la distribución de las moléculas de la matriz extracelular sintetizadas durante la regeneración tisular y, por tanto, en el desarrollo tridimensional macroscópico del tejido.^{337, 338}

Se han encapsulado distintos tipos de células en hidrogeles biodegradables para una amplia variedad de aplicaciones en este campo, siendo las más comunes la ingeniería tisular de cartílago y hueso. Entre los distintos tipos de células encapsuladas se encuentran condrocitos, osteoblastos, cardiomiocitos, hepatocitos, fibroblastos, células estromales de la médula ósea, células endoteliales y células embrionarias, entre otras. Para tal fin se han utilizado estrategias de entrecruzamiento covalente o físico para distintos polímeros como quitosán,³³⁹ alginato-co-gelatina,³⁴⁰ HA,³⁴¹ sulfato de condroitina,³⁴² análogos sintéticos de la matriz extracelular,^{343, 344} fibrinógeno pegilado,³⁴⁵ polipéptidos tipo elastina^{346, 347} y copolímeros basados en PEG,³⁴⁸ entre otros.

A parte del andamiaje celular, los hidrogeles se han utilizado en multitud de aplicaciones dentro del campo de la ingeniería tisular, como: membranas de biosensores,³⁴⁹ prótesis de músculos u órganos,³⁵⁰⁻³⁵² prótesis mamarias^{353, 354} (aunque su uso se ha restringido debido a complicaciones derivadas su rotura),^{355, 356} en piel artificial,³⁵⁷ pinzas robóticas,³⁵⁸ estabilización de implantes óseos y promoción de la neoformación ósea,³⁵⁹ en la superficie interna de las arterias lesionadas para reducir la trombosis y el engrosamiento de la íntima,³⁶⁰ en catéteres para aumentar su hemocompatibilidad y reducir la colonización bacteriana,³⁶¹ como músculos artificiales capaces de convertir los estímulos electroquímicos en mecánica de trabajo (contracción y relajación reversibles),³⁶² etcétera. Todas estas aplicaciones, desarrolladas en mayor o menor medida en la actualidad, son un claro ejemplo del potencial uso de los hidrogeles en este campo de la ciencia.

3. Apósitos para heridas

Las heridas se definen como una alteración física en la integridad estructural, morfológica y anatómica del tejido cutáneo, resultado de un trauma o de condiciones médicas o fisiológicas.³⁵ Las heridas se pueden clasificar, en función del número de capas de la piel y en el área de la piel afectada, como superficiales (si sólo la epidermis está involucrada), de espesor parcial (si la epidermis y las capas dérmicas más profundas se ven afectadas) y de espesor total (cuando la grasa subcutánea y el tejido más profundo se ha dañado).³⁶³

En el proceso de cicatrización de heridas se distinguen tres fases: inflamatoria, proliferativa y de remodelación. Cuando se produce una lesión en la piel, la vasodilatación y el sangrado provocan el arrastre de potenciales patógenos y tejido dañado, la llegada de células del sistema inmune, la agregación plaquetaria y la formación de coágulos. La fase inflamatoria se inicia por la acción de las células inflamatorias estimuladas por las plaquetas y las células parenquimales muertas; a las 6-24 horas tras el daño, los neutrófilos fagocitan patógenos y tejido dañado no eliminados por el sangrado inicial; tras 48-96 horas los macrófagos migran a la zona afectada realizando fagocitosis y secretando factores de crecimiento y citoquinas, cuya función es esencial en el proceso global de cicatrización. Solapada con el final de la fase inflamatoria, se inicia la fase proliferativa, caracterizada por la angiogénesis y la migración de fibroblastos que producen colágeno tipo I y III, constituyendo una matriz extracelular provisional junto con fibronectina y HA (tejido de granulación). Esta matriz permite a los miofibroblastos realizar la contracción de la herida permitiendo reducir su tamaño y aproximar los bordes, mientras las células epiteliales se desplazan sobre la herida, cubriéndola. Finalmente, en la fase de remodelación se produce la formación de una costra debido a que la síntesis de colágeno excede la degradación del mismo; las metaloproteinasas de la matriz, como las colagenasas, degradan el colágeno y marcan el fin de la formación de la costra.³⁵

La cicatrización de heridas puede ser obstaculizada por varios factores tales como desecación, infección o presencia bacteriana anormal, maceración, necrosis, presión, trauma y edema.³ Se ha demostrado que la curación de la herida es más efectiva cuando se aplican apósitos que la mantienen húmeda, ya que la humedad proporciona una baja tensión de oxígeno que facilita la cicatrización (el crecimiento

óptimo de los queratinocitos se da a bajas presiones de oxígeno).³⁶⁴ Además, la humedad permite la disolución de agentes antimicrobianos y factores de crecimiento que evitan la infección y mejorar la cicatrización, respectivamente.³⁶⁵ Los apósitos deben ser biocompatibles, sin ocasionar reacciones alérgicas o inmunitarias y tener una mínima adhesión a la herida, ya que los apósitos “secos” como las gasas convencionales, se quedan integrados durante la formación de la costra con el consiguiente daño en la epidermis recién formada al retirarlos.

En resumen, un apósito “ideal” debe absorber el exceso de exudado y toxinas, mantener una buena humedad entre la herida y el apósito, preservar la herida de fuentes externas de infección, prevenir el exceso de calor, tener una adecuada permeabilidad a los gases, ser suministrado completamente estéril y ser fácil de quitar sin causar mayor traumatismo en la herida.³⁶⁶

Los hidrogeles pueden absorber y retener el exudado contaminado en su interior a través de la expansión de cadenas de polímero reticulado favoreciendo el aislamiento de bacterias, detritos y moléculas de olor en el líquido. Su alto contenido de agua permite mantener la humedad en la herida, favoreciendo la transmisión de vapor y el oxígeno necesario a las heridas y el desbridamiento autolítico (que facilita la eliminación del tejido muerto).

Se han comercializado varios hidrogeles para el tratamiento de heridas, Granugel^{®367} (ConvaTec) formado por pectina, CMC y propilenglicol, Intrasite Gel^{®368} (Smith & Nephew) compuesto por CMC modificada y propilenglicol, Purilon Gel^{®369} (Coloplast) de CMC sódica, etc.

También se puede combinar la acción de los hidrogeles con otros materiales; por ejemplo, Shah y col.³⁷⁰ propusieron un material combinado de gasa de algodón u otro tipo de fibra, impregnado con hidrogeles termoplásticos (combinación de polímeros hidrófilos e hidrófobos). De esta forma los hidrogeles absorben el exudado y se hinchan, dando una consistencia viscosa al apósito y evitando que quede pegado a la herida y produzca daños al retirarlo.

Para evitar la infección de las heridas, una estrategia es desarrollar apósitos que contengan agentes antimicrobianos. Así, se han propuesto apósitos basados en NHs de PVA que contienen *clusters* de plata (con actividad antibacteriana frente

a Gram positivos y Gram negativos), usando como soporte para el apósito un tejido de algodón. Dichos apósitos demostraron acelerar el proceso de cicatrización y minimizar la formación de cicatrices en ratones con heridas en la piel de espesor total.³⁷¹

El quitosán es un polímero natural ampliamente estudiado en cicatrización de heridas por incisión o por quemadura, sólo o como constituyente de hidrogeles, que ha demostrado mejorar el proceso de cicatrización interviniendo en todas sus fases. La información sobre este tema es ingente, destacando las siguientes características: estimula moderadamente la respuesta inmune para el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos, lo que favorece la eliminación de cuerpos extraños y patógenos y la producción de citoquinas;³⁵ el carboximetil quitosán promueve la proliferación de fibroblastos de piel normal e inhibe la proliferación de fibroblastos de queloides.³⁷² El quitosán con alto grado de desacetilación estimula la mitogénesis de queratinocitos y la proliferación de fibroblastos en presencia de factores de crecimiento séricos (se cree que el quitosán potencia la acción o estimula la liberación de estos factores de crecimiento).³⁷³ Además, el quitosán con alto grado de desacetilación reduce la formación de cicatrices debido a la inhibición de la contracción de las estructuras de colágeno secretado por los fibroblastos, desnaturalización del colágeno y formación de complejos policatiónico-polianiónico con dicha proteína.^{374, 375}

A continuación se comentan algunos ejemplos de hidrogeles de quitosán estudiados para la cicatrización de heridas. Hidrogeles de quitosán con nanopartículas de óxido de zinc demostraron mejorar la cicatrización, el depósito de colágeno y acelerar la reepitelización en ratas Sprague–Dawley con heridas de espesor parcial.³⁷⁶ Hidrogeles de dextrano oxidado y N-carboxietil-quitosán gelificables *in situ* a temperatura y pH fisiológicos en los que se encapsuló fibroblastos de ratón con una supervivencia celular del 95% a los 3 días; éstos hidrogeles (sin células) se ensayaron en ratones BALB/cJ con heridas de espesor total demostrando que aceleraban el proceso de cicatrización.³⁷⁷ Hidrogeles de carboximetil quitosán y gelatina ensayados en ratas Sprague–Dawley con heridas de espesor total, demostraron que favorecen la proliferación celular, la neovascularización, la formación de un tejido de granulación más grueso y la aceleración del cierre de la herida.³⁷⁸ Hidrogeles de quitosán sometido a

tratamiento térmico por autoclave que han demostrado *in vitro* aumentar la proliferación y la migración de fibroblastos de prepucio fetal humano e *in vivo* acelerar la cicatrización de úlceras por presión en ratones C57BL/6NHsd, justificado por la reducción de marcadores inflamatorios y aumento de parámetros de reepitelización.³⁷⁹

4. Lentes de contacto

Las lentes de contacto se pueden dividir en “duras” o “blandas” según su composición. Las lentes “blandas” están compuestas de hidrogeles o de elastómeros basados en silicona.³⁸⁰ Como ya se ha comentado, en 1960, Wichterle y Lim² fueron los primeros en describir el uso de un hidrogel basado en PHEMA como un material sintético biocompatible para lentes de contacto. Para que los hidrogeles puedan usarse como lentes de contacto deben cumplir una serie de requisitos: biocompatibilidad, transmitancia luminosa mínima del 95%, índice refractivo entre 1.372-1.381, suficiente permeabilidad al oxígeno y al agua, humectabilidad, estabilidad y ciertas propiedades mecánicas como elasticidad.³

Las lentes de contacto pueden aplicarse para corregir problemas de visión, como sistemas de liberación de fármacos^{381, 382} y estéticamente para modificar aparentemente el color del iris. Asimismo, se pueden añadir agentes antimicrobianos a las lentes de contacto durante su formación para hacerlas más resistentes a la colonización bacteriana.³

Respecto a la modificación del color del iris, se han patentado distintos métodos para desarrollar lentes de contacto para estética. Wichterle³⁸³ propuso incorporar el agente coloreado entre dos láminas transparentes de hidrogel unidas por polimerización de una mezcla de monómeros hidrófilos. Neefe³⁸⁴ patentó otro método en el que se usan pequeñas partículas que provocan la refracción de la luz embebidas en el interior de una matriz de hidrogel transparente. La ventaja de este tipo de lentes es que gracias a la refracción de la luz, permiten dar la imagen de ojos claros a los ojos oscuros, a diferencia de lo que ocurre con las lentes teñidas de colores claros, que no consiguen cubrir el color oscuro del iris. Estas lentes pueden corregir los defectos visuales a la vez que modifican aparentemente el color del iris.

Uno de los problemas de las lentes de contacto blandas en general es la baja permeabilidad a los gases, lo que provoca privación de oxígeno en la córnea. En los hidrogeles convencionales, la permeabilidad al oxígeno depende principalmente del grado de hinchamiento en equilibrio ya que el oxígeno tiene mayor capacidad para difundir a través del agua que a través del hidrogel. Actualmente, las lentes de hidrogel de silicona son las más prevalentes en el mercado ya que poseen alta permeabilidad de oxígeno y proporcionan un ajuste mejor y más cómodo.³ Bauman y col.³⁸⁵ han desarrollado un método de fabricación de lentes de contacto de hidrogel de silicona con una superficie nanotexturizada que imita la superficie de la córnea humana para mejorar la comodidad en su uso.

5. Productos de higiene

En la década de 1980, se empezaron a desarrollar industrialmente polímeros superabsorbentes (PSA) en la agricultura y en la industria del pañal. Los PSA son hidrogeles ligeramente entrecruzados que pueden absorber cantidades significativas de medios acuosos (hasta 2000 g/g). En sus inicios, empezaron a producirse en Japón y EE.UU. para actuar como absorbentes en compresas femeninas, cuya composición representativa era almidón y poliacrilato entrecruzados.^{386, 387} Se descubrió que este tipo de compuestos podían reemplazar a los materiales esponjosos que se venían usando hasta el momento en productos de higiene, y su uso en pañales y compresas se consideró costo-efectivo. En la actualidad, los hidrogeles superabsorbentes, principalmente los basados en ácido acrílico y acrilamida, se usan extensamente en productos de higiene para absorber fluidos, ya que permiten mantener la piel sin humedades, promoviendo la salud de la piel y previniendo la dermatitis del pañal y la colonización bacteriana.³⁸⁸ Teniendo en cuenta la cantidad de pañales (tanto de niños como de adultos), compresas y empapadores que se consumen, es importante considerar el impacto medioambiental de estos productos desechables. En este aspecto, se han propuesto hidrogeles basados en celulosa³⁸⁸ o almidón³⁸⁹ totalmente biodegradables. Por ejemplo, hidrogeles de CMC sódica e hidroxietilcelulosa entrecruzada con divinil sulfona, cuya capacidad de retención de agua, estudiada en ensayos de centrifugación, aumenta con el aumento de la porosidad que, a su vez, se modifica según el proceso de desecación. La mejora en la absorción y

retención de agua se debe en parte a un efecto de capilaridad entre las estructuras microporosas de la red.³⁹⁰

Pampers (Procter & Gamble) y Huggies (Kimberly-Clark), las dos marcas de pañales desechables más utilizados mundialmente, han centrado sus esfuerzos en la mejora de la producción y la ingeniería de los PSA con propiedades mejoradas: mayor absorción bajo carga (medida de la capacidad de un PSA para absorber fluido bajo una presión aplicada) y niveles menores de monómeros residuales y fracciones solubles.³

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Buwalda S.J., Boere K.W.M., Dijkstra P.J., Feijen J., Vermonden T., Hennink W.E. Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials. *J. Controlled Release* 2014; 190: 254-273.
2. Wichterle O., Lim D. Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature* 1960; 185 (4706): 117-118.
3. Caló E., Khutoryanskiy V.V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *Eur. Polym. J.* 2015; 65: 252-267.
4. World Hydrogel Market - Opportunities and Forecasts, 2015 - 2022. 2016:135.
5. Beltrán M., Marcilla A. Estructura y propiedades de los polímeros. En: *Tecnología de polímeros*. Universidad de Alicante, 2012:276.
6. Escalona Rayo O., Quintanar Guerrero D. Nanogeles poliméricos: una nueva alternativa para la administración de fármacos. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* 2014; 45: 17-38.

7. Lin C.C., Metters A.T. Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2006; 58 (12-13): 1379-1408.
8. Goycoolea F., Remuñán M., Alonso M.J. Nanosistemas a base de polisacáridos: Quitosano. En: *Nanotecnología Farmacéutica, Realidades y Posibilidades Farmacoterapéuticas*. Instituto de España, Real Academia Nacional de Farmacia, Monografía XXVIII, 2009.
9. Coviello T., Matricardi P., Marianecchi C., Alhaique F. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *J. Control Release* 2007; 119 (1): 5-24.
10. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* 2006; 31 (7): 603-632.
11. Okuyama K., Noguchi K., Kanenari M., Egawa T., Osawa K., Ogawa K. Structural diversity of chitosan and its complexes. *Carbohydr. Polym.* 2000; 41 (3): 237-247.
12. Bhattarai N., Gunn J., Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010; 62 (1): 83-99.
13. Acosta N., Jiménez C., Borau V., Heras A. Extraction and characterization of chitin from crustaceans. *Biomass Bioenergy* 1993; 5 (2): 145-153.
14. Fukuda H. Polyelectrolyte Complexes of Chitosan with Sodium Carboxymethylcellulose. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1980; 53 (4): 837-840.
15. Hirano S., Seino H., Akiyama Y., Nonaka I. Chitosan: A Biocompatible Material for Oral and Intravenous Administrations. En: *Progress in Biomedical Polymers*. Boston, MA. Springer US, 1990:283-290.
16. Nordtveit R.J., Vårum K.M., Smidsrød O. Degradation of partially N-acetylated chitosans with hen egg white and human lysozyme. *Carbohydr. Polym.* 1996; 29 (2): 163-167.
17. Aiba S.-i. Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosans. *Int. J. Biol. Macromol.* 1992; 14 (4): 225-228.
18. Pangburn S.H., Trescony P.V., Heller J. Lysozyme degradation of partially deacetylated chitin, its films and hydrogels. *Biomaterials* 1982; 3 (2): 105-108.
19. Roncal T., Oviedo A., Lopez de Armentia I., Fernandez L., Villaran M.C. High yield production of monomer-free chitosan oligosaccharides by pepsin catalyzed hydrolysis of a high deacetylation degree chitosan. *Carbohydr. Res.* 2007; 342 (18): 2750-2756.

20. VandeVord P.J., Matthew H.W., DeSilva S.P., Mayton L., Wu B., Wooley P.H. Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002; 59 (3): 585-590.
21. Xu J., McCarthy S.P., Gross R.A., Kaplan D.L. Chitosan Film Acylation and Effects on Biodegradability. *Macromolecules* 1996; 29 (10): 3436-3440.
22. Kean T., Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010; 62 (1): 3-11.
23. Chatelet C., Damour O., Domard A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials* 2001; 22 (3): 261-268.
24. Sogias I.A., Williams A.C., Khutoryanskiy V.V. Why is chitosan mucoadhesive? *Biomacromolecules* 2008; 9 (7): 1837-1842.
25. Okamoto Y., Yano R., Miyatake K., Tomohiro I., Shigemasa Y., Minami S. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. *Carbohydr. Polym.* 2003; 53 (3): 337-342.
26. Diegelmann R.F., Dunn J.D., Lindblad W.J., Cohen I.K. Analysis of the effects of chitosan on inflammation, angiogenesis, fibroplasia, and collagen deposition in polyvinyl alcohol sponge implants in rat wounds. *Wound Repair Regen.* 1996; 4 (1): 48-52.
27. Chung Y.-C., Wang H.-L., Chen Y.-M., Li S.-L. Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens. *Bioresour. Technol.* 2003; 88 (3): 179-184.
28. Goy R.C., Britto D.d., Assis O.B.G. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros* 2009; 19: 241-247.
29. Park Y., Kim M.H., Park S.C., Cheong H., Jang M.K., Nah J.W., et al. Investigation of the antifungal activity and mechanism of action of LMWS-chitosan. *J Microbiol Biotechnol* 2008; 18 (10): 1729-1734.
30. Zaharoff D.A., Rogers C.J., Hance K.W., Schlom J., Greiner J.W. Chitosan solution enhances the immunoadjuvant properties of GM-CSF. *Vaccine* 2007; 25 (52): 8673-8686.
31. Porporatto C., Bianco I.D., Correa S.G. Local and systemic activity of the polysaccharide chitosan at lymphoid tissues after oral administration. *J. Leukoc. Biol.* 2005; 78 (1): 62-69.
32. Jan S.S., Liu D.C., Dong X.Y., Hu Y.M., Chen J.D. Effects of chitosan and its derivative added to water on immunological enhancement and disease control. *Immunotherapy* 2012; 4 (7): 697-701.

33. Qi L., Xu Z. In vivo antitumor activity of chitosan nanoparticles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006; 16 (16): 4243-4245.
34. Pan H., Yang Q., Huang G., Ding C., Cao P., Huang L., et al. Hypolipidemic effects of chitosan and its derivatives in hyperlipidemic rats induced by a high-fat diet. *2016* 2016; 60.
35. St. Denis T.G., Dai T., Huang Y.-Y., Hamblin M.R. Wound-Healing Properties of Chitosan and Its Use in Wound Dressing Biopharmaceuticals. En: *Chitosan-Based Systems for Biopharmaceuticals*. John Wiley & Sons, Ltd, 2012:429-450.
36. Thanou M., Verhoef J.C., Junginger H.E. Chitosan and its derivatives as intestinal absorption enhancers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 50, Supplement 1: S91-S101.
37. Smith J., Wood E., Dornish M. Effect of chitosan on epithelial cell tight junctions. *Pharm. Res.* 2004; 21 (1): 43-49.
38. Okamoto Y., Kawakami K., Miyatake K., Morimoto M., Shigemasa Y., Minami S. Analgesic effects of chitin and chitosan. *Carbohydr. Polym.* 2002; 49 (3): 249-252.
39. Sarmiento B., das Neves J. *Chitosan-Based Systems for Biopharmaceuticals: Delivery, Targeting and Polymer Therapeutics*. Wiley, 2012.
40. Ilium L. Chitosan and Its Use as a Pharmaceutical Excipient. *Pharm. Res.* 1998; 15 (9): 1326-1331.
41. Wedmore I., McManus J.G., Pusateri A.E., Holcomb J.B. A special report on the chitosan-based hemostatic dressing: experience in current combat operations. *J. Trauma* 2006; 60 (3): 655-658.
42. Farmacopea Europea. Consejo de Europa, 4ªEd. . 2002.
43. Aranaz I., Harris R., Heras A. Chitosan Amphiphilic Derivatives. Chemistry and Applications. *Curr. Org. Chem.* 2010; 14 (3): 308-330.
44. Fraser J.R., Laurent T.C., Laurent U.B. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J. Intern. Med.* 1997; 242 (1): 27-33.
45. Laurent T.C. *The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and Its Derivatives* Portland Press, London, 1998.
46. Sloma A., Behr R., Widner W., Tang M., Sternberg D., Brown S. Methods for producing hyaluronan in a recombinant host cell. 2003. Patente: US8093036 B2.
47. Boeriu C.G., Springer J., Kooy F.K., van den Broek L.A.M., Eggink G. Production Methods for Hyaluronan. *Int. J. Carbohydr. Chem.* 2013; 2013: 14.
48. Evanko S.P., Wight T.N. Intracellular localization of hyaluronan in proliferating cells. *J. Histochem. Cytochem.* 1999; 47 (10): 1331-1342.

49. Stern R. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *Eur J Cell Biol* 2004; 83 (7): 317-325.
50. Wei X., Senanayake T.H., Warren G., Vinogradov S.V. Hyaluronic acid-based nanogel-drug conjugates with enhanced anticancer activity designed for the targeting of CD44-positive and drug-resistant tumors. *Bioconjug. Chem.* 2013; 24 (4): 658-668.
51. Stern R., Asari A.A., Sugahara K.N. Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur. J. Cell Biol.* 2006; 85 (8): 699-715.
52. Sherman L., Sleeman J., Herrlich P., Ponta H. Hyaluronate receptors: key players in growth, differentiation, migration and tumor progression. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1994; 6 (5): 726-733.
53. Ponta H., Sherman L., Herrlich P.A. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4 (1): 33-45.
54. Vivers S., Dransfield I., Hart S.P. Role of macrophage CD44 in the disposal of inflammatory cell corpses. *Clin. Sci.* 2002; 103 (5): 441-449.
55. Gee K., Kryworuchko M., Kumar A. Recent advances in the regulation of CD44 expression and its role in inflammation and autoimmune diseases. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 2004; 52 (1): 13-26.
56. Stern R. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? *Glycobiology* 2003; 13 (12): 26.
57. Braumüller H., Gansauge S., Ramadani M., Gansauge F. CD44v6 cell surface expression is a common feature of macrophages and macrophage-like cells – implication for a natural macrophage extravasation mechanism mimicked by tumor cells. *FEBS Lett.* 2000; 476 (3): 240-247.
58. Zoller M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat Rev Cancer* 2011; 11 (4): 254-267.
59. Matricardi P., Di Meo C., Coviello T., Hennink W.E., Alhaique F. Interpenetrating Polymer Networks polysaccharide hydrogels for drug delivery and tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013; 65 (9): 1172-1187.
60. Montanari E., Capece S., Di Meo C., Meringolo M., Coviello T., Agostinelli E., et al. Hyaluronic acid nanohydrogels as a useful tool for BSAO immobilization in the treatment of melanoma cancer cells. *Macromol Biosci* 2013; 13 (9): 1185-1194.
61. Di Meo C., Montanari E., Manzi L., Villani C., Coviello T., Matricardi P. Highly versatile nanohydrogel platform based on riboflavin-polysaccharide derivatives useful in the development of intrinsically fluorescent and cytocompatible drug carriers. *Carbohydr. Polym.* 2015; 115: 502-509.

62. Vindigni V., Cortivo R., Iacobellis L., Abatangelo G., Zavan B. Hyaluronan Benzyl Ester as a Scaffold for Tissue Engineering. *Int. J. Mol. Sci.* 2009; 10 (7): 2972-2985.
63. Della V.F., Romeo A. Esters of hyaluronic acid and their salts. 1996. Patente: EP0216453 B1.
64. Rosiak J.M., Yoshii F. Hydrogels and their medical applications. *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 1999; 151 (1-4): 56-64.
65. Hamidi M., Azadi A., Rafiei P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2008; 60 (15): 1638-1649.
66. Hoffman A.S. Hydrogels for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002; 54 (1): 3-12.
67. Park H., Park K. Biocompatibility Issues of Implantable Drug Delivery Systems. *Pharm. Res.* 1996; 13 (12): 1770-1776.
68. Anderson J.M. In vivo biocompatibility of implantable delivery systems and biomaterials. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1994; 40 (1): 8.
69. Hennink W.E., van Nostrum C.F. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002; 54 (1): 13-36.
70. Baroli B. Hydrogels for tissue engineering and delivery of tissue-inducing substances. *J. Pharm. Sci.* 2007; 96 (9): 2197-2223.
71. Jin R., Dijkstra P.J. Hydrogels for Tissue Engineering Applications. En: *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook*. New York, NY. Springer New York, 2010:203-225.
72. Wilson A.M., Justin G., Guiseppi-Elie A. Electroconductive Hydrogels. En: *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook*. New York, NY. Springer New York, 2010:319-337.
73. Chauhan S., Harikumar S.L., Kanupriya. Hydrogels: A Smart Drug Delivery System. *IJRPC* 2012; 2 (3): 12.
74. Sasaki Y., Akiyoshi K. Nanogel engineering for new nanobiomaterials: from chaperoning engineering to biomedical applications. *Chem. Rec.* 2010; 10 (6): 366-376.
75. Soni K.S., Desale S.S., Bronich T.K. Nanogels: An overview of properties, biomedical applications and obstacles to clinical translation. *J. Controlled Release* 2015.

76. Ganguly K., Chaturvedi K., More U.A., Nadagouda M.N., Aminabhavi T.M. Polysaccharide-based micro/nanohydrogels for delivering macromolecular therapeutics. *J. Control Release* 2014; 193: 162-173.
77. Zhang H., Zhai Y., Wang J., Zhai G. New progress and prospects: The application of nanogel in drug delivery. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2016; 60: 560-568.
78. Oh J.K., Drumright R., Siegwart D.J., Matyjaszewski K. The development of microgels/nanogels for drug delivery applications. *Prog. Polym. Sci.* 2008; 33 (4): 448-477.
79. Lim H.L., Hwang Y., Kar M., Varghese S. Smart hydrogels as functional biomimetic systems. *Biomater. Sci.* 2014; 2 (5): 603-618.
80. Traitel T., Kost J., Lapidot S.A. Modeling ionic hydrogels swelling: characterization of the non-steady state. *Biotechnol. Bioeng.* 2003; 84 (1): 20-28.
81. Ratnaparkhi P.K., Prajapati V.D., Jani G.K., Solanki H.K. Recent expansions in an emergent novel drug delivery technology: Hydrogel. *WJPPS* 2015; 4 (4): 24.
82. Sahu N.K., Gils P.S., Ray D., Sahoo P.K. Biodegradable hydrogels in controlled drug delivery. *Advances in Polymer Science and Technology: An International Journal* 2013; 3 (2): 9.
83. Ulery B.D., Nair L.S., Laurencin C.T. Biomedical Applications of Biodegradable Polymers. *J Polym Sci B Polym Phys* 2011; 49 (12): 832-864.
84. Ahmed E.M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *J Adv Res* 2015; 6 (2): 105-121.
85. Gibas I., Janik H. Review: synthetic polymer hydrogels for biomedical applications. *Chem. chem. technol.* 2010; 4 (4): 8.
86. Jenkins A.D., Kratochvíl P., Stepto R.F.T., Suter U.W. Glossary of basic terms in polymer science (IUPAC Recommendations 1996). En: *Pure and Applied Chemistry*, 1996:2287.
87. Zavan B., Cortivo R., Abatangelo G. Hydrogels and Tissue Engineering. En: *Hydrogels. Biological properties and Applications*. Springer-Verlag Mailand, 2009:1-8.
88. Gulrez S.K.H., Al-Assaf S., Phillips G.O. Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications. En: *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications*. InTech, 2011:117- 150.

89. Bettini R., Colombo P., Peppas N.A. Solubility effects on drug transport through pH-sensitive, swelling-controlled release systems: Transport of theophylline and metoclopramide monohydrochloride. *J. Controlled Release* 1995; 37 (1): 105-111.
90. Çiçek H., Tuncel A. Immobilization of α -chymotrypsin in thermally reversible isopropylacrylamide-hydroxyethylmethacrylate copolymer gel. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* 1998; 36 (4): 543-552.
91. Montoro S.R., Medeiros S.d.F., Alves G.M. Chapter 10 - Nanostructured Hydrogels. En: *Nanostructured Polymer Blends*. Oxford. William Andrew Publishing, 2014:325-355.
92. Rosiak J.M., Ulański P., Pajewski L.A., Yoshii F., Makuuchi K. Radiation formation of hydrogels for biomedical purposes. Some remarks and comments. *Radiat. Phys. Chem.* 1995; 46 (2): 161-168.
93. Park K.R., Nho Y.C. Synthesis of PVA/PVP hydrogels having two-layer by radiation and their physical properties. *Radiat. Phys. Chem.* 2003; 67 (3-4): 361-365.
94. Lin-Gibson S., Bencherif S., Cooper J.A., Wetzel S.J., Antonucci J.M., Vogel B.M., et al. Synthesis and Characterization of PEG Dimethacrylates and Their Hydrogels. *Biomacromolecules* 2004; 5 (4): 1280-1287.
95. Edman P., Ekman B., Sjöholm I. Immobilization of proteins in microspheres of biodegradable polyacryldextran. *J. Pharm. Sci.* 1980; 69 (7): 838-842.
96. Stureson C., Degling Wikingsson L. Comparison of poly(acryl starch) and poly(lactide-co-glycolide) microspheres as drug delivery system for a rotavirus vaccine. *J. Control Release* 2000; 68 (3): 441-450.
97. Heller J., Pangburn S.H., Roskos K.V. Development of enzymatically degradable protective coatings for use in triggered drug delivery systems: derivatized starch hydrogels. *Biomaterials* 1990; 11 (5): 345-350.
98. Artursson P., Edman P., Laakso T., Sjöholm I. Characterization of polyacryl starch microparticles as carriers for proteins and drugs. *J. Pharm. Sci.* 1984; 73 (11): 1507-1513.
99. Giammona G., Pitarresi G., Cavallaro G., Spadaro G. New biodegradable hydrogels based on an acryloylated polyaspartamide cross-linked by gamma irradiation. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 1999; 10 (9): 969-987.
100. Giammona G., Pitarresi G., Cavallaro G., Buscemi S., Saiano F. New biodegradable hydrogels based on a photocrosslinkable modified polyaspartamide: synthesis and characterization. *Biochim. Biophys. Acta* 1999; 1428 (1): 29-38.

101. Giammona G., Tomarchio V., Pitarresi G., Cavallaro G. Glycidyl Methacrylate Derivatization of Alpha,Beta-Poly(N-Hydroxyethyl)-DL-Aspartamide and Alpha,Beta-Polyasparthydrazide. *Polymer* 1997; 38 (13): 3315-3323.
102. Martens P., Anseth K.S. Characterization of hydrogels formed from acrylate modified poly(vinyl alcohol) macromers. *Polymer* 2000; 41 (21): 7715-7722.
103. Jin Y., Yamanaka J., Sato S., Miyata I., Yomota C., Yonese M. Recyclable characteristics of hyaluronate–polyhydroxyethyl acrylate blend hydrogel for controlled releases. *J. Controlled Release* 2001; 73 (2–3): 173-181.
104. Metters A.T., Anseth K.S., Bowman C.N. Fundamental studies of a novel, biodegradable PEG-b-PLA hydrogel. *Polymer* 2000; 41 (11): 3993-4004.
105. Kim S.H., Chu C.C. Synthesis and characterization of dextran-methacrylate hydrogels and structural study by SEM. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000; 49 (4): 517-527.
106. Hubbell J.A. Proceedings of the Seventh International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery SystemsHydrogel systems for barriers and local drug delivery in the control of wound healing. *J. Controlled Release* 1996; 39 (2): 305-313.
107. Andreopoulos F.M., Beckman E.J., Russell A.J. Light-induced tailoring of PEG-hydrogel properties. *Biomaterials* 1998; 19 (15): 1343-1352.
108. Ward J.H., Peppas N.A. Preparation of controlled release systems by free-radical UV polymerizations in the presence of a drug. *J. Control Release* 2001; 71 (2): 183-192.
109. Omidian H., Park K. Introduction to Hydrogels. En: *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook*. New York, NY. Springer New York, 2010:1-16.
110. Balakrishnan B., Mohanty M., Umashankar P.R., Jayakrishnan A. Evaluation of an in situ forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin. *Biomaterials* 2005; 26 (32): 6335-6342.
111. Tortora M., Cavalieri F., Chiessi E., Paradossi G. Michael-type addition reactions for the in situ formation of poly(vinyl alcohol)-based hydrogels. *Biomacromolecules* 2007; 8 (1): 209-214.
112. Jung J.P., Jones J.L., Cronier S.A., Collier J.H. Modulating the mechanical properties of self-assembled peptide hydrogels via native chemical ligation. *Biomaterials* 2008; 29 (13): 2143-2151.
113. Koschella A., Hartlieb M., Heinze T. A “click-chemistry” approach to cellulose-based hydrogels. *Carbohydr. Polym.* 2011; 86 (1): 154-161.

114. Willmott N., Kamel H.M.H., Cummings J., Stuart J.F.B., Florence A.T. Adriamycin-loaded albumin microspheres: lung entrapment and fate in the rat. En: *Microspheres and DrugTherapy: Pharmaceutical, Immunological and Medical Aspects*. Elsevier, 1984:189–205.
115. Olde Damink L.H.H., Dijkstra P.J., Van Luyn M.J.A., Van Wachem P.B., Nieuwenhuis P., Feijen J. Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 1995; 6 (8): 460-472.
116. Tabata Y., Nagano A., Muniruzzaman M., Ikada Y. In vitro sorption and desorption of basic fibroblast growth factor from biodegradable hydrogels. *Biomaterials* 1998; 19 (19): 1781-1789.
117. Monteiro Jr O.A.C., Airoidi C. Some studies of crosslinking chitosan–glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. *Int. J. Biol. Macromol.* 1999; 26 (2–3): 119-128.
118. Jameela S.R., Jayakrishnan A. Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres as a long acting biodegradable drug delivery vehicle: studies on the in vitro release of mitoxantrone and in vivo degradation of microspheres in rat muscle. *Biomaterials* 1995; 16 (10): 769-775.
119. Cunha P.L.R., Castro R.R., Rocha F.A.C., de Paula R.C.M., Feitosa J.P.A. Low viscosity hydrogel of guar gum: Preparation and physicochemical characterization. *Int. J. Biol. Macromol.* 2005; 37 (1–2): 99-104.
120. Kulkarni A.R., Soppimath K.S., Aminabhavi T.M. Controlled release of diclofenac sodium from sodium alginate beads crosslinked with glutaraldehyde1. *Pharm. Acta Helv.* 1999; 74 (1): 29-36.
121. Sperisa D., Rochmadi, Fahrurrozi M., Wiratni. Preparation of Hydrogel Based on Glutaraldehyde-Crosslinked Carrageenan. *IPCBE* 2012; 38: 150-154.
122. Brondsted H., Hovgaard L., Simonsen L. Dextran hydrogels for colon-specific drug delivery. IV: Comparative release study of hydrocortisone and prednisolone sodium phosphate. *STP pharma sciences* 1995; 5 (1): 65-69.
123. Gehrke S.H., Uhdén L.H., McBride J.F. Enhanced loading and activity retention of bioactive proteins in hydrogel delivery systems. *J. Control Release* 1998; 55 (1): 21-33.
124. Coviello T., Grassi M., Rambone G., Santucci E., Carafa M., Murtas E., et al. Novel hydrogel system from scleroglucan: synthesis and characterization. *J. Control Release* 1999; 60 (2-3): 367-378.
125. Park K., Shalaby W.S.W., Park H. *Biodegradable Hydrogels For Drug Delivery*. CRC Press, 1993.

126. Kuijpers A.J., van Wachem P.B., van Luyn M.J., Engbers G.H., Krijgsveld J., Zaat S.A., et al. In vivo and in vitro release of lysozyme from cross-linked gelatin hydrogels: a model system for the delivery of antibacterial proteins from prosthetic heart valves. *J. Control Release* 2000; 67 (2-3): 323-336.
127. Gřundělová L., Gregorova A., Mráček A., Vícha R., Smolka P., Minařík A. Viscoelastic and mechanical properties of hyaluronan films and hydrogels modified by carbodiimide. *Carbohydr. Polym.* 2015; 119: 142-148.
128. de Nooy A.E.J., Capitani D., Masci G., Crescenzi V. Ionic Polysaccharide Hydrogels via the Passerini and Ugi Multicomponent Condensations: Synthesis, Behavior and Solid-State NMR Characterization. *Biomacromolecules* 2000; 1 (2): 259-267.
129. de Nooy A.E.J., Masci G., Crescenzi V. Versatile Synthesis of Polysaccharide Hydrogels Using the Passerini and Ugi Multicomponent Condensations. *Macromolecules* 1999; 32 (4): 1318-1320.
130. Chen T., Embree H.D., Brown E.M., Taylor M.M., Payne G.F. Enzyme-catalyzed gel formation of gelatin and chitosan: potential for in situ applications. *Biomaterials* 2003; 24 (17): 2831-2841.
131. Jones A., Vaughan D. Hydrogel dressings in the management of a variety of wound types: A review. *Journal of Orthopaedic Nursing* 2005; 9: S1-S11.
132. Sperinde J.J., Griffith L.G. Control and Prediction of Gelation Kinetics in Enzymatically Cross-Linked Poly(ethylene glycol) Hydrogels. *Macromolecules* 2000; 33 (15): 5476-5480.
133. Czech Z., Seeger K. Cross-linked hydrogels and their use as wound dressings. 1992. Patente: US5135755 A.
134. Garcha L., Aguilar M.R., Roman J.S. Biodegradable Hydrogels for Controlled Drug Release. En: *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook*. Springer, 2010:147-156.
135. Yoo I.-K., Seong G.H., Chang H.N., Park J.K. Encapsulation of Lactobacillus casei cells in liquid-core alginate capsules for lactic acid production. *Enzyme Microb. Technol.* 1996; 19 (6): 428-433.
136. Hunt N.C., Shelton R.M., Henderson D.J., Grover L.M. Calcium-alginate hydrogel-encapsulated fibroblasts provide sustained release of vascular endothelial growth factor. *Tissue Eng Part A* 2013; 19 (7-8): 905-914.
137. Gombotz W.R., Wee S. Protein release from alginate matrices. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1998; 31 (3): 267-285.

138. Leor J., Tuvia S., Guetta V., Manczur F., Castel D., Willenz U., et al. Intracoronary Injection of In Situ Forming Alginate Hydrogel Reverses Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction in Swine. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009; 54 (11): 1014-1023.
139. Andrianov A.K., Payne L.G., Visscher K.B., Allcock H.R., Langer R. Hydrolytic degradation of ionically cross-linked polyphosphazene microspheres. *J. Appl. Polym. Sci.* 1994; 53 (12): 1573-1578.
140. Shu X.Z., Zhu K.J. Controlled drug release properties of ionically cross-linked chitosan beads: the influence of anion structure. *Int. J. Pharm.* 2002; 233 (1-2): 217-225.
141. Supper S., Anton N., Boisclair J., Seidel N., Riemenschnitter M., Curdy C., et al. Chitosan/glucose 1-phosphate as new stable in situ forming depot system for controlled drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2014; 88 (2): 361-373.
142. Nair L.S., Starnes T., Ko J.W., Laurencin C.T. Development of injectable thermogelling chitosan-inorganic phosphate solutions for biomedical applications. *Biomacromolecules* 2007; 8 (12): 3779-3785.
143. Chenite A., Chaput C., Wang D., Combes C., Buschmann M.D., Hoemann C.D., et al. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials* 2000; 21 (21): 2155-2161.
144. Ahmadi R., de Bruijn J.D. Biocompatibility and gelation of chitosan-glycerol phosphate hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2008; 86 (3): 824-832.
145. Chenite A., Buschmann M., Wang D., Chaput C., Kandani N. Rheological characterisation of thermogelling chitosan/glycerophosphate solutions. *Carbohydr. Polym.* 2001; 46: 39-47.
146. Mao J.S., Cui Y.L., Wang X.H., Sun Y., Yin Y.J., Zhao H.M., et al. A preliminary study on chitosan and gelatin polyelectrolyte complex cytocompatibility by cell cycle and apoptosis analysis. *Biomaterials* 2004; 25 (18): 3973-3981.
147. Yin Y.J., Yao K.D., Cheng G.X., Ma J.B. Properties of polyelectrolyte complex films of chitosan and gelatin. *Polym. Int.* 1999; 48 (6): 429-432.
148. Denuziere A., Ferrier D., Damour O., Domard A. Chitosan-chondroitin sulfate and chitosan-hyaluronate polyelectrolyte complexes: biological properties. *Biomaterials* 1998; 19 (14): 1275-1285.
149. Boddohi S., Moore N., Johnson P.A., Kipper M.J. Polysaccharide-based polyelectrolyte complex nanoparticles from chitosan, heparin, and hyaluronan. *Biomacromolecules* 2009; 10 (6): 1402-1409.

150. Yan X.-L., Khor E., Lim L.-Y. Chitosan-alginate films prepared with chitosans of different molecular weights. *J. Biomed. Mater. Res.* 2001; 58 (4): 358-365.
151. Sezer A.D., Cevher E., Hatipoglu F., Ogurtan Z., Bas A.L., Akbuga J. Preparation of fucoidan-chitosan hydrogel and its application as burn healing accelerator on rabbits. *Biol. Pharm. Bull.* 2008; 31 (12): 2326-2333.
152. de Oliveira H.C., Fonseca J.L., Pereira M.R. Chitosan-poly(acrylic acid) polyelectrolyte complex membranes: preparation, characterization and permeability studies. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2008; 19 (2): 143-160.
153. Magnin D., Lefebvre J., Chornet E., Dumitriu S. Physicochemical and structural characterization of a polyionic matrix of interest in biotechnology, in the pharmaceutical and biomedical fields. *Carbohydr. Polym.* 2004; 55 (4): 437-453.
154. Chornet E., Dumitriu S. Polyionic hydrogels based on xanthan and chitosan for stabilising and controlled release of vitamins. 2000. Patente: WO2000004086 A1.
155. Tsung M., Burgess D.J. Preparation and stabilization of heparin/gelatin complex coacervate microcapsules. *J. Pharm. Sci.* 1997; 86 (5): 603-607.
156. Dumitriu S., Chornet E., Vidal P. Polyionic insoluble hydrogels comprising xanthan and chitosan. 1997. Patente: US5620706 A.
157. Dumitriu S., Magny P., Montané D., Vidal P.F., Chornet E. Polyionic Hydrogels Obtained by Complexation between Xanthan and Chitosan: Their Properties as Supports for Enzyme Immobilization. *J. Bioact. Compat. Polym.* 1994; 9 (2): 184-209.
158. Giannouli P., Morris E.R. Cryogelation of xanthan. *Food Hydrocolloids* 2003; 17 (4): 495-501.
159. Yokoyama F., Masada I., Shimamura K., Ikawa T., Monobe K. Morphology and structure of highly elastic poly(vinyl alcohol) hydrogel prepared by repeated freezing-and-melting. *Colloid. Polym. Sci.* 1986; 264 (7): 595-601.
160. Takamura A., Ishii F., Hidaka H. Drug release from poly(vinyl alcohol) gel prepared by freeze-thaw procedure. *J. Controlled Release* 1992; 20 (1): 21-27.
161. Slager J., Domb A.J. Biopolymer stereocomplexes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2003; 55 (4): 549-583.
162. Ravve A. Physical Properties and Physical Chemistry of Polymers En: *Principles of Polymer Chemistry*. 3 ed. Springer-Verlag New York, 1995.
163. Ikada Y., Jamshidi K., Tsuji H., Hyon S.H. Stereocomplex formation between enantiomeric poly(lactides). *Macromolecules* 1987; 20 (4): 904-906.

164. Slager J., Domb A.J. Heterostereocomplexes prepared from d-PLA and l-PLA and leuprolide. II. Release of leuprolide. *Biomacromolecules* 2003; 4 (5): 1316-1320.
165. Slager J., Domb A.J. Heterostereocomplexes prepared from d-poly(lactide) and leuprolide. I. Characterization. *Biomacromolecules* 2003; 4 (5): 1308-1315.
166. Bos G.W., Jacobs J.J.L., Koten J.W., Van Tomme S., Veldhuis T., van Nostrum C.F., et al. In situ crosslinked biodegradable hydrogels loaded with IL-2 are effective tools for local IL-2 therapy. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2004; 21 (4): 561-567.
167. Bos G.W., Hennink W.E., Brouwer L.A., den Otter W., Veldhuis T.F.J., van Nostrum C.F., et al. Tissue reactions of in situ formed dextran hydrogels crosslinked by stereocomplex formation after subcutaneous implantation in rats. *Biomaterials* 2005; 26 (18): 3901-3909.
168. Förster S., Antonietti M. Amphiphilic Block Copolymers in Structure-Controlled Nanomaterial Hybrids. *Adv. Mater.* 1998; 10 (3): 195-217.
169. Jeong B., Bae Y.H., Kim S.W. Thermoreversible Gelation of PEG-PLGA-PEG Triblock Copolymer Aqueous Solutions. *Macromolecules* 1999; 32 (21): 7064-7069.
170. Jeong B., Kibbey M.R., Birnbaum J.C., Won Y.-Y., Gutowska A. Thermogelling Biodegradable Polymers with Hydrophilic Backbones: PEG-g-PLGA. *Macromolecules* 2000; 33 (22): 8317-8322.
171. Li S.M., Rashkov I., Espartero J.L., Manolova N., Vert M. Synthesis, Characterization, and Hydrolytic Degradation of PLA/PEO/PLA Triblock Copolymers with Long Poly(l-lactic acid) Blocks. *Macromolecules* 1996; 29 (1): 57-62.
172. Rashkov I., Manolova N., Li S.M., Espartero J.L., Vert M. Synthesis, Characterization, and Hydrolytic Degradation of PLA/PEO/PLA Triblock Copolymers with Short Poly(l-lactic acid) Chains. *Macromolecules* 1996; 29 (1): 50-56.
173. Molina I., Li S., Martinez M.B., Vert M. Protein release from physically crosslinked hydrogels of the PLA/PEO/PLA triblock copolymer-type. *Biomaterials* 2001; 22 (4): 363-369.
174. Bezemer J.M., Radersma R., Grijpma D.W., Dijkstra P.J., van Blitterswijk C.A., Feijen J. Microspheres for protein delivery prepared from amphiphilic multiblock copolymers: 2. Modulation of release rate. *J. Controlled Release* 2000; 67 (2-3): 249-260.
175. Bezemer J.M., Radersma R., Grijpma D.W., Dijkstra P.J., van Blitterswijk C.A., Feijen J. Microspheres for protein delivery prepared from amphiphilic multiblock copolymers. 1. Influence of preparation techniques on particle characteristics and protein delivery. *J. Control Release* 2000; 67 (2-3): 233-248.

176. Bezemer J.M., Grijpma D.W., Dijkstra P.J., van Blitterswijk C.A., Feijen J. Control of protein delivery from amphiphilic poly(ether ester) multiblock copolymers by varying their water content using emulsification techniques. *J. Controlled Release* 2000; 66 (2–3): 307-320.
177. Bezemer J.M., Radersma R., Grijpma D.W., Dijkstra P.J., Feijen J., van Blitterswijk C.A. Zero-order release of lysozyme from poly(ethylene glycol)/poly(butylene terephthalate) matrices. *J. Controlled Release* 2000; 64 (1–3): 179-192.
178. Bezemer J.M., Grijpma D.W., Dijkstra P.J., van Blitterswijk C.A., Feijen J. A controlled release system for proteins based on poly(ether ester) block-copolymers: polymer network characterization. *J. Controlled Release* 1999; 62 (3): 393-405.
179. Hoare T.R., Kohane D.S. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer* 2008; 49 (8): 1993-2007.
180. Frutos G., Prior-Cabanillas A., París R., Quijada-Garrido I. A novel controlled drug delivery system based on pH-responsive hydrogels included in soft gelatin capsules. *Acta Biomater.* 2010; 6 (12): 4650-4656.
181. Ganji F., Vasheghani-Farahani S., Vasheghani-Farahani E. Theoretical Description of Hydrogel Swelling: A Review. *Iran. Polym. J.* 2010; 19 (5): 375-398.
182. Akiyoshi K., Deguchi S., Tajima H., Nishikawa T., Sunamoto J. Microscopic Structure and Thermoresponsiveness of a Hydrogel Nanoparticle by Self-Assembly of a Hydrophobized Polysaccharide. *Macromolecules* 1997; 30 (4): 857-861.
183. Taniguchi I., Akiyoshi K., Sunamoto J. Self-aggregate nanoparticles of cholesteryl and galactoside groups-substituted pullulan and their specific binding to galactose specific lectin, RCA120. *Macromol. Chem. Phys.* 1999; 200 (6): 1554-1560.
184. Akiyoshi K., Kobayashi S., Shichibe S., Mix D., Baudys M., Wan Kim S., et al. Self-assembled hydrogel nanoparticle of cholesterol-bearing pullulan as a carrier of protein drugs: Complexation and stabilization of insulin. *J. Controlled Release* 1998; 54 (3): 313-320.
185. Akiyoshi K., Deguchi S., Moriguchi N., Yamaguchi S., Sunamoto J. Self-aggregates of hydrophobized polysaccharides in water. Formation and characteristics of nanoparticles. *Macromolecules* 1993; 26 (12): 3062-3068.
186. Akiyoshi K., Taniguchi I., Fukui H., Sunamoto J. Hydrogel nanoparticle formed by self-assembly of hydrophobized polysaccharide. Stabilization of adriamycin by complexation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1996; 42: 286–290.

187. Uchegbu I.F., SchÄtzlein A.G., Tetley L., Gray A.I., Sludden J., Siddique S., et al. Polymeric Chitosan-based Vesicles for Drug Delivery. *J. Pharm. Pharmacol.* 1998; 50 (5): 453-458.
188. Sludden J., Uchegbu I.F., SchÄtzlein A.G. The Encapsulation of Bleomycin Within Chitosan Based Polymeric Vesicles Does Not Alter its Biodistribution. *J. Pharm. Pharmacol.* 2000; 52 (4): 377-382.
189. Qu X., Wirsén A., Albertsson A.-C. Structural change and swelling mechanism of pH-sensitive hydrogels based on chitosan and D,L-lactic acid. *J. Appl. Polym. Sci.* 1999; 74 (13): 3186-3192.
190. Qu X., Wirsén A., Albertsson A.C. Novel pH-sensitive chitosan hydrogels: swelling behavior and states of water. *Polymer* 2000; 41 (12): 4589-4598.
191. Yazdani-Pedram M., Retuert J., Quijada R. Hydrogels based on modified chitosan, 1. Synthesis and swelling behavior of poly(acrylic acid) grafted chitosan. *Macromol. Chem. Phys.* 2000; 201 (9): 923-930.
192. Kim S.Y., Cho S.M., Lee Y.M., Kim S.J. Thermo- and pH-responsive behaviors of graft copolymer and blend based on chitosan and N-isopropylacrylamide. *J. Appl. Polym. Sci.* 2000; 78 (7): 1381-1391.
193. Huh K.M., Hashi J., Ooya T., Yui N. Synthesis and characterization of dextran grafted with poly(N-isopropylacrylamide-co-N,N-dimethyl-acrylamide). *Macromol. Chem. Phys.* 2000; 201 (5): 613-619.
194. Na K., Park K.-H., Kim S.W., Bae Y.H. Self-assembled hydrogel nanoparticles from curdlan derivatives: characterization, anti-cancer drug release and interaction with a hepatoma cell line (HepG2). *J. Controlled Release* 2000; 69 (2): 225-236.
195. Takigami M., Amada H., Nagasawa N., Yagi T., Kasahara T., Takigami S., et al. Preparation and properties of CMC gel. *Transactions of the Materials Research Society of Japan* 2007; 32 (3): 713 - 716.
196. Eagland D., Crowther N.J., Butler C.J. Complexation between polyoxyethylene and polymethacrylic acid—the importance of the molar mass of polyoxyethylene. *Eur. Polym. J.* 1994; 30 (7): 767-773.
197. Yoshikawa E., Fournier M.J., Mason T.L., Tirrell D.A. Genetically Engineered Fluoropolymers. Synthesis of Repetitive Polypeptides Containing p-Fluorophenylalanine residues. *Macromolecules* 1994; 27 (19): 5471-5475.
198. McGrath K.P., Fournier M.J., Mason T.L., Tirrell D.A. Genetically directed syntheses of new polymeric materials. Expression of artificial genes encoding proteins with repeating -(AlaGly)₃ProGluGly- elements. *J. Am. Chem. Soc.* 1992; 114 (2): 727-733.

199. Cappello J., Crissman J., Dorman M., Mikolajczak M., Textor G., Marquet M., et al. Genetic engineering of structural protein polymers. *Biotechnol. Prog.* 1990; 6 (3): 198-202.
200. Cappello J., Crissman J.W., Crissman M., Ferrari F.A., Textor G., Wallis O., et al. In-situ self-assembling protein polymer gel systems for administration, delivery, and release of drugs. *J. Controlled Release* 1998; 53 (1–3): 105-117.
201. Petka W.A., Harden J.L., McGrath K.P., Wirtz D., Tirrell D.A. Reversible hydrogels from self-assembling artificial proteins. *Science* 1998; 281 (5375): 389-392.
202. Miyata T., Asami N., Uragami T. A reversibly antigen-responsive hydrogel. *Nature* 1999; 399 (6738): 766-769.
203. Omidian H., Park K. Swelling agents and devices in oral drug delivery. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2008; 18 (2): 83-93.
204. Flory P.J. *Principles of Polymer Chemistry*, 1953.
205. Eichenbaum G.M., Kiser P.F., Simon S.A., Needham D. pH and Ion-Triggered Volume Response of Anionic Hydrogel Microspheres. *Macromolecules* 1998; 31 (15): 5084-5093.
206. Katime I.A., Katime O., Katime D. Materiales inteligentes: Hidrogeles macromoleculares, algunas aplicaciones biomédicas. *Anales RSEQ* 2005: 35-50.
207. Schott H. Kinetics of swelling of polymers and their gels. *J. Pharm. Sci.* 1992; 81 (5): 467-470.
208. Peppas N.A., Urdahl K.G. Anomalous penetrant transport in glassy polymers—VIII. Solvent-induced cracking in polystyrene. *Eur. Polym. J.* 1988; 24 (1): 13-20.
209. Urdahl K.G., Peppas N.A. Anomalous penetrant transport in glassy polymers V. Cyclohexane transport in polystyrene. *J. Appl. Polym. Sci.* 1987; 33 (8): 2669-2687.
210. Smith M.J., Peppas N.A. Effect of the degree of crosslinking on penetrant transport in polystyrene. *Polymer* 1985; 26 (4): 569-574.
211. Shieh L.Y., Peppas N.A. Solute and penetrant diffusion in swellable polymers. XI. The dynamic swelling behavior of hydrophilic copolymers containing multiethylene glycol dimethacrylates. *J. Appl. Polym. Sci.* 1991; 42 (6): 1579-1587.
212. Lee W.-F., Shieh C.-H. pH-thermoreversible hydrogels. II. Synthesis and swelling behaviors of N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid-co-sodium acrylate hydrogels. *J. Appl. Polym. Sci.* 1999; 73 (10): 1955-1967.
213. Díez-Peña E., Quijada-Garrido I., Barrales-Rienda J.M. Analysis of the Swelling Dynamics of Cross-Linked P(N-iPAAm-co-MAA) Copolymers and Their

Homopolymers under Acidic Medium. A Kinetics Interpretation of the Overshooting Effect. *Macromolecules* 2003; 36 (7): 2475-2483.

214. Valencia J., Piérola I.F. Swelling kinetics of poly(N-vinylimidazole-co-sodium styrenesulfonate) hydrogels. *J. Appl. Polym. Sci.* 2002; 83 (1): 191-200.

215. Bhardwaj Y.K., Sabharwal S., Majali A.B. Dynamic swelling kinetics of radiation polymerized poly(2-hydroxy ethyl methacrylate) and 2-hydroxy ethyl methacrylate-co-ionic hydrogels - Part I: Swelling in aqueous solution. *Int. J. Polym. Mater.* 2000; 17 (3): 239-252.

216. Pal K., Banthia A.K., Majumdar D.K. Polymeric Hydrogels: Characterization and Biomedical Applications. *Des. Monomers Polym.* 2009; 12 (3): 197-220.

217. Peppas N.A. *Hydrogels in Medicine and Pharmacy: Fundamentals*. CRC Press, 1986.

218. Chien Y.W. *Novel drug delivery systems*. New York. M. Dekker, 1992.

219. Korsmeyer R.W., Gurny R., Doelker E., Buri P., Peppas N.A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int. J. Pharm.* 1983; 15 (1): 25-35.

220. Sinclair G.W., Peppas N.A. Analysis of non-Fickian transport in polymers using simplified exponential expressions. *J. Membrane Sci.* 1984; 17 (3): 329-331.

221. Ritger P.L., Peppas N.A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *J. Controlled Release* 1987; 5 (1): 37-42.

222. Peppas N.A. Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. *Pharm. Acta Helv.* 1985; 60 (4): 110-111.

223. Stankovic M., Tomar J., Hiemstra C., Steendam R., Frijlink H.W., Hinrichs W.L. Tailored protein release from biodegradable poly(epsilon-caprolactone-PEG)-b-poly(epsilon-caprolactone) multiblock-copolymer implants. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2014; 87 (2): 329-337.

224. Parmar K.R., Shah S.R., Sheth N.R. Studies in dissolution enhancement of ezetimibe by solid dispersions in combination with a surface adsorbent dissolution technologies. *Dissolut. Technol.* 2011: 55-61.

225. Tambe S.R., Deore L.P., Bachhav D.G. Formulation development and characterization of superporous hydrogel of itopride hydrochloride for gastroretentive drug delivery system. *World J. Pharm. Res.* 2015; 4 (2): 1552-1573.

226. Hanif M., Ranjha N.M., Shoaib M.H., Mudasser J., Yousuf R.I., Khan A., et al. Preparation, characterization and release of verapamil hydrochloride from

polycaprolactone/acrylic acid (PCL/AA) hydrogels. *Pak J Pharm Sci* 2011; 24 (4): 503-511.

227. Amarachi C.S., Onunkwo G., Onyishi I. Kinetics and mechanisms of drug release from swellable and non swellable matrices: a review. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* 2013; 4 (2): 97-103.

228. Teodorescu M., Morariu S., Bercea M., Sacarescu L. Viscoelastic and structural properties of poly(vinyl alcohol)/poly(vinylpyrrolidone) hydrogels. *RSC Advances* 2016; 6 (46): 39718-39727.

229. Jamnongkan T., Kaewpirom S. Controlled-release fertilizer based on chitosan hydrogel: phosphorus release kinetics. *Sci. J. UBU.* 2010; 1 (1): 43-50.

230. Huang X., Brazel C.S. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *J. Controlled Release* 2001; 73 (2-3): 121-136.

231. Fu Y., Kao W.J. Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv* 2010; 7 (4): 429-444.

232. Dash S., Murthy P.N., Nath L., Chowdhury P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol. Pharm.* 2010; 67 (3): 217-223.

233. Costa P., Sousa Lobo J.M. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2001; 13 (2): 123-133.

234. Smart J.D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005; 57 (11): 1556-1568.

235. Mythri G., Kavitha K., Rupesh Kumar M., Jagadeesh Singh S. Novel Mucoadhesive Polymers -A Review. *JAPS* 2011; 1 (8): 37-42.

236. Boddupalli B.M., Mohammed Z.N., Nath R.A., Banji D. Mucoadhesive drug delivery system: An overview. *J Adv Pharm Technol Res* 2010; 1 (4): 381-387.

237. Saraswathi B., Balaji A., Umashankar M.S. Polymers in mucoadhesive drug delivery system-latest updates. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2013; 5 (3): 423-430.

238. Dodou D., Breedveld P., Wieringa P.A. Mucoadhesives in the gastrointestinal tract: revisiting the literature for novel applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2005; 60 (1): 1-16.

239. Dash M., Chiellini F., Ottenbrite R.M., Chiellini E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* 2011; 36 (8): 981-1014.

240. Ministerio de Sanidad y Consumo. Real Farmacopea Española, 3ª Ed. *Monografías de formas farmacéuticas. Formas farmacéuticas*. Madrid, 2005.
241. Hejazi R., Amiji M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. *J. Control Release* 2003; 89 (2): 151-165.
242. Kitano M., Maitani Y., Takayama K., Nagai T. Buccal absorption through golden hamster cheek pouch in vitro and in vivo of 17 β -estradiol from hydrogels containing three types of absorption enhancers. *Int. J. Pharm.* 1998; 174 (1–2): 19-28.
243. Gibson J., Halliday J.A., Ewert K., Robertson S. A controlled release pilocarpine buccal insert in the treatment of Sjogren's syndrome. *Br. Dent. J.* 2007; 202 (7): 404-405.
244. Cid Y.P., Pedrazzi V., de Sousa V.P., Pierre M.B. In vitro characterization of chitosan gels for buccal delivery of celecoxib: influence of a penetration enhancer. *AAPS PharmSciTech* 2012; 13 (1): 101-111.
245. Grijalvo S., Mayr J., Eritja R., Diaz D.D. Biodegradable liposome-encapsulated hydrogels for biomedical applications: a marriage of convenience. *Biomater. Sci.* 2016; 4 (4): 555-574.
246. Mendes A.I., Silva A.C., Catita J.A., Cerqueira F., Gabriel C., Lopes C.M. Miconazole-loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for local delivery to the oral mucosa: improving antifungal activity. *Colloids Surf., B: Biointerfaces* 2013; 111: 755-763.
247. Patel V.R., Amiji M.M. Preparation and characterization of freeze-dried chitosan-poly(ethylene oxide) hydrogels for site-specific antibiotic delivery in the stomach. *Pharm. Res.* 1996; 13 (4): 588-593.
248. Hemant Yadav K.S., Satish C.S., H.G. S. Preparation and evaluation of chitosan-poly (acrylic acid) hydrogels as stomach specific delivery for amoxicillin and metronidazole. *Indian J. Pharm. Sci.* 2007; 69 (1): 91-95.
249. Chavda H.V., Patel C.N. Preparation and In Vitro Evaluation of a Stomach Specific Drug Delivery System based on Superporous Hydrogel Composite. *Indian J. Pharm. Sci.* 2011; 73 (1): 30-37.
250. Dai Y.N., Li P., Zhang J.P., Wang A.Q., Wei Q. A novel pH sensitive N-succinyl chitosan/alginate hydrogel bead for nifedipine delivery. *Biopharm. Drug Dispos.* 2008; 29 (3): 173-184.
251. Knipe J.M., Strong L.E., Peppas N.A. Enzyme- and pH-Responsive Microencapsulated Nanogels for Oral Delivery of siRNA to Induce TNF-alpha Knockdown in the Intestine. *Biomacromolecules* 2016; 17 (3): 788-797.

252. Akiyama Y., Lueßen H.L., de Boer A.G., Coos Verhoef J., Junginger H.E. Novel peroral dosage forms with protease inhibitory activities. II. Design of fast dissolving poly(acrylate) and controlled drug-releasing capsule formulations with trypsin inhibiting properties. *Int. J. Pharm.* 1996; 138 (1): 13-23.
253. Lowman A.M., Morishita M., Kajita M., Nagai T., Peppas N.A. Oral delivery of insulin using pH-responsive complexation gels. *J. Pharm. Sci.* 1999; 88 (9): 933-937.
254. Kumar R., Patil M.B., Patil S.R., Paschapur M.S. Polysaccharides based colon specific drug delivery: a review. *Int. J. PharmTech. Res.* 2009; 1 (2): 334-346.
255. Minhas M.U., Ahmad M., Anwar J., Khan S. Synthesis and Characterization of Biodegradable Hydrogels for Oral Delivery of 5-Fluorouracil Targeted to Colon: Screening with Preliminary In Vivo Studies. *Advances Polym. Tech.* 2016: n/a-n/a.
256. Das A., Wadhwa S., Srivastava A.K. Cross-linked guar gum hydrogel discs for colon-specific delivery of ibuprofen: formulation and in vitro evaluation. *Drug Deliv.* 2006; 13 (2): 139-142.
257. Gliko-Kabir I., Yagen B., Penhasi A., Rubinstein A. Phosphated crosslinked guar for colon-specific drug delivery: I. Preparation and physicochemical characterization. *J. Controlled Release* 2000; 63 (1-2): 121-127.
258. Maris B., Verheyden L., Van Reeth K., Samyn C., Augustijns P., Kinget R., et al. Synthesis and characterisation of inulin-azo hydrogels designed for colon targeting. *Int. J. Pharm.* 2001; 213 (1-2): 143-152.
259. Saboktakin M.R., Tabatabaie R., Maharramov A., Ramazanov M.A. Synthesis and characterization of superparamagnetic chitosan–dextran sulfate hydrogels as nano carriers for colon-specific drug delivery. *Carbohydr. Polym.* 2010; 81 (2): 372-376.
260. Huang S.J., Wang J.M., Tseng S.C., Wang L.F., Chen J.S. Controlled immobilization of chondroitin sulfate in polyacrylic acid networks. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2007; 18 (1): 17-34.
261. Saboktakin M.R., Tabatabaie R.M., Maharramov A., Ramazanov M.A. Synthesis and characterization of chitosan hydrogels containing 5-aminosalicylic acid nanopendents for colon: specific drug delivery. *J. Pharm. Sci.* 2010; 99 (12): 4955-4961.
262. Fajardo A.R., Silva M.B., Lopes L.C., Piai J.F., Rubira A.F., Muniz E.C. Hydrogel based on an alginate-Ca²⁺/chondroitin sulfate matrix as a potential colon-specific drug delivery system. *RSC Advances* 2012; 2 (29): 11095-11103.
263. George M., Abraham T.E. pH sensitive alginate–guar gum hydrogel for the controlled delivery of protein drugs. *Int. J. Pharm.* 2007; 335 (1-2): 123-129.

264. Kopecek J., Kopeckova P., Akala E.O., Yeh P.Y., Ulbrich K. pH sensitive hydrogels with adjustable swelling kinetics for colon-specific delivery of peptides and proteins. 1998. Patente: WO 1998001421
265. Stubbe B., Maris B., Van den Mooter G., De Smedt S.C., Demeester J. The in vitro evaluation of 'azo containing polysaccharide gels' for colon delivery. *J. Controlled Release* 2001; 75 (1–2): 103-114.
266. Shantha K.L., Ravichandran P., Rao K.P. Azo polymeric hydrogels for colon targeted drug delivery. *Biomaterials* 1995; 16 (17): 1313-1318.
267. Brondsted H., Kopecek J. Hydrogels for site-specific drug delivery to the colon: in vitro and in vivo degradation. *Pharm. Res.* 1992; 9 (12): 1540-1545.
268. Ashwanikumar N., Kumar N.A., Nair S.A., Kumar G.V. Methacrylic-based nanogels for the pH-sensitive delivery of 5-fluorouracil in the colon. *Int J Nanomedicine* 2012; 7: 5769-5779.
269. Abdelmalak N.S., El-Menshawe S.F. A new topical fluconazole microsphere loaded hydrogel: preparation and characterization. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2012; 4 (1): 460-468.
270. Vila M.M., Coelho S.L., Chaud M.V., Tubino M., Oliveira J.M., Jr., Balcao V.M. Development and characterization of a hydrogel containing nitrofurazone for antimicrobial topical applications. *Curr Pharm Biotechnol* 2014; 15 (2): 182-190.
271. Jodar K.S., Balcao V.M., Chaud M.V., Tubino M., Yoshida V.M., Oliveira J.M., Jr., et al. Development and characterization of a hydrogel containing silver sulfadiazine for antimicrobial topical applications. *J. Pharm. Sci.* 2015; 104 (7): 2241-2254.
272. Gao W., Vecchio D., Li J., Zhu J., Zhang Q., Fu V., et al. Hydrogel containing nanoparticle-stabilized liposomes for topical antimicrobial delivery. *ACS Nano* 2014; 8 (3): 2900-2907.
273. Kim M.K., Chung S.J., Lee M.H., Cho A.R., Shim C.K. Targeted and sustained delivery of hydrocortisone to normal and stratum corneum-removed skin without enhanced skin absorption using a liposome gel. *J. Controlled Release* 1997; 46 (3): 243-251.
274. Wiechers J. Use of chemical penetration enhancers in transdermal drug delivery--possibilities and difficulties. *Acta Pharm. Nord.* 1992; 4 (2): 123.
275. Knepp V.M., Hadgraft J., Guy R.H. Transdermal drug delivery: problems and possibilities. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 1987; 4 (1): 13-37.
276. Kanikkannan N., Kandimalla K., Lamba S.S., Singh M. Structure-activity relationship of chemical penetration enhancers in transdermal drug delivery. *Curr. Med. Chem.* 2000; 7 (6): 593-608.

277. Monica A.S., Gautami J. Design and evaluation of topical hydrogel formulation of diclofenac sodium for improved therapy. *IJPSR* 2014; 5 (5): 1973-1980
278. Chen H., Chang X., Du D., Li J., Xu H., Yang X. Microemulsion-based hydrogel formulation of ibuprofen for topical delivery. *Int. J. Pharm.* 2006; 315 (1-2): 52-58.
279. Kulkarni R.V., Sreedhar V., Mutalik S., Setty C.M., Sa B. Interpenetrating network hydrogel membranes of sodium alginate and poly(vinyl alcohol) for controlled release of prazosin hydrochloride through skin. *Int. J. Biol. Macromol.* 2010; 47 (4): 520-527.
280. Sun Y.-M., Huang J.-J., Lin F.-C., Lai J.-Y. Composite poly(2-hydroxyethyl methacrylate) membranes as rate-controlling barriers for transdermal applications. *Biomaterials* 1997; 18 (7): 527-533.
281. Hong X., Wu Z., Chen L., Wu F., Wei L., Yuan W. Hydrogel Microneedle Arrays for Transdermal Drug Delivery. *Nano-Micro Letters* 2014; 6 (3): 191-199.
282. Donnelly R.F., Singh T.R.R., Garland M.J., Migalska K., Majithiya R., McCrudden C.M., et al. Hydrogel-Forming Microneedle Arrays for Enhanced Transdermal Drug Delivery. *Advanced Functional Materials* 2012; 22 (23): 4879-4890.
283. Chen L.-L.H., Chien Y.W. Transdermal iontophoretic permeation of luteinizing hormone releasing hormone: Characterization of electric parameters. *J. Controlled Release* 1996; 40 (3): 187-198.
284. Fang J.Y., Sung K.C., Wang J.J., Chu C.C., Chen K.T. The effects of iontophoresis and electroporation on transdermal delivery of buprenorphine from solutions and hydrogels. *J. Pharm. Pharmacol.* 2002; 54 (10): 1329-1337.
285. Berkó S., Szűcs K.F., Balázs B., Csányi E., Varju G., Sztojkov-Ivanov A., et al. Electroporation-delivered transdermal neostigmine in rats: equivalent action to intravenous administration. *Drug Design, Development and Therapy* 2016; 10: 1695-1701.
286. Fang J.-Y., Huang Y.-B., Lin H.-H., Tsai Y.-H. Transdermal iontophoresis of sodium nonivamide acetate. IV. Effect of polymer formulations. *Int. J. Pharm.* 1998; 173 (1-2): 127-140.
287. Conaghey O.M., Corish J., Corrigan O.I. Iontophoretically assisted in vitro membrane transport of nicotine from a hydrogel containing ion exchange resins. *Int. J. Pharm.* 1998; 170 (2): 225-237.
288. Fang J.-Y., Hsu L.-R., Huang Y.-B., Tsai Y.-H. Evaluation of transdermal iontophoresis of enoxacin from polymer formulations: in vitro skin permeation and in vivo microdialysis using Wistar rat as an animal model. *Int. J. Pharm.* 1999; 180 (2): 137-149.

289. Peppas N.A., Bures P., Leobandung W., Ichikawa H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2000; 50 (1): 27-46.
290. Ryu J.-M., Chung S.-J., Lee M.-H., Kim C.-K., Chang-Koo S. Increased bioavailability of propranolol in rats by retaining thermally gelling liquid suppositories in the rectum. *J. Controlled Release* 1999; 59 (2): 163-172.
291. Miyazaki S., Suisha F., Kawasaki N., Shirakawa M., Yamatoya K., Attwood D. Thermally reversible xyloglucan gels as vehicles for rectal drug delivery. *J. Controlled Release* 1998; 56 (1–3): 75-83.
292. Watanabe K., Yakou S., Takayama K., Isowa K., Nagai T. Rectal absorption and mucosal irritation of rectal gels containing buprenorphine hydrochloride prepared with water-soluble dietary fibers, xanthan gum and locust bean gum. *J. Controlled Release* 1996; 38 (1): 29-37.
293. Dobaria N., Mashru R., Vadia N.H. Vaginal drug delivery systems: A review of current status. *East Cent. Afr. J. Pharm. Sci.* 2007; 10: 3-13.
294. Almomen A., Cho S., Yang C.H., Li Z., Jarboe E.A., Peterson C.M., et al. Thermosensitive progesterone hydrogel: a safe and effective new formulation for vaginal application. *Pharm. Res.* 2015; 32 (7): 2266-2279.
295. Ham A.S., Nugent S.T., Peters J.J., Katz D.F., Shelter C.M., Dezzutti C.S., et al. The rational design and development of a dual chamber vaginal/rectal microbicide gel formulation for HIV prevention. *Antiviral Res.* 2015; 120: 153-164.
296. Pereira L.E., Mesquita P.M.M., Ham A., Singletary T., Deyoungs F., Martin A., et al. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Evaluation following Vaginal Application of IQB3002, a Dual-Chamber Microbicide Gel Containing the Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor IQP-0528 in Rhesus Macaques. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016; 60 (3): 1393-1400.
297. Pavelić Ž., Škalko-Basnet N., Filipović-Grčić J., Martinac A., Jalšenjak I. Development and in vitro evaluation of a liposomal vaginal delivery system for acyclovir. *J. Controlled Release* 2005; 106 (1–2): 34-43.
298. Gupta H., Malik A., Khar R.K., Ali A., Bhatnagar A., Mittal G. Physiologically active hydrogel (in situ gel) of sparfloxacin and its evaluation for ocular retention using gamma scintigraphy. *J Pharm Bioallied Sci* 2015; 7 (3): 195-200.
299. Widjaja L.K., Bora M., Chan P.N., Lipik V., Wong T.T., Venkatraman S.S. Hyaluronic acid-based nanocomposite hydrogels for ocular drug delivery applications. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2014; 102 (9): 3056-3065.

300. Fedorchak M., Cugini A., Schuman J., Little S. The Monthly Eye Drop: Development of a Long-term, Noninvasive Glaucoma Treatment System. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2013; 54 (15): 4294-4294.
301. AEMPS. Ficha técnica Tiacil Disponible en: <https://botplusweb.portalfarma.com/Documentos/2014/4/28/67331.pdf>. Fecha de consulta: 19/10/2016
302. Lee K.Y., Nakagawa T., Okano T., Hori R., Ono K., Tabata Y., et al. Novel therapy for hearing loss: delivery of insulin-like growth factor 1 to the cochlea using gelatin hydrogel. *Otol Neurotol* 2007; 28 (7): 976-981.
303. Alur H.H., Harwick J.A.H., Mondal P., Johnston T.P. Self solidifying bioerodible barrier implant. 2013. Patente: US 8501230.
304. Gotthelf L.N., Alur H.H. Clinical evaluation of a long lasting topical vehicle, TRI-726, containing ketoconazole 0.15% and hydrocortisone 1% in canine malassezia otitis externa. En: TriLogic Pharma L., editor:9.
305. TriLogic Pharma L. Ketocort Otic Disponible en: <http://www.trilogicpharma.com/ko.htm>. Fecha de consulta: 20/08/2016
306. El-Sherbiny I.M., Smyth H.D. Novel cryomilled physically cross-linked biodegradable hydrogel microparticles as carriers for inhalation therapy. *J. Microencapsul.* 2010; 27 (8): 657-668.
307. Lee J., Lee C., Kim T.H., Lee E.S., Shin B.S., Chi S.-C., et al. Self-assembled glycol chitosan nanogels containing palmityl-acylated exendin-4 peptide as a long-acting anti-diabetic inhalation system. *J. Controlled Release* 2012; 161 (3): 728-734.
308. Chen X., Zhi F., Jia X., Zhang X., Ambardekar R., Meng Z., et al. Enhanced brain targeting of curcumin by intranasal administration of a thermosensitive poloxamer hydrogel. *J. Pharm. Pharmacol.* 2013; 65 (6): 807-816.
309. Nochi T., Yuki Y., Takahashi H., Sawada S.-i., Mejima M., Kohda T., et al. Nanogel antigenic protein-delivery system for adjuvant-free intranasal vaccines. *Nat Mater* 2010; 9 (7): 572-578.
310. Kong I.G., Sato A., Yuki Y., Nochi T., Takahashi H., Sawada S., et al. Nanogel-based PspA intranasal vaccine prevents invasive disease and nasal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 2013; 81 (5): 1625-1634.
311. Sinha V.R., Khosla L. Bioabsorbable polymers for implantable therapeutic systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1998; 24 (12): 1129-1138.
312. Bagley C.A., Bookland M.J., Pindrik J.A., Ozmen T., Gokaslan Z.L., Witham T.F. Local delivery of oncogel delays paresis in rat metastatic spinal tumor model. *J Neurosurg Spine* 2007; 7 (2): 194-198.

313. Gok B., McGirt M.J., Sciubba D.M., Garces-Ambrossi G., Nelson C., Noggle J., et al. Adjuvant treatment with locally delivered OncoGel delays the onset of paresis after surgical resection of experimental spinal column metastasis. *Neurosurgery* 2009; 65 (1): 193-199.
314. DuVall G.A., Tarabar D., Seidel R.H., Elstad N.L., Fowers K.D. Phase 2: a dose-escalation study of OncoGel (ReGel/paclitaxel), a controlled-release formulation of paclitaxel, as adjunctive local therapy to external-beam radiation in patients with inoperable esophageal cancer. *Anticancer. Drugs* 2009; 20 (2): 89-95.
315. Vukelja S.J., Anthony S.P., Arseneau J.C., Berman B.S., Cunningham C.C., Nemunaitis J.J., et al. Phase 1 study of escalating-dose OncoGel (ReGel/paclitaxel) depot injection, a controlled-release formulation of paclitaxel, for local management of superficial solid tumor lesions. *Anticancer. Drugs* 2007; 18 (3): 283-289.
316. Tyler B., Fowers K.D., Li K.W., Recinos V.R., Caplan J.M., Hdeib A., et al. A thermal gel depot for local delivery of paclitaxel to treat experimental brain tumors in rats. *J. Neurosurg.* 2010; 113 (2): 210-217.
317. Elstad N.L., Fowers K.D. OncoGel (ReGel/paclitaxel) — Clinical applications for a novel paclitaxel delivery system. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009; 61 (10): 785-794.
318. Zentner G.M., Rath R., Shih C., McRea J.C., Seo M.H., Oh H., et al. Biodegradable block copolymers for delivery of proteins and water-insoluble drugs. *J. Control Release* 2001; 72 (1-3): 203-215.
319. Inc. E.P.S. Supprelin® LA Disponible en: <http://www.supprelinla.com/>. Fecha de consulta: 20/10/2016
320. Inc. E.P.S. Vantas® Disponible en: <http://www.vantasimplant.com/>. Fecha de consulta: 20/10/2016
321. Zhang L., Cao Z., Bai T., Carr L., Ella-Menye J.R., Irvin C., et al. Zwitterionic hydrogels implanted in mice resist the foreign-body reaction. *Nat. Biotechnol.* 2013; 31 (6): 553-556.
322. Sacchi V., Mittermayr R., Hartinger J., Martino M.M., Lorentz K.M., Wolbank S., et al. Long-lasting fibrin matrices ensure stable and functional angiogenesis by highly tunable, sustained delivery of recombinant VEGF164. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014; 111 (19): 6952-6957.
323. Zhang K., Shi X., Lin X., Yao C., Shen L., Feng Y. Poloxamer-based in situ hydrogels for controlled delivery of hydrophilic macromolecules after intramuscular injection in rats. *Drug Deliv.* 2015; 22 (3): 375-382.

324. Xuan J.J., Balakrishnan P., Oh D.H., Yeo W.H., Park S.M., Yong C.S., et al. Rheological characterization and in vivo evaluation of thermosensitive poloxamer-based hydrogel for intramuscular injection of piroxicam. *Int. J. Pharm.* 2010; 395 (1-2): 317-323.
325. Chacko R.T., Ventura J., Zhuang J., Thayumanavan S. Polymer nanogels: A versatile nanoscopic drug delivery platform. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2012; 64 (9): 836-851.
326. Lu S., Neoh K.G., Huang C., Shi Z., Kang E.-T. Polyacrylamide hybrid nanogels for targeted cancer chemotherapy via co-delivery of gold nanoparticles and MTX. *J. Colloid Interface Sci.* 2013; 412: 46-55.
327. Baklaushev V.P., Nukolova N.N., Khalansky A.S., Gurina O.I., Yusubalieva G.M., Grinenko N.P., et al. Treatment of glioma by cisplatin-loaded nanogels conjugated with monoclonal antibodies against Cx43 and BSAT1. *Drug Deliv.* 2015; 22 (3): 276-285.
328. Martínez-Soler G.I., Pérez-Artacho B., Sáez-Fernández E., V. G., J.L. A. Estrategias para el transporte de fármacos basadas en el efecto de permeación y retención aumentada. *ARS Pharmaceutica* 2010; 51 (3): 113-116.
329. Yim H., Park S.J., Bae Y.H., Na K. Biodegradable cationic nanoparticles loaded with an anticancer drug for deep penetration of heterogeneous tumours. *Biomaterials* 2013; 34 (31): 7674-7682.
330. Moffatt S. Nanoparticle PEGylation for Cancer Therapy. *MOJ Proteom. Bioinform.* 2015; 2 (1).
331. Naeye B., Raemdonck K., Remaut K., Sproat B., Demeester J., De Smedt S.C. PEGylation of biodegradable dextran nanogels for siRNA delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2010; 40 (4): 342-351.
332. Yadav K.S., Jacob S., Sachdeva G., Chuttani K., Mishra A.K., Sawant K.K. Long circulating PEGylated PLGA nanoparticles of cytarabine for targeting leukemia. *J. Microencapsul.* 2011; 28 (8): 729-742.
333. Zhou T., Xiao C., Fan J., Chen S., Shen J., Wu W., et al. A nanogel of on-site tunable pH-response for efficient anticancer drug delivery. *Acta Biomater.* 2013; 9 (1): 4546-4557.
334. Azadi A., Hamidi M., Khoshayand M.R., Amini M., Rouini M.R. Preparation and optimization of surface-treated methotrexate-loaded nanogels intended for brain delivery. *Carbohydr. Polym.* 2012; 90 (1): 462-471.

335. Ratner B.D., Hoffman A.S. Synthetic Hydrogels for Biomedical Applications. En: *Hydrogels for Medical and Related Applications*. American Chemical Society, 1976:1-36.
336. Nicodemus G.D., Bryant S.J. Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev* 2008; 14 (2): 149-165.
337. Bryant S.J., Durand K.L., Anseth K.S. Manipulations in hydrogel chemistry control photoencapsulated chondrocyte behavior and their extracellular matrix production. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2003; 67 (4): 1430-1436.
338. Bryant S.J., Anseth K.S. Controlling the spatial distribution of ECM components in degradable PEG hydrogels for tissue engineering cartilage. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2003; 64 (1): 70-79.
339. Hong Y., Song H., Gong Y., Mao Z., Gao C., Shen J. Covalently crosslinked chitosan hydrogel: properties of in vitro degradation and chondrocyte encapsulation. *Acta Biomater*. 2007; 3 (1): 23-31.
340. Balakrishnan B., Jayakrishnan A. Self-cross-linking biopolymers as injectable in situ forming biodegradable scaffolds. *Biomaterials* 2005; 26 (18): 3941-3951.
341. Chung C., Mesa J., Randolph M.A., Yaremchuk M., Burdick J.A. Influence of gel properties on neocartilage formation by auricular chondrocytes photoencapsulated in hyaluronic acid networks. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2006; 77 (3): 518-525.
342. Bryant S.J., Arthur J.A., Anseth K.S. Incorporation of tissue-specific molecules alters chondrocyte metabolism and gene expression in photocrosslinked hydrogels. *Acta Biomater*. 2005; 1 (2): 243-252.
343. Liu Y., Shu X.Z., Prestwich G.D. Osteochondral defect repair with autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells in an injectable, in situ, cross-linked synthetic extracellular matrix. *Tissue Eng*. 2006; 12 (12): 3405-3416.
344. Shu X.Z., Ahmad S., Liu Y., Prestwich G.D. Synthesis and evaluation of injectable, in situ crosslinkable synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2006; 79 (4): 902-912.
345. Almany L., Seliktar D. Biosynthetic hydrogel scaffolds made from fibrinogen and polyethylene glycol for 3D cell cultures. *Biomaterials* 2005; 26 (15): 2467-2477.
346. Betre H., Ong S.R., Guilak F., Chilkoti A., Fermor B., Setton L.A. Chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells in elastin-like polypeptide. *Biomaterials* 2006; 27 (1): 91-99.

347. McHale M.K., Setton L.A., Chilkoti A. Synthesis and in vitro evaluation of enzymatically cross-linked elastin-like polypeptide gels for cartilaginous tissue repair. *Tissue Eng.* 2005; 11 (11-12): 1768-1779.
348. Dadsetan M., Szatkowski J.P., Yaszemski M.J., Lu L. Characterization of photo-cross-linked oligo[poly(ethylene glycol) fumarate] hydrogels for cartilage tissue engineering. *Biomacromolecules* 2007; 8 (5): 1702-1709.
349. Kaltsas G., Tsamis C., Avula M., Tathireddy P., Cho S., Rieth L., et al. Implantable Biosensor Arrays Based On Smart Hydrogels And Piezoresistive Sensors For Continuous Metabolic Monitoring. *Procedia Eng.* 2011; 25: 1008-1011.
350. Merceron T.K., Burt M., Seol Y.J., Kang H.W., Lee S.J., Yoo J.J., et al. A 3D bioprinted complex structure for engineering the muscle-tendon unit. *Biofabrication* 2015; 7 (3): 1758-5090.
351. Reiffel A.J., Kafka C., Hernandez K.A., Popa S., Perez J.L., Zhou S., et al. High-Fidelity Tissue Engineering of Patient-Specific Auricles for Reconstruction of Pediatric Microtia and Other Auricular Deformities. *PLoS ONE* 2013; 8 (2): e56506.
352. He Y., Xue G.-h., Fu J.-z. Fabrication of low cost soft tissue prostheses with the desktop 3D printer. *Sci. Rep.* 2014; 4: 6973.
353. Kappel R.M., Puijn G.J.M. The monobloc hydrogel breast implant, experiences and ideas. *Eur. J. Plast. Surg.* 2012; 35 (3): 229-233.
354. Brunner C.A., Gröner R.W. Carboxy-methyl-cellulose hydrogel-filled breast implants – an ideal alternative? A report of five years' experience with this device. *Can. J. Plast. Surg.* 2006; 14 (3): 151-154.
355. Lee S.D. Clinical Features after Rupture of Hydrogel Breast Implants - MDbP206. *J. Korean Surg. Soc.* 2009; 76 (3): 144-148.
356. Adams T.S.T., Crook T., Cadier M.A.M. A late complication following the insertion of hydrogel breast implants. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* 2007; 60 (2): 210-212.
357. Kao B., Kadomatsu K., Hosaka Y. Construction of synthetic dermis and skin based on a self-assembled peptide hydrogel scaffold. *Tissue Eng Part A* 2009; 15 (9): 2385-2396.
358. Breger J.C., Yoon C., Xiao R., Kwag H.R., Wang M.O., Fisher J.P., et al. Self-Folding Thermo-Magnetically Responsive Soft Microgrippers. *ACS Applied Materials & Interfaces* 2015; 7 (5): 3398-3405.
359. Lopa S., Mercuri D., Colombini A., De Conti G., Segatti F., Zagra L., et al. Orthopedic bioactive implants: Hydrogel enrichment of macroporous titanium for

the delivery of mesenchymal stem cells and strontium. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2013; 101 (12): 3396-3403.

360. Hill-West J.L., Chowdhury S.M., Slepian M.J., Hubbell J.A. Inhibition of thrombosis and intimal thickening by in situ photopolymerization of thin hydrogel barriers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1994; 91 (13): 5967-5971.

361. Fischer M., Vahdatzadeh M., Konradi R., Friedrichs J., Maitz M.F., Freudenberg U., et al. Multilayer hydrogel coatings to combine hemocompatibility and antimicrobial activity. *Biomaterials* 2015; 56: 198-205.

362. Park H., Park K. Hydrogels in Bioapplications. En: *Hydrogels and Biodegradable Polymers for Bioapplications*. American Chemical Society, 1996:2-10.

363. Aulton M.E. *Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines*. Churchill Livingstone, 2007.

364. Horikoshi T., Balin A.K., Carter D.M. Effect of Oxygen on the Growth of Human Epidermal Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 1986; 86 (4): 424-427.

365. Eaglstein W.H. Occlusive dressings. *J. Dermatol. Surg. Oncol.* 1993; 19 (8): 716-720.

366. Jones V., Grey J.E., Harding K.G. Wound dressings. *BMJ* 2006; 332 (7544): 777.

367. ConvaTec. Granugel® Disponible en: http://www.convatec.co.uk/products/wound/granugel-gel/p-856bfec1-95d9-49d4-9432-85feafaf95e4/2_0008/. Fecha de consulta: 21/10/2016

368. Nephew S. Intrasite Gel® Disponible en: <http://www.smith-nephew.com/espana/productos/curacion-de-heridas/otros/desbridamiento/intrasite-gel/>. Fecha de consulta: 21/10/2016

369. Coloplast. Purilon Gel® Disponible en: <http://www.coloplast.com.ar/purilon-gel-es-ar.aspx>. Fecha de consulta: 21/10/2016

370. Shah K.R., Kydonieus A., Jamshidi K., Decker S.C., Chang T. Thermoplastic hydrogel impregnated composite material. 1996. Patente: US 5527271

371. Anjum S., Sharma A., Tummalapalli M., Joy J., Bhan S., Gupta B. A Novel Route for the Preparation of Silver Loaded Polyvinyl Alcohol Nanogels for Wound Care Systems. *Int. J. Poly. Mater.* 2015; 64 (17): 894-905.

372. Chen X.-G., Wang Z., Liu W.-S., Park H.-J. The effect of carboxymethyl-chitosan on proliferation and collagen secretion of normal and keloid skin fibroblasts. *Biomaterials* 2002; 23 (23): 4609-4614.

373. Howling G.I., Dettmar P.W., Goddard P.A., Hampson F.C., Dornish M., Wood E.J. The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Biomaterials* 2001; 22 (22): 2959-2966.
374. Taravel M.N., Domard A. Collagen and its interaction with chitosan. *Biomaterials* 1995; 16 (11): 865-871.
375. Howling G.I., Dettmar P.W., Goddard P.A., Hampson F.C., Dornish M., Wood E.J. The effect of chitin and chitosan on fibroblast-populated collagen lattice contraction. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2002; 36 (Pt 3): 247-253.
376. Kumar P.T., Lakshmanan V.K., Anilkumar T.V., Ramya C., Reshmi P., Unnikrishnan A.G., et al. Flexible and microporous chitosan hydrogel/nano ZnO composite bandages for wound dressing: in vitro and in vivo evaluation. *ACS Appl Mater Interfaces* 2012; 4 (5): 2618-2629.
377. Weng L., Romanov A., Rooney J., Chen W. Non-cytotoxic, In Situ Gelable Hydrogels Composed of N-carboxyethyl Chitosan and Oxidized Dextran. *Biomaterials* 2008; 29 (29): 3905-3913.
378. Huang X., Zhang Y., Zhang X., Xu L., Chen X., Wei S. Influence of radiation crosslinked carboxymethyl-chitosan/gelatin hydrogel on cutaneous wound healing. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2013; 33 (8): 4816-4824.
379. Mayol L., De Stefano D., Campani V., De Falco F., Ferrari E., Cencetti C., et al. Design and characterization of a chitosan physical gel promoting wound healing in mice. *J Mater Sci Mater Med* 2014; 25 (6): 1483-1493.
380. Lloyd A.W., Faragher R.G., Denyer S.P. Ocular biomaterials and implants. *Biomaterials* 2001; 22 (8): 769-785.
381. Venkatesh S., Sizemore S.P., Byrne M.E. Biomimetic hydrogels for enhanced loading and extended release of ocular therapeutics. *Biomaterials* 2007; 28 (4): 717-724.
382. Hu X., Hao L., Wang H., Yang X., Zhang G., Wang G., et al. Hydrogel Contact Lens for Extended Delivery of Ophthalmic Drugs. *Int. J. Polym. Sci.* 2011; 2011: 9.
383. Wichterle O. Method of forming color effects in hydrogel contact lenses and ophthalmic prostheses. 1972. Patente: US 3679504
384. Neefe C.W. Method of making hydrogel cosmetic contact lenses. 1984. Patente: US 4472327 A.
385. Bauman R.E., Hagmann P., Pruitt J.D., Rappon J.M. Silicone hydrogel lenses with nano-textured surfaces. 2012. Patente: WO 2012170603 A1.

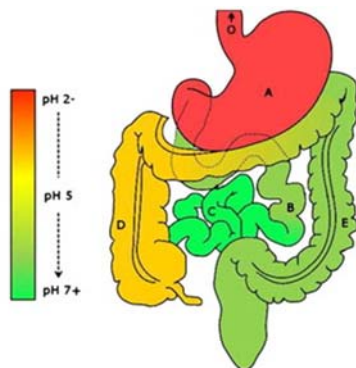
386. Kabiri K., Omidian H., Zohuriaan-Mehr M.J., Doroudiani S. Superabsorbent hydrogel composites and nanocomposites: A review. *Polym. Compos.* 2011; 32 (2): 277-289.
387. Masuda F. Trends in the Development of Superabsorbent Polymers for Diapers. En: *Superabsorbent Polymers*. American Chemical Society, 1994:88-98.
388. Sannino A., Demitri C., Madaghie M. Biodegradable Cellulose-based Hydrogels: Design and Applications. *Materials* 2009; 2 (2): 353.
389. ADM. Superabsorbents Disponible en: <http://www.adm.com/en-US/products/industrial/superabsorbents/Pages/default.aspx>. Fecha de consulta: 21/10/2016
390. Sannino A., Mensitieri G., Nicolais L. Water and synthetic urine sorption capacity of cellulose-based hydrogels under a compressive stress field. *J. Appl. Polym. Sci.* 2004; 91 (6): 3791-3796.

Capítulo 2
Hidrogeles covalentes basados en
tetraquis(hidroximetil)fosfonio

I. INTRODUCCIÓN

La vía oral es la más utilizada para la administración de fármacos debido a sus múltiples ventajas, entre ellas la comodidad y seguridad para el paciente. El tracto gastrointestinal presenta superficies de absorción y tiempos de residencia variables junto con un amplio rango de valores de pH, lo que supone un reto para el desarrollo de formas farmacéuticas pero a su vez permite diseñar estrategias para controlar la liberación de los agentes terapéuticos.

El tracto gastrointestinal se divide en tres tramos bien diferenciados morfológica y funcionalmente: el estómago, el intestino delgado y el intestino grueso. El tiempo de residencia en cada tramo, así como los valores de pH, dependen en gran medida de la presencia o no de alimentos, entre otros factores. La figura 2.1.1 recoge los valores de pH y tiempo de residencia en el tracto gastrointestinal; no obstante, estos datos no deben asumirse estrictamente ya que los valores son relativamente variables según la bibliografía consultada.¹



Letra	Región	pH	Tiempo de tránsito
A	Estómago	1-2.5 (hasta 5 con alimentos)	30-80 min
B	Int. delgado proximal	6.15-7.35	3.2 ± 1.6 h (total)
C	Int. delgado distal	6.80-7.88	
D	Colon ascendente	5.26-6.72	Muy variable, depende de las evacuaciones intestinales
E	Colon descendente	5.20-7.02	

Figura 2.I.1. Características del tracto gastrointestinal: pH y tiempo de residencia. Modificado de Cook M.T y col.²

El estudio de los factores que influyen en la absorción de los fármacos permite crear estrategias para mejorar la absorción y, por tanto, la biodisponibilidad de los mismos. Mediante la aplicación de la primera ley de Fick de difusión a la membrana intestinal, $J = P_{eff} \cdot C$, se deduce que el transporte del fármaco a través del intestino (J : cantidad que difunde por unidad de área y tiempo) es directamente proporcional a la permeabilidad efectiva del fármaco (P_{eff}) y a la concentración de éste en el lumen intestinal. Esta última, en caso de que el fármaco se administre en una forma sólida, depende de la solubilidad y de la velocidad de liberación y disolución desde la forma farmacéutica. De ello se deduce pues, que el transporte del fármaco a través del intestino es directamente proporcional a la P_{eff} y a la solubilidad de éste en el lumen intestinal (C_s).¹ La cantidad total de fármaco absorbida depende de estos dos factores mencionados (P_{eff} y C_s) y del tiempo de permanencia del activo en el lugar de absorción.

Atendiendo a dichas propiedades, en 1995 Amidon y col.³ propusieron el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (BCS) que clasifica los fármacos en cuatro grupos, esquematizados en la tabla 2.I.1.

	Alta solubilidad	Baja solubilidad
Alta permeabilidad	Clase I	Clase II
Baja permeabilidad	Clase III	Clase IV

Tabla 2.I.1. Clasificación de los fármacos según el BCS

Para fármacos clase I, en los que la solubilidad y la permeabilidad son altas, el vaciado gástrico es el paso limitante en la absorción. En los fármacos clase II, con baja solubilidad y alta permeabilidad, la solubilidad y la velocidad de disolución serán los procesos limitantes para la absorción. Para los fármacos clase III, con baja permeabilidad, ésta es el paso limitante. Por último, en los fármacos clase IV, que tienen solubilidad y permeabilidad bajas, el proceso limitante será uno u otro dependiendo del caso. Como se ha comentado, es importante conocer estas características de los fármacos a la hora de diseñar las formas farmacéuticas que los contengan. Por ejemplo, para los fármacos clase I y clase II, las FFLM pueden controlar la velocidad de liberación del activo y, por consiguiente, su biodisponibilidad.

Un fármaco se puede considerar de alta solubilidad cuando la dosis más alta empleada es soluble en 250 ml a pH entre 1 y 6.8, según la Agencia Europea del Medicamento (EMA),⁴ o a pH entre 1 y 7.5, según la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU. (FDA)⁵ a 37°C. Se requiere un estudio en, al menos, tres tampones en este rango de pH (preferiblemente a pH 1.2, 4.5 y 6.8) y es necesario que los ensayos se hagan repetidamente para cada condición de pH.⁴ Uno de los parámetros adimensionales propuestos por el BCS para caracterizar un fármaco es el número de dosis (Do). El número de dosis es la relación entre la concentración del fármaco en el lumen intestinal y la solubilidad del fármaco (ecuación 2.I.1).

$$Do = \frac{D/250}{C_s} \quad (2.I.1)$$

donde D es la dosis del fármaco, 250 es el volumen de agua en ml con que se administra la dosis al paciente (usualmente un vaso de agua) y C_s es la solubilidad del fármaco.

La permeabilidad efectiva (P_{eff}) es la capacidad de la mucosa intestinal para permitir que las moléculas de una sustancia la atraviesen. Un fármaco se considera de alta permeabilidad cuando su grado de absorción (fracción oral absorbida) es igual o mayor al 85% según la EMA⁴ o al 90% según la FDA.⁵ La determinación de esta propiedad se puede realizar por estudios de balance de masas o comparación con una dosis intravenosa de referencia.⁵ No obstante, existen métodos alternativos igualmente válidos, como métodos de perfusión *in vivo* en humanos, métodos *in vivo*, *in situ* e *in vitro* en animales o el modelo *in vitro* a través de monocapas de células epiteliales cultivadas. Con estos métodos se clasifica un fármaco como altamente permeable cuando su permeabilidad es igual o mayor que la de un estándar interno con alta permeabilidad. La FDA sugiere una lista de fármacos que pueden ser usados como modelo;⁵ entre ellos se encuentra el metoprolol, que ha sido ampliamente usado como referencia para clasificar los fármacos según su permeabilidad.⁶

Quimioterapia oral

Actualmente la vía intravenosa es la más empleada para la administración de agentes antitumorales; no obstante, la quimioterapia oral es una alternativa prometedora y uno de los grandes retos del tratamiento antitumoral, aunque sólo está disponible para un limitado número de fármacos. A diferencia de la administración intravenosa, que produce concentraciones sistémicas altas tras la administración y concentraciones por debajo del umbral terapéutico al final del intervalo de dosificación, la quimioterapia oral puede proporcionar a las células tumorales una exposición sostenida con concentraciones de fármaco más bajas, lo que implica menores efectos adversos y, en muchos fármacos, una mayor eficacia. De hecho, se sabe que generalmente el efecto terapéutico es mayor cuando las células cancerosas están expuestas durante largo periodo de tiempo a bajas concentraciones de fármaco que cuando el fármaco se administra de forma pulsátil a altas dosis.⁷ La quimioterapia oral es especialmente útil en el caso de fármacos cuya eficacia requiera exposiciones prolongadas de las células al fármaco (como los inhibidores de la topoisomerasa 1 o las fluoropirimidinas) o en los antitumorales que se toman diariamente durante meses o años (como los inhibidores de la señal de transducción y los antiangiogénicos), a diferencia de otros fármacos que se aplican en tiempos cortos y se dosifican bien por vía intravenosa (los citotóxicos antiproliferativos convencionales).⁸ Además de la posibilidad de mejorar la eficacia

y reducir la toxicidad, la quimioterapia oral reduce el coste de administración (número de visitas al hospital, equipos de perfusión y personal sanitario), flexibiliza el horario de dosificación, permite la autoadministración ambulatoria (si bien es necesario educar y concienciar al paciente en este aspecto) y es más cómoda para los pacientes (ya que evita venopunciones y los problemas derivados de los catéteres venosos), lo que redundaría en una mejora de la calidad de vida.^{8,9}

Algunos de los agentes que se utilizan en el tratamiento quimioterapéutico oral incluyen topotecan, tamoxifeno, metotrexato, etopósido, busulfán, bexaroteno, capecitabina, clorambucilo, ciclofosfamida, estramustina, fludarabina, hidroxycarbamida, idarubicina, lomustina, melfalán, mercaptopurina, mitotano, procarbazona, temozolomida, tioguanina, treosulfán, vinorelbina, dasatinib, erlotinib, imatinib, sorafenib, sunitinib, entre otros.^{10,11} Para la formulación de estos agentes terapéuticos se deben tener en cuenta las características biofarmacéuticas (solubilidad y permeabilidad) así como la velocidad de liberación y disolución a partir de las formas farmacéuticas para obtener perfiles plasmáticos adecuados.

Algunos ensayos clínicos han demostrado que la quimioterapia oral presenta menor toxicidad para el paciente y resultados clínicos comparables o incluso mejores que la administración intravenosa.¹² Por ejemplo, el topotecan vía oral obtuvo mejores tasas de respuesta y una supervivencia media mayor en pacientes con recaídas de cáncer de pulmón de células pequeñas, en comparación con los pacientes tratados por vía intravenosa; la dosificación oral se toleró mejor y se produjo menor incidencia de neutropenia severa.^{13,14}

La camptotecina (CPT) es un alcaloide citotóxico aislado a partir de extractos de *Camptotheca acuminata* y está considerada uno de los compuestos antitumorales más potentes conocidos, con un amplio espectro de citotoxicidad en varias líneas de células tumorales. La CPT inhibe la topoisomerasa 1 (Top1) que es una enzima celular que interviene en el relajamiento de la doble hélice de ADN, facilitando la transcripción, replicación y reparación del mismo. Esta enzima se encuentra presente en todas las células, especialmente en las células quiescentes y en las proliferativas. Por ejemplo, en las células tumorales de colon los niveles de Top1 son de 5 a 16 veces mayores que en las células sanas de colon.¹⁵ La Top1 alivia la tensión de torsión de la doble hélice de ADN rompiendo de forma transitoria una de las cadenas de la doble hélice, formando un complejo Top1-ADN; en ese momento la

cadena complementaria se relaja y se recompone el enlace fosfodiéster por religación entre las dos cadenas, liberándose la enzima (figura 2.1.2. a).¹⁶

La actividad citotóxica de la CPT se basa en la formación de un complejo no covalente y reversible formado por Top1-ADN-CPT, llamado complejo ternario. La inhibición o “envenenamiento” de la Top1 se caracteriza por la persistencia del alcaloide en estabilizar el complejo ternario durante la fase S del ciclo celular (fase de replicación del ADN), impidiendo la religación de las hebras, lo que causa daños irreversibles en la célula y provoca su apoptosis final (figura 2.1.2. b).¹⁷ Debido a que se trata de un fármaco específico de ciclo celular (fase S) y que la unión de éste al complejo Top1-ADN es reversible, se requiere una exposición prolongada para alcanzar su eficacia óptima.¹⁸ Por lo tanto, concentraciones plasmáticas sostenidas obtenidas mediante sistemas de liberación prolongada asegurarían la eficacia terapéutica de la CPT.

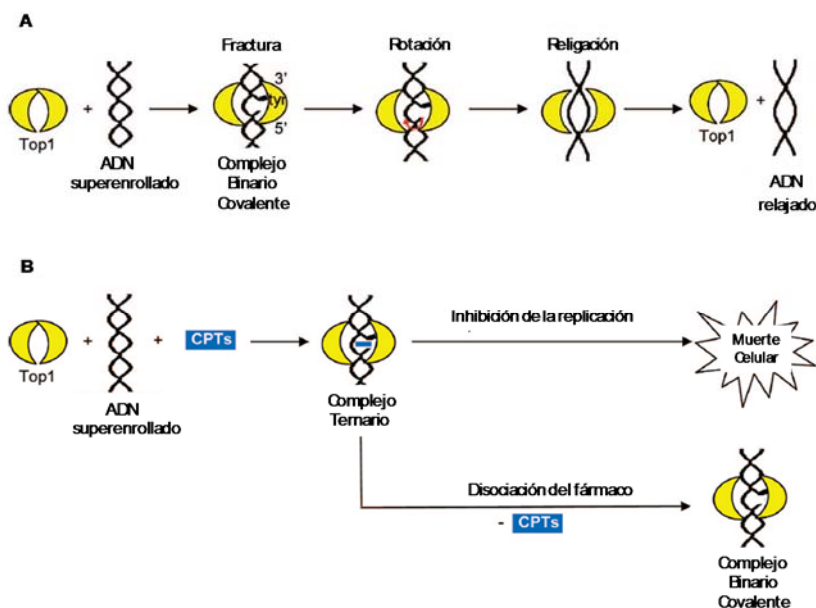


Figura 2.1.2. (a) Proceso de relajación del ADN superenrollado por la Top1. (b) Mecanismo de acción de la CPT (tomado de Rodríguez Berna, G.¹⁹)

A pesar de tratarse de un antitumoral potente y de amplio espectro, el potencial terapéutico de la CPT es limitado debido a su baja solubilidad acuosa y a la rápida inactivación a la forma carboxilato farmacológicamente inactiva, debido a la

hidrólisis de lactona a pH neutro o básico (figura 2.1.3); la conversión de la lactona a carboxilato es un equilibrio dependiente del pH.²⁰ La forma carboxilato, con elevada solubilidad en agua y estable a pH fisiológico, presenta mínima actividad terapéutica con altos grados de toxicidad; sin embargo, la forma de lactona, insoluble en agua y estable a pH ácido, presenta valores de inhibición tumoral *in vitro* exclusivos de unos pocos antitumorales conocidos. Para tratar de mejorar los problemas de solubilidad e inestabilidad se han utilizado diferentes estrategias: conjugarla con polímeros,^{21, 22} encapsularla en micelas poliméricas,²³ en nanofibras de polímeros anfifílicos²⁴ o en hidrogeles,²⁵ entre otros.

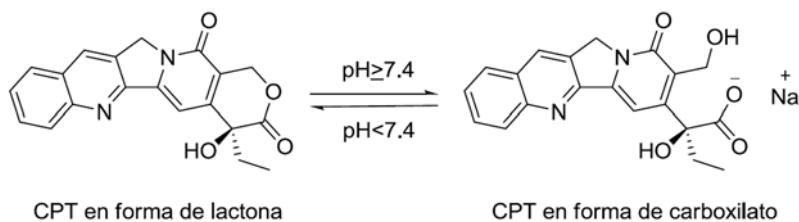


Figura 2.1.3. Equilibrio de la CPT dependiente del pH

La administración oral de las camptotecinas ha sido explorada tanto por razones prácticas como por aspectos farmacológicos. Además de ser la vía de elección para todo tipo de fármacos, en el caso de la CPT, la especificidad sobre la fase S del ciclo celular ha demostrado verse favorecida por una dosificación del fármaco continua y prolongada propia de este tipo de administración. De igual manera, el pH gástrico favorece la configuración de lactona frente a la estructura de carboxilato del fármaco, lo que reduce su inactivación.²⁶

Un estudio de biodisponibilidad del fármaco marcado con tritio y administrado por distintas vías en ratones²⁷ puso de manifiesto que el ratio de acumulación del fármaco en tumor frente al remanente en sangre se mantuvo mayor a la unidad (>1) durante más tiempo en la administración oral que en la intravenosa, para la que se obtuvo una reducción de este ratio al cabo de las 3 horas tras la administración.

Los hidrogeles son una buena alternativa para administrar la CPT por vía oral debido a varias razones. En primer lugar, ofrecen la posibilidad de solubilizar fármacos hidrófobos en un sistema compuesto por macromoléculas de alto peso molecular, lo que impide que dicho sistema sea absorbido en el intestino y llegue a

circulación sistémica. Además, la estructura tridimensional y porosa de los hidrogeles permite encapsular el agente antitumoral en el interior, permitiendo la protección del fármaco del medio ambiente y a su vez protegiendo la mucosa intestinal de sus efectos nocivos. Otra de las ventajas de los hidrogeles como sistemas de liberación modificada es la obtención de perfiles de liberación sostenida que suministran concentraciones continuas y prolongadas en el sitio de absorción. Esto es especialmente ventajoso en el caso de la CPT, ya que se ha descrito que a bajas concentraciones la difusión pasiva constituye una fracción minoritaria en el transporte de dicha molécula, siendo éste predominantemente un proceso activo mediado por transportadores.^{26, 28} Esto implica que a concentraciones altas de CPT se saturarían los transportadores, limitando la absorción del fármaco y disminuyendo la biodisponibilidad. Por último, otra de las posibilidades de los hidrogeles es crear sistemas mucoadhesivos que aumenten el tiempo de retención en el tracto gastrointestinal, permitiendo prolongar la liberación del activo en el lugar de absorción.

Los hidrogeles se han descrito en la bibliografía como una estrategia para la administración de diversos agentes antitumorales. Peppas y col.^{11, 12, 29} desarrollaron NHs de ácido metacrílico y etilenglicol cargados con bleomicina, en los que los polímeros se estabilizaron mediante enlaces de hidrógeno a pH ácido mientras que a valores de pH superiores estos enlaces se rompen y el hidrogel se hincha liberando el fármaco. También se han propuesto nanopartículas poliméricas de ácido metacrílico y etilenglicol con poli(metilmetacrilato) para el tratamiento oral del cáncer de colon con doxorubicina.³⁰

Otra estrategia es incorporar el antitumoral hidrófobo en micelas con macromoléculas de peso molecular relativamente elevado, lo que evita su absorción a circulación sistémica.⁷ Bromberg y col. han formulado microgeles de Pluronic con ácido poliacrílico para la administración de antitumorales vía oral; estos microgeles tienen cadenas colgantes de Pluronic dentro de cada partícula que son capaces de disponerse en agregados tipo micela a temperatura corporal. Los agregados micelares intra-gel solubilizan fármacos hidrófobos como el paclitaxel, mientras que los grupos carboxilo permiten cargar fármacos catiónicos.^{31, 32} Este sistema no se puede administrar de forma intravenosa debido a su tamaño (diámetro en estado hinchado 50-200 μm) pero son sistemas antitumorales muy potentes vía oral ya que

permiten cargar uno o varios fármacos como acetato de megestrol,³³ paclitaxel y doxorubicina.⁷

Como se ha explicado en la “Introducción general”, los hidrogeles pueden estar formados por enlaces químicos (covalentes) o físicos; los hidrogeles formados por enlaces covalentes ofrecen mejores propiedades mecánicas y mayor estabilidad frente a la disolución, incluso en condiciones extremas de pH. Se han usado distintas moléculas bifuncionales para entrecruzar los polímeros, incluyendo dialdehídos, diglicidil-éteres, diisocianatos, diacrilatos, etc. Sin embargo, la mayor parte de los agentes de reticulación utilizados hasta ahora son relativamente tóxicos o no hay datos suficientes respecto a su biocompatibilidad;³⁴ por ejemplo, uno de los reticulantes más comunes es el glutaraldehído, cuya mutagenicidad y toxicidad ha sido ampliamente descrita.^{35, 36} Esto ha supuesto un reto en la búsqueda de nuevas moléculas entrecruzadoras de menor toxicidad. La genipina se ha propuesto como agente entrecruzante que reacciona con grupos amino primarios, es biocompatible,³⁷ su citotoxicidad es 5000-10000 veces menor que la del glutaraldehído³⁸ y tiene menor velocidad de degradación que éste³⁹ aunque su coste es relativamente elevado.

El cloruro de tetraquis(hidroximetil)fosfonio (THPC), figura 2.1.4, es un compuesto organofosforado hidrosoluble y relativamente económico formado por cuatro grupos hidroximetilos unidos a un átomo de fósforo electronegativo. Este producto ya era conocido por su utilidad como agente inmovilizante, ligando orgánico en química de coordinación y retardante de llama en la industria textil para tejidos de algodón u otros tejidos celulósicos.⁴⁰ Recientemente, Heilshorn y col.⁴¹ han propuesto esta molécula como agente entrecruzante para materiales basados en proteínas. En este trabajo investigan la aplicabilidad del THPC para entrecruzar proteínas tipo elastina formando un hidrogel citocompatible capaz de encapsular células madre embrionarias y células neuronales que preservan su funcionalidad y la capacidad de diferenciarse y crecer en el interior de este sistema.

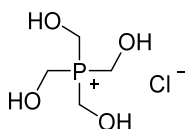


Figura 2.1.4. Estructura química del cloruro de tetraquis(hidroximetil)fosfonio (THPC)

Las hidroximetilfosfinas, como el THPC, pueden dar lugar a condensaciones de tipo Mannich en condiciones suaves con compuestos que contienen aminas primarias y secundarias, originando entrecruzamientos aminometilfosfonio mucho más estables que las iminas hidrolizables que se forman por acoplamiento de aldehídos. Además, debido a la tetrafuncionalización del THPC, su alta reactividad en medio acuoso y su baja toxicidad (por la demostrada citocompatibilidad) se consideró la posibilidad de realizar la reticulación de polímeros aminados en presencia de fármacos (que no presenten aminas primarias ni secundarias en su estructura) obteniendo, de esta forma, hidrogeles con alto grado de reticulación y alta encapsulación de fármacos, utilizando cantidades moderadas de agente entrecruzante.

II. OBJETIVOS / OBJECTIVES

Objetivos

Los objetivos de este trabajo de investigación han sido los siguientes:

- Clasificar la camptotecina según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico con objeto de determinar su adecuación para ser administrado por vía oral a través de un sistema de liberación modificada.
- Desarrollar un sistema de liberación de fármacos que permita la liberación modificada de la camptotecina por vía oral, basado en el entrecruzamiento covalente de quitosán con cloruro de tetraquis(hidroximetil)fosfonio.

Para lograr dichos objetivos se han realizado las siguientes actividades:

- Estudiar la solubilidad a distintos valores de pH y la permeabilidad *in situ* e *in vitro* de la camptotecina.

- Elaborar formulaciones basadas en quitosán y cloruro de tetraquis(hidroximetil)fosfonio en distintas proporciones.
- Caracterizar la estructura y la capacidad de hinchamiento de los hidrogeles obtenidos.
- Determinar la toxicidad y citocompatibilidad de estos sistemas en cultivos celulares Caco-2.
- Estudiar su mucoadhesividad en el sistema gastrointestinal *in vitro* e *in vivo*.
- Estudiar los perfiles de liberación del fármaco incorporado en los hidrogeles.

Objectives

The objectives of this research work have been the following:

- To classify camptothecin according to the Biopharmaceutical Classification System in order to determine its suitability for orally administration through a modified release system.
- To develop a drug delivery system that would allow oral modified release of camptothecin, based on chitosan covalently crosslinked with tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium chloride.

To achieve these objectives the following activities have been carried out:

- To study the solubility of camptothecin at different pH values and its *in situ* and *in vitro* permeability.
- To elaborate formulations based on chitosan and tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium chloride in different proportions.
- To characterize the structure and the swelling capacity of the obtained hydrogels.
- To determine the toxicity and cytocompatibility of these systems in Caco-2 cell cultures.
- To study hydrogels mucoadhesivity in the gastrointestinal system *in vitro* and *in vivo*.
- To study the release profiles of the drug incorporated inside the hydrogels.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

Los materiales usados en este trabajo de investigación han sido los siguientes: quitosán de bajo peso molecular (BPM, grado de desacetilación (GD) = 83% y PM = 50-190 kDa), quitosán de medio peso molecular (MPM, GD = 81%, PM = 190-310 kDa), quitosán de alto peso molecular (APM, GD = 95.8%, PM = 310-375 kDa), 20-(*S*)-Camptotecina (CPT), metoprolol, *N*-metil-2-pirrolidona (NMP), dimetilsulfóxido (DMSO), cloruro de tetraquis(hidroximetil)fosfonio (THPC), NaCl, NaH₂PO₄·2H₂O, kit de citocompatibilidad/viabilidad LIVE/DEAD® y bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) obtenidos de Sigma-Aldrich. Otros reactivos y materiales: agua ultrapura (sistema Millipore QPAK), agua destilada; Eutanax® (suministrado por SEA-UMH). HBSS (Hank's Balanced Salt Solution), HEPES, penicilina G, estreptomycin, suero bovino fetal, DMEM Glutamax, PBS y tripsina-EDTA han sido adquiridos en GIBCO.

2. Fármaco estudiado: camptotecina

El fármaco empleado en este capítulo fue la 20-(S)-Camptotecina, cuya estabilidad, solubilidad y permeabilidad se estudiaron para determinar su idoneidad como molécula para la evaluación de sistemas de liberación controlada tipo hidrogel.

2.1. Cuantificación del fármaco en las muestras

Para el análisis de las concentraciones de CPT se empleó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa con detección por fluorescencia. El sistema cromatográfico utilizado ha sido un Sistema Alliance® HPLC, que consta de los siguientes módulos:

- Módulo de Separaciones Waters™ 2695 compuesto por una bomba cuaternaria e inyector automático integrado.
- Detector programable de fluorescencia Waters™ 2475.
- Registrador-integrador Empower™.

En cuanto a las condiciones cromatográficas, se utilizó una fase estacionaria reversa compuesta por:

- Precolumna Phenomenex® KJ0-4282 con dos filtros de 2 µm y relleno con micropartículas C18 de 40 µm de tamaño (Phenomenex AJO-4287, C18 4 x 3.0 mm).
- Columna de acero inoxidable Waters™ modelo Nova Pak® C18 de 150 mm de longitud, 3.9 mm de diámetro y tamaño de partícula de 4 µm.

Se trabajó con un método isocrático a velocidad de flujo 1 ml/min y con temperatura de columna de 30°C. La fase móvil fue una mezcla en proporción volumétrica 70:30 de solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0.05% y acetonitrilo. Todos los componentes de la fase móvil fueron filtrados mediante un filtro Millipore tipo HNWP de nylon de 0.45 µm de diámetro de poro antes de añadirse al sistema cromatográfico para eliminar posibles partículas en suspensión. La detección de la fluorescencia se realizó con una longitud de onda de excitación de 363 nm y de emisión de 550 nm. En estas condiciones el tiempo de retención del compuesto ensayado fue de 2 minutos.

Para la determinación de la concentración de compuesto en las muestras se parte de la premisa de que el área del cromatograma es proporcional a la cantidad de compuesto presente en dicha muestra.

Para establecer la concentración de compuesto en las muestras se construyeron curvas de calibración, siendo necesario establecer la linealidad del modelo, la precisión y exactitud del método analítico y los límites de detección y cuantificación.

Respecto al ensayo de linealidad, se realizó una regresión lineal entre las áreas de los cromatogramas obtenidos y las concentraciones teóricas mediante el Excel. Para comprobar la dependencia lineal de las rectas se utilizó el coeficiente de determinación, r^2 . Cuanto más próximo esté r^2 a la unidad, mejor es el modelo. El coeficiente de determinación de la curva de calibración fue superior a 0.999.

Para comprobar la precisión y exactitud del método analítico se valoraron muestras patrón de concentración conocida dentro de la recta de calibración. Se calculó la exactitud para cada concentración patrón utilizando los errores absolutos y relativos, cuyas expresiones matemáticas se describen a continuación (ecuaciones 2.III.1 y 2.III.2):

$$\varepsilon_{\text{absoluto}} = C_{\text{teórica}} - C_{\text{experimental}} \quad (2.III.1)$$

$$\varepsilon_{\text{relativo}} = \frac{C_{\text{teórica}} - C_{\text{experimental}}}{C_{\text{experimental}}} \cdot 100 \quad (2.III.2)$$

donde $C_{\text{teórica}}$ corresponde a la concentración teórica del patrón y $C_{\text{experimental}}$ corresponde a la concentración calculada mediante la interpolación en la recta de calibración. En este caso, el error relativo fue siempre menor del 10%.

La precisión se calculó mediante el coeficiente de variación de la media de los valores de las concentraciones estimadas. El estudio de precisión reflejó que los coeficientes de variación de todos los puntos de la recta fueron menores del 10%.

Los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) se establecieron de acuerdo con las siguientes expresiones (ecuaciones 2.III.3 y 2.III.4):

$$LD = \frac{3.3 \cdot \sigma}{m} \quad (2.III.3)$$

$$LC = \frac{10 \cdot \sigma}{m} \quad (2.III.4)$$

en las que σ es la desviación estándar de la ordenada en el origen de la recta de regresión y m es la pendiente de la misma.

Las concentraciones de las muestras cuantificadas fueron siempre superiores a los límites de detección y cuantificación.

Por todo ello, el método analítico empleado en este trabajo es suficientemente selectivo y sensible para la correcta cuantificación de CPT.

2.2. Estabilidad del fármaco

Para determinar la estabilidad de las muestras tras su obtención y, por tanto, las condiciones de trabajo óptimas, se valoró la influencia del pH y la temperatura de almacenamiento de las muestras sobre dicha estabilidad.

Se preparó una solución de CPT de concentración conocida a cuatro valores de pH (1.2, 4.5, 6.8, 7.5) y se mantuvieron a distintas temperaturas para evaluar su estabilidad (-20°C, 4°C, 25°C, 37°C). A tiempos prefijados estas muestras se cuantificaron mediante HPLC y se estudiaron las cinéticas que rigen el proceso de degradación del fármaco. Cada una de las condiciones se estudió por triplicado. La tabla 2.III.1 recoge los tiempos de muestreo para cada temperatura estudiada.

Tª (°C)	Tiempo (días)
-20	0, 2, 3, 8, 30, 90, 180
4	0, 0.33 (8 h), 1, 2, 3, 8, 30, 90, 180
25	0, 0.33 (8 h), 1, 2, 3, 8, 15
37	0, 0.33 (8 h), 1, 2, 3, 4

Tabla 2.III.1. *Tiempos de muestreo en función de las condiciones de almacenamiento*

Los datos de concentración-tiempo se ajustaron a las cinéticas de degradación más habituales para establecer el orden de la reacción de degradación y estimar el periodo de validez (T_{90}). En la tabla 2.III.2 se muestran las ecuaciones que rigen las cinéticas de orden cero, orden uno y orden dos.

Orden	Ecuación	Unidades de k	
Orden cero	$C = C_0 - k_0 t$	k_0 (mg/ml· d)	(2.III.5)
Orden uno	$C = C_0 \cdot e^{-k_1 t}$	k_1 (d ⁻¹)	(2.III.6)
Orden dos	$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_0} + k_2 t$	k_2 (ml· d/mg)	(2.III.7)

Tabla 2.III.2. Ecuaciones descriptivas de las cinéticas de degradación más habituales

En estas ecuaciones, C representa las concentraciones remanentes a cada tiempo, t, C₀ es la concentración inicial y k_x es la constante de degradación correspondiente de cada orden (x = 0, 1, 2).

El ajuste se realizó mediante una hoja de cálculo Excel por regresión lineal; como parámetro de bondad se utilizó el coeficiente de determinación, r². Para determinar si la relación observada concentración-tiempo se debe al azar se calculó la estadística F.

El periodo de validez, T₉₀, es el tiempo en el cual la concentración remanente es el 90% de la inicial; se estima como el límite inferior del intervalo de confianza del 95% (p = 0.05). Las ecuaciones que rigen su cálculo (recogidas en la tabla 2.III.3) dependen del modelo cinético de degradación.

Orden	Ecuación	Unidades de T ₉₀	
Orden cero	$T_{90} = 0.1 \cdot \frac{C_0}{k_0}$	ml/mg·d	(2.III.8)
Orden uno	$T_{90} = \frac{-\ln 0.9}{k_1}$	d ⁻¹	(2.III.9)
Orden dos	$T_{90} = 0.11 \cdot \frac{1/C_0}{k_2}$	d·ml/mg	(2.III.10)

Tabla 2.III.3. Ecuaciones del periodo de validez en función de la cinética de degradación

2.3. Clasificación biofarmacéutica de la camptotecina

El estudio de la solubilidad y permeabilidad del fármaco ha permitido su clasificación en el marco del Sistema de Clasificación Biofarmacéutico.

2.3.1. Solubilidad

Con la finalidad de calcular el número de dosis (D_0) se determinó la concentración de saturación de la CPT a 37°C a los siguientes pHs: 1.2, 4.5, 6.8 y 7.5.

El ensayo se realizó en tubos Pyrex de 12 ml de cierre hermético con tapón recubierto de teflón donde se colocó la CPT en exceso y se le agregó el medio de pH correspondiente. Los tampones cloruro (pH 1.2), acetato (pH 4.5) y fosfato (pH 6.8 y 7.5) se prepararon según lo establecido en la Farmacopea Europea. Los tubos con el fármaco y el medio se agitaron durante 3 minutos en un vórtex (Genic 2 Scientific Industries) y a continuación se introdujeron en un agitador orbital termorregulado (Stuart orbital incubator SI50) a 37°C programado a 100 movimientos oscilantes por minuto. El estudio se realizó por triplicado para cada pH.

A lo largo del ensayo se comprobó la presencia de sólido no disuelto con el fin de garantizar que la solución se encontrara en condiciones de saturación. El pH de las soluciones se midió durante el ensayo (pHmetro Crison pH-Meter Basic 20+), no requiriendo ningún ajuste. La toma de muestras se realizó a los tiempos prefijados (15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h y 24 h) y se centrifugaron a 8000 rpm durante 20 minutos. Del sobrenadante se tomó un volumen concreto que fue diluido para evitar la precipitación del fármaco durante la cuantificación. La dilución fue realizada con la misma solución donde se realizó el ensayo de solubilidad de la muestra correspondiente. Para la cuantificación de cada muestra se utilizó el método de HPLC descrito para la CPT y el cálculo de solubilidad fue realizado en Excel por interpolación de los valores de área obtenidos para cada muestra en la curva de calibrado.

2.3.2. Permeabilidad *in vitro*

Los estudios de permeabilidad *in vitro* se realizaron en monocapas celulares de carcinoma de colon humano, Caco-2. Se determinó la permeabilidad apical-basolateral de la CPT en un rango de concentraciones de 5 a 50 μM y del metoprolol

a 100 μM como referencia de permeabilidad. El ensayo se realizó en 4 grupos en función de la solución administrada: CPT 5, 10 y 50 μM y metoprolol 100 μM .

A. Soluciones de trabajo

a) Medios de cultivo

El medio de cultivo se prepara a partir de diferentes soluciones de nutrientes. Tiene que mantenerse estéril para evitar contaminaciones de las células, y a una temperatura entre 2 y 8°C. La composición del medio de cultivo de la línea celular Caco-2 es la siguiente:

Hepes.....	5 ml
Penicilina G (10 ⁴ uds/ml) - Estreptomicina (10 ⁴ $\mu\text{g}/\text{ml}$).....	5 ml
Suero bovino fetal.....	50 ml
DMEM Glutamax.....	450 ml

b) Soluciones para el pase

PBS: solución salina tamponada con fosfatos; se utiliza para el lavado de la monocapa y la eliminación de los residuos de suero.

Tripsina-EDTA: Compuesta por 0.5% de tripsina y 0.2% de EDTA-disódico, exenta de Ca^{+2} y Mg^{+2} . Esta solución se diluye 1/5 en PBS estéril y se utiliza para separar las células de los frascos en el proceso de pase de uno a otro.

c) Soluciones para el experimento

Solución tamponada (Hank's Balanced Salt Solution, HBSS): Por cada 500 ml de HBSS se añaden 5 ml de una solución tamponada de HEPES 1 M estéril; se utiliza para lavar la monocapa antes de realizar el experimento.

Soluciones de camptotecina: Se preparó una solución 5 mM de CPT en DMSO a partir de la cual se diluyó con HBSS tamponado con HEPES para preparar las soluciones ensayadas a 5, 10 y 50 μM .

Solución de metoprolol: Esta solución 100 μM se preparó disolviendo el fármaco en HBSS tamponado con HEPES.

B. Técnicas experimentales

a) Sembrado celular

Los experimentos de permeabilidad se llevaron a cabo en monocapas celulares crecidas sobre una membrana de policarbonato de $0.4 \mu\text{m}$ de tamaño de poro y con una superficie de 4.2 cm^2 . Estas membranas constituyen la base de un receptáculo denominado inserto que se sitúa en el interior de los pocillos de las placas de cultivo. La colocación de los insertos en los pocillos forma dos cámaras separadas de diferente capacidad, denominadas cámara apical y cámara basal (figura 2.III.1). En la base de los insertos se siembran las células Caco-2 y se mantienen con los nutrientes necesarios en condiciones adecuadas de cultivo.

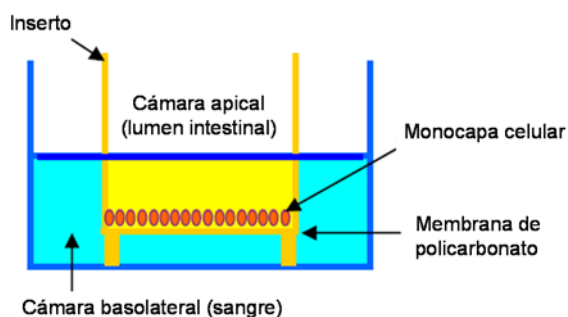


Figura 2.III.1. Esquema de los componentes de un pocillo con inserto para el cálculo de la permeabilidad *in vitro*

Los experimentos se realizaron a los 21 días de la siembra, pues se considera que a ese tiempo ya se han expresado los transportadores de membrana, sin llegar a manifestarse fenómenos de envejecimiento celular.

b) Ensayo de permeabilidad

Previamente a la realización del ensayo se lavan las membranas con una solución tamponada y se mide la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) con un micropolímetro Millicell-ERS®. Esta medida se realiza en tres direcciones para asegurar la integridad de la monocapa en toda la superficie del inserto. Para considerar adecuada la integridad de la monocapa, las medidas de la resistencia en los insertos con crecimiento celular deben ser superiores a las medidas del blanco en 90 o más unidades. En caso de que la medida no cumpla con el requerimiento establecido, se desecha el inserto.

Tras la medición de la TEER las placas se dejan reposar en el incubador a 37°C durante una hora antes de empezar el experimento. Después de la toma de muestras y antes del estudio de recuperación del compuesto, se repite esta medida para comprobar que la integridad de la monocapa no se ha visto afectada durante el experimento.

El estudio de permeabilidad se realizó en dirección apical-basal en placas de 6 pocillos, usando 3 pocillos por cada solución ensayada. Para ello se sustituye la solución tamponada del compartimento apical por la solución de estudio atemperada (CPT 5, 10, 50 μM o metoprolol 100 μM).

La duración del ensayo depende de la velocidad de transporte de cada compuesto. En este caso, los estudios se realizaron en un período total de 90 minutos tomando muestras en el compartimento receptor a los 15, 30, 60 y 90 minutos, y en el compartimento dador a tiempo 0 y a los 90 minutos. Después de tomar cada muestra (200 μl) en el compartimento receptor se repone el volumen con la solución tamponada.

Durante el ensayo de permeabilidad el fármaco pasa del compartimento dador al receptor a través de la membrana celular, por lo que es posible que una parte de éste quede retenido en el interior de las células o adherido a estructuras subcelulares. Por ello, una vez finalizada la toma de muestras y medida la TEER, se realiza el estudio de recuperación del compuesto. El objetivo de este ensayo es comprobar que se cumple el balance de masas, de modo que se asegura que el compuesto no se haya degradado o metabolizado.

El estudio de recuperación del compuesto retenido en las células consta de dos fases:

Congelación-descongelación rápida: las membranas con las monocapas celulares se extraen, se resuspenden en una solución tamponada y congelan-descongelan en nitrógeno líquido tres veces consecutivas. Finalmente, los tubos se centrifugan durante 3 min a 1500 rpm y se toma una muestra de 500 μl .

Adición de metanol: en los tubos con las membranas, que contienen 500 μl de solución tamponada, se añaden 500 μl de metanol y se agitan enérgicamente. Después se centrifugan los tubos 8 min a 8000 rpm y se toma una muestra de 500 μl .

La suma de la cantidad de compuesto retenido y el presente en ambas cámaras (dador y receptor) en las muestras del último tiempo debe corresponder con la cantidad de compuesto de la muestra obtenida a tiempo 0.

C. Cálculo de la permeabilidad

El proceso de absorción desde el compartimento dador al receptor puede describirse como una difusión pasiva mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{\partial Q}{\partial t} = P_{eff} \cdot S \cdot (C_d - C_r) \quad (2.III.11)$$

donde $\partial Q/\partial t$ representa la velocidad de difusión del fármaco, P_{eff} es el coeficiente de permeabilidad efectiva, S es el área de difusión y C_d es la concentración de fármaco en el compartimento dador y C_r es la concentración en el compartimento receptor.

Si durante el experimento la concentración en receptor es siempre menor al 10% de la concentración en dador, esto es, condiciones *sink* o condiciones sumidero, la ecuación 2.III.11 se simplifica obteniendo la siguiente expresión:

$$P_{eff} = \frac{b}{S \cdot C} \quad (2.III.12)$$

donde b es la pendiente de la recta de cantidades acumuladas frente al tiempo, S el área de la membrana y C es la concentración inicial de fármaco en el compartimento dador.

Los valores de permeabilidad obtenidos para las distintas concentraciones de CPT y el metoprolol se evaluaron mediante la prueba estadística ANOVA para muestras independientes con un nivel de confianza del 95%. Para el análisis *post hoc* posterior se seleccionó una prueba paramétrica o no paramétrica en función de la homogeneidad de las varianzas determinada por la prueba de Levene.

2.3.3. Permeabilidad *in situ*

Para estudiar la permeabilidad *in situ* se empleó la técnica de perfusión descrita por Doluisio⁴² y adaptada por Ferrando y col.⁴³ Mediante esta técnica se calculó la constante de velocidad de absorción intestinal y los valores de permeabilidad de la CPT y el metoprolol en intestino delgado y colon.

El protocolo de experimentación fue aprobado por el Comité de Ética (A1330354541263). Para los ensayos se seleccionaron ratas Wistar con 2 o 3 meses de edad con un peso comprendido entre 250 y 320 g, que se mantuvieron en perfectas condiciones de higiene y climatización y recibieron una dieta equilibrada. Los animales se dividieron en 8 grupos (n = 5) en función de la solución administrada y el tramo intestinal estudiado; esta distribución muestral se describe en la tabla 2.III.4.

Tramo intestinal	Fármaco	Concentración (μM)
Intestino delgado	Camptotecina	5
		10
		50
	Metoprolol	100
Colon	Camptotecina	5
		10
		50
	Metoprolol	100

Tabla 2.III.4. Distribución muestral en función del tramo intestinal evaluado y soluciones ensayadas

A. Soluciones de trabajo

a) Soluciones de lavado intestinal

Solución de lavado A: Se trata de una solución isotónica que permite eliminar restos de quimo o restos fecales que pudieran quedar en la luz intestinal, cuya composición es:

NaCl.....	9.00 g
KCl.....	0.34 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O.....	0.19 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O.....	0.76 g
H ₂ O destilada.....	c.s.p. 1 l

Solución de lavado B: Esta solución se usa para acondicionar la mucosa intestinal antes de realizar los ensayos de absorción. Es una solución de suero fisiológico con tampón fosfato según Sørensen a razón de 10 ml de tampón por litro de solución, regulada a pH 7.00 para intestino delgado y a pH 7.5 para colon. Su composición es:

NaCl.....	9.00 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O 1/15 M.....	3.9 ml
NaH ₂ PO ₄ 1/15 M.....	6.1 ml
H ₂ O destilada.....	c.s.p. 1 l

b) Soluciones de perfusión

Camptotecina 5, 10 y 50 µM: Para preparar las soluciones de CPT se partió de una solución 5 mM del fármaco en DMSO. A continuación se agregó gota a gota dicha solución sobre un volumen apropiado de tampón fosfato en sonicación continua para permitir su disolución, para obtener una concentración 50 µM. Las restantes concentraciones, 10 y 5 µM, se prepararon por dilución de la anterior en el mismo tampón. La composición de dicha solución tampón es la siguiente:

NaCl.....	4.5 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O 1/15 M.....	3.9 ml
NaH ₂ PO ₄ 1/15 M.....	6.1 ml
H ₂ O destilada.....	c.s.p. 1 l

La composición es similar a la del líquido de lavado B pero su osmolaridad es menor ya que la presencia de DMSO en la solución de fármaco aumenta la osmolaridad y ésta se debe mantener en condiciones fisiológicas (300 mOsm) para su introducción en el lumen intestinal.

Metoprolol 100 µM: Esta solución se preparó disolviendo el fármaco en solución de lavado B.

B. Técnicas experimentales

a) Protocolo del ensayo en intestino delgado

Como se ha comentado, la técnica experimental es una modificación de la propuesta por Doluisio. Los animales se someten a un periodo de ayunas de 2 a 4 horas con agua *ad libitum* para garantizar su hidratación; a continuación, se anestesian por inyección intraperitoneal con una dosis de 40 mg/kg de una solución de pentobarbital sódico 20 mg/ml, preparada a partir del inyectable comercial Eutanax®. Tras comprobar que el animal ha alcanzado el grado de anestesia profunda necesario, se descubre la cavidad abdominal mediante sección de la piel,

desde 2 cm por encima del poro genital hasta 1 cm del apéndice xifoides y se separan los rectos abdominales cortando por la línea alba. El siguiente paso consiste en localizar el duodeno, en el que desemboca el colédoco; éste último debe ligarse para evitar que se produzca el ciclo enterohepático (el fármaco absorbido se excrete por la bilis de nuevo al intestino).

A continuación, se practica un pequeño corte en bisel en el extremo duodenal, se introduce el extremo de una cánula de vidrio acodada y se fija al intestino. El otro extremo de la cánula se conecta mediante un tubo de polietileno, a una llave de tres pasos tipo *Stopcock*. A su vez, ésta encaja a rosca con una jeringa de 10 ml de capacidad, sujeta mediante una pinza a un soporte vertical.

Posteriormente, se localiza el extremo íleo-cecal y se efectúa una incisión de forma que se proceda sin dificultad a la limpieza de la mucosa. Ésta se realiza mediante el paso por la jeringa conectada y a través del intestino de las soluciones de lavado (primero la solución A y después la B) a 37°C, tantas veces como sea necesario hasta que la mucosa quede libre de residuos y de sales biliares.

Una vez finalizado el lavado, se conecta otra cánula en el extremo final del intestino, la cual se une a su vez a una llave de tres pasos y a otra jeringa. Todo el conjunto se sujeta a un soporte vertical, con la ayuda de unas pinzas. Por último, se bombea aire a través del intestino en ambas direcciones con la finalidad de eliminar los restos de la solución de lavado B.

Un factor a considerar es la posible desecación de la cavidad abdominal. Con objeto de evitarla se vierte en ella pequeños volúmenes de suero fisiológico atemperado a 37°C y se cubre con una torunda de algodón empapada en el mismo líquido.

Una vez preparado todo el montaje experimental (figura 2.III.2) se procede al inicio del ensayo. El primer paso es perfundir 10 ml de la solución de fármaco que se va a estudiar, atemperada a 37°C, tomándose este tiempo como $t = 0$. A continuación se procede a la toma de muestras, la cual se realiza cada 5 minutos alternativamente por cada una de las jeringas; la primera muestra se toma por la jeringa distal y la última, por la proximal. Se recoge un total de 6 muestras (5, 10, 15, 20, 25 y 30 min) de 200 μ l de solución cada una.

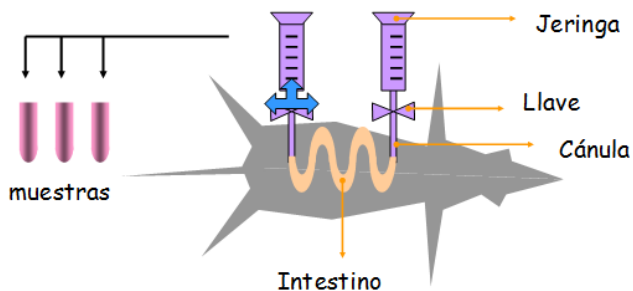


Figura 2.III.2. Esquema de la técnica de perfusión sin recirculación basada en el método de Doluisio

b) Protocolo del ensayo en colon

Mediante este ensayo se determinó la constante de velocidad de absorción y los valores de permeabilidad en colon de la CPT y el metoprolol. Las soluciones ensayadas fueron las mismas que para intestino delgado.

La técnica experimental es similar a la explicada para intestino delgado salvo algunas diferencias. El segmento intestinal que se estudió en este caso es el comprendido entre el ciego y el recto; las soluciones salinas con las que se hizo el lavado son similares al caso anterior pero con un pH de 7.5. El volumen de fármaco administrado fue 5 ml y los tiempos de tomas de muestras fueron los mismos.

c) Estudio de reabsorción de agua

Este procedimiento se realiza después de tomar la última muestra tanto en el ensayo en intestino delgado como en colon. Para ello se desconecta la cánula de la jeringa íleo-cecal (para intestino delgado) o la cánula del extremo distal del colon (en el caso del colon) y se coloca en un tubo de centrifuga de 15 ml. Con la jeringa que queda conectada, se toma aire y se ejerce presión para extraer el líquido remanente a través de la cánula. A continuación, se separa el intestino del animal y se presiona desde el principio hasta el final asegurando que se vacíe completamente, recogiendo el contenido en el tubo de centrifuga. Finalizado el ensayo, el animal se sacrifica administrando pentobarbital sódico (Eutanax®) por vía intraperitoneal a una dosis de 90 mg/kg.

El volumen recogido se centrifuga durante 10 minutos a 5000 rpm para facilitar la sedimentación de los restos de mucosa y medir el volumen del sobrenadante. Para

calcular el volumen final, se le adiciona a este valor el volumen recogido durante la toma de muestras.

C. Tratamiento de muestras

Las muestras biológicas se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante obtenido de cada muestra se congeló a -20°C hasta el momento de ser analizado para evitar la degradación del fármaco. Cada muestra se cuantificó por duplicado mediante HPLC.

D. Cálculo de la velocidad de reabsorción de agua

Se sabe que existe un proceso de reabsorción de agua simultáneo al proceso de absorción de la sustancia ensayada de modo que la solución remanente en lumen se concentra y puede quedar falseada por exceso.⁴⁴

Con el fin de estimar las concentraciones reales de compuesto se calculó el volumen remanente a cada tiempo de toma de muestra. Dado que el volumen varía según una cinética de orden cero,⁴⁴ la ecuación diferencial del proceso y su forma integrada son:

$$\frac{dV}{dt} = -k_0 \quad (2.III.13)$$

$$V = V_0 - k_0 \cdot t \quad (2.III.14)$$

siendo V el volumen remanente en el intestino a cada tiempo; V_0 , el volumen remanente a tiempo inicial y k_0 , la constante de velocidad de reabsorción de agua (ml/min).

Mediante regresión lineal por mínimos cuadrados de los volúmenes obtenidos se calculan los parámetros V_0 y k_0 , con los que se determinan los volúmenes teóricos para cada tiempo de toma de muestra (V_t). Con los V_t se corrigen los valores experimentales de las concentraciones de soluto en las muestras, con la siguiente ecuación:

$$C = E \cdot \frac{V_t}{V_0} \quad (2.III.15)$$

donde C corresponde a la concentración de soluto corregida y E , a la concentración obtenida experimentalmente.

E. Cálculo de la constante aparente de la velocidad de absorción

Las constantes aparentes de velocidad de absorción se han determinado a partir del siguiente modelo:



Figura 2.III.3. Modelo para determinar la constante aparente de absorción. Compartimento C: lugar donde se produce la absorción (intestino), k_{ap} : constante de absorción aparente

La desaparición del compuesto del compartimento C se debe únicamente a la absorción y durante los 30 min que dura el ensayo sigue una cinética aparente de orden uno según la siguiente ecuación:

$$\frac{dC}{dt} = -k_{ap} \cdot C \quad (2.III.16)$$

donde C corresponde a la concentración remanente de fármaco en el intestino y k_{ap} , a la constante de velocidad de absorción aparente de orden uno. Su forma integrada es:

$$C = C_0 \cdot e^{-k_{ap} \cdot t} \quad (2.III.17)$$

donde C es la concentración de fármaco a tiempo t y C_0 , la concentración inicial de fármaco disponible para la absorción ($t = 0$).

El valor de C_0 obtenido es siempre menor que la concentración perfundida debido a varios procesos simultáneos: dilución con el poco volumen que pudiese quedar de la solución de lavado, adsorción a la membrana intestinal y entrada rápida del compuesto en los enterocitos. El descenso de C_0 se debe mayoritariamente a la carga de la sustancia en la mucosa, cuyo equilibrio se alcanza en los primeros minutos de la perfusión y pasados 5 minutos el proceso ha finalizado totalmente. Por esta razón, la toma de muestras se inicia a ese tiempo.

Para obtener un valor representativo de la constante de velocidad de absorción, el ensayo se ha realizado en un mínimo de 5 animales para cada solución ensayada, con lo que se obtiene un valor medio que se considera representativo.

Los valores de permeabilidad obtenidos para las distintas concentraciones de CPT y metoprolol se evaluaron mediante la prueba estadística ANOVA para muestras independientes con un nivel de confianza del 95%. Para el análisis *post hoc* posterior se seleccionó una prueba paramétrica o no paramétrica en función de la homogeneidad de las varianzas determinada por la prueba de Levene.

3. Obtención de los hidrogeles

3.1. Método de formación de los hidrogeles

En primer lugar, se preparó una solución al 2% de quitosán disolviendo 2 g de polímero en 100 ml de ácido acético 0.5%. Para cada hidrogel se tomaron 2 g de quitosán al 2% (0.125 mmoles de unidades repetitivas de quitosán) y se adicionaron 0.2 ml de solución de THPC a distintas concentraciones, cuyas cantidades molares fueron 0.03, 0.05, 0.1, 0.2 mmoles, para obtener un porcentaje de entrecruzamiento (moles de THPC/moles de unidades de repetición de quitosán) de 24%, 40%, 80% y 160%, respectivamente. Esta mezcla se agitó en el vórtex unos 10 segundos, tiempo en el cual se produce la gelificación a temperatura ambiente. Los hidrogeles se lavaron con agua destilada unos segundos y finalmente se liofilizaron. Mediante dicha metodología se obtuvieron hidrogeles a partir de quitosán de distintos pesos moleculares (PM): BPM (PM = 50-190 kDa), MPM (PM = 190-310 kDa) y APM (PM = 310-375 kDa).

3.2. Método de cargado del fármaco

El cargado del fármaco se realizó simultáneamente a la formación del hidrogel. Para cada hidrogel se tomaron 2 g de quitosán al 2% y se añadieron 0.5 ml de una solución de CPT en NMP (1 mg/ml, 2.87 mM), agitándose en el vórtex durante un minuto para homogeneizar la mezcla. Finalmente, se adicionaron 0.2 ml de solución de THPC a distintas concentraciones para la formación de los hidrogeles, tal y como se describe en el apartado anterior.

3.3. Marcaje del quitosán con rodamina

Se prepararon 100 ml de solución acuosa básica de rodamina B isotiocianato (2 mM) y sobre esa solución se añadieron 100 mg de quitosán en polvo, obteniendo una dispersión del polímero en agua básica. La reacción se mantuvo en agitación vigorosa durante 10 horas, tras lo cual se filtró para retirar la solución acuosa con el

exceso de marcador. El sólido obtenido se lavó varias veces con agua/metanol y agua/etanol hasta la completa eliminación del colorante en las aguas de lavado; finalmente se secó el producto mediante liofilización. Este procedimiento se llevó a cabo para los tres lotes de quitosán de diferentes pesos moleculares: BPM, MPM y APM; dichos polímeros marcados con rodamina se renombraron de la siguiente forma: RBPM, RMPM y RAPM, respectivamente.

3.4. Nomenclatura de las muestras

Para los distintos ensayos y caracterizaciones a los que se sometieron estas formulaciones fue necesario desarrollar distintas composiciones partiendo de la metodología descrita para la formación de los hidrogeles, así se distinguen tres grupos:

- Hidrogeles base: hidrogeles compuestos únicamente por el polímero, quitosán, y el agente entrecruzante, THPC.
 - Hidrogeles con rodamina: son hidrogeles base formados a partir de quitosán marcado con rodamina.
- Hidrogeles con NMP: se trata de hidrogeles base a los que se les ha añadido el solvente NMP para estudiar la influencia de dicho compuesto en la estructura base.
- Hidrogeles con CPT/NMP: constituidos por hidrogeles base con el fármaco disuelto en NMP.

Los ensayos se han realizado a partir de los hidrogeles liofilizados, a menos que se indique lo contrario.

En la tabla 2.III.5 se resumen las nomenclaturas utilizadas para denominar a cada una de las formulaciones:

	Quitosán	Porcentaje de entrecruzamiento (THPC/quitosán)			
		24%	40%	80%	160%
Hidrogeles base	BPM	B24	B40	B80	B160
	MPM	M24	M40	M80	M160
	APM	A24	A40	A80	A160
Hidrogeles con NMP	BPM	NB24	NB40	NB80	NB160
	MPM	NM24	NM40	NM80	NM160
	APM	NA24	NA40	NA80	NA160
Hidrogeles con CPT/NMP	BPM	NB24-CPT	NB40-CPT	NB80-CPT	NB160-CPT
	MPM	NM24-CPT	NM40-CPT	NM80-CPT	NM160-CPT
	APM	NA24-CPT	NA40-CPT	NA80-CPT	NA160-CPT
Hidrogeles con rodamina	BPM				RB160
	MPM				RM160
	APM				RA160

Tabla 2.III.5. Esquema de los hidrogeles estudiados en base a su composición

4. Caracterizaciones

4.1. Análisis elemental

El análisis elemental es una técnica que proporciona información sobre el contenido total de carbono, hidrógeno y nitrógeno presente en un amplio abanico de muestras de naturaleza orgánica e inorgánica, tanto sólido como líquido.

La determinación del contenido de carbono, hidrógeno y nitrógeno de las muestras en estado sólido se llevó a cabo en un equipo LECO CHNS-932, utilizando sulfanamida como referencia.

4.2. Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente

La espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) es una técnica de análisis inorgánico elemental e isotópico capaz de determinar y cuantificar la mayoría de los elementos, ofreciendo información sobre la composición de la muestra analizada.

El contenido en fósforo se determinó disolviendo el compuesto en 3-10 ml de agua regia, diluyendo con agua bidestilada hasta 30-50 ml y midiendo la disolución en un espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente Varian 715-ES.

4.3. Análisis termogravimétrico

La termogravimetría es una técnica que mide la variación de la masa de una muestra cuando es sometida a un programa de temperatura en una atmósfera controlada. Esta técnica suministra información en distintos procesos químicos como calcinación, actividad catalítica, quimisorción, descomposición, desolvatación, hidrosopicidad, cinéticas, reacciones en estado sólido, adsorción-desorción, estabilidad térmica, etc. y si se trata de procesos exotérmicos o endotérmicos.

Los análisis termogravimétricos se realizaron en una electrobalanza Perkin-Elmer Diamond, previamente calibrada, con platino como material de referencia, y que consta de un termopar de Pt / Pt-Rh (10%). Las muestras en polvo introducidas en portamuestras de platino se calentaron en flujo de aire o argón (100 ml/min) desde temperatura ambiente hasta 900°C a una velocidad de calentamiento de 10°C/min. Antes de realizar las medidas de las muestras, se midió la línea base en un portamuestras vacío para corregir los resultados obtenidos para las formulaciones caracterizadas.

4.4. Difracción de rayos X

La difracción de rayos X en muestra policristalina permite abordar la identificación de fases cristalinas, puesto que todos los sólidos cristalinos poseen su difractograma característico. Los estudios de polimorfismo, medida del tamaño de partícula, determinación de diagramas de fase, etc. se realizan habitualmente por difracción de rayos X.

Las muestras pulverizadas se colocaron y presionaron en un portamuestras para obtener una superficie plana y uniforme. Los diagramas de difracción de rayos X se registraron utilizando un difractómetro Philips X'Pert Plus con radiación $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$, 40 kV), velocidad de barrido en el rango de 0.6° a 10.0° (2θ) por minuto, con un paso de 0.02° (2θ) y un tiempo de análisis de 5 segundos.

4.5. Microscopía de fluorescencia

La presencia de CPT encapsulada en el interior del hidrogel se comprobó visualmente analizando fragmentos del hidrogel NM160-CPT mediante un microscopio EBQ-100 con cámara digital a color Leica DFC300 FX.

4.6. Microscopía electrónica de barrido

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) proporcionan información sobre la topografía de la superficie de la muestra, la apariencia, morfología y tamaño de las estructuras formadas. Esta técnica es ampliamente usada para evaluar la estructura característica de "red" en los hidrogeles.

Para observar los cortes transversales de los hidrogeles de quitosán las muestras se adhirieron con una cinta de doble haz adhesivo sobre portamuestras cilíndricos; dichas muestras se recubrieron con una capa de Au/Pd utilizando un sputter-coat marca Polaron modelo SC7640 a una presión de vacío de 0.6 mbar y a 0.8 mA durante 120 segundos. Las imágenes se tomaron con un microscopio de barrido marca Hitachi, modelo S4800 con un voltaje de aceleración de 5 Kv y una distancia de trabajo de 8 mm.

5. Hinchamiento

La capacidad de los hidrogeles para captar agua es una característica común a todos ellos, pero depende en gran medida del tipo de hidrogel (tipo de polímero, peso molecular, tipo y porcentaje de entrecruzamiento, etc.). Los ensayos de hinchamiento se realizaron en dos partes para determinar la influencia de varios factores, como el peso molecular del quitosán, el grado de entrecruzamiento y el pH del medio.

El análisis del hinchamiento, tanto dinámico como en equilibrio, se llevó a cabo en vasos con el medio atemperado a 37°C en un baño termostatzado; las muestras se pesaron en una balanza (Acculab, Sartorius Group, Atilon, máx. 220 g, d=0.1 mg) previamente al inicio de los ensayos. Cada condición se estudió por triplicado.

En el primer ensayo se analizó la influencia del peso molecular y el grado de entrecruzamiento en el hinchamiento de los hidrogeles. Las pruebas se realizaron en un medio a pH 7.5 a 37°C durante 48 horas, tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio de hinchamiento. Al final del ensayo los hidrogeles se extrajeron del medio, su superficie se secó cuidadosamente con papel de filtro para eliminar el exceso de agua y se pesaron. El grado de hinchamiento en el equilibrio normalizado (Q_{∞}) se calculó mediante la ecuación 1.IV.2 descrita en la "Introducción general".

Los datos obtenidos para cada condición de pH y porcentaje de entrecruzamiento se compararon con la prueba estadística ANOVA de un factor con un nivel de significación $p = 0.05$ para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de Q_{∞} . Para el análisis *post hoc* se seleccionó una prueba paramétrica o no paramétrica en función de la homogeneidad de las varianzas determinada por la prueba de Levene.

En un segundo ensayo se estudió la cinética de hinchamiento y su dependencia con el pH del medio y el peso molecular del polímero. Los hidrogeles se introdujeron en distintos medios a pH 1.2, 4.5, 6.8 y 7.5 durante 48 horas a 37°C. A intervalos de tiempo determinados, se extrajeron del medio, su superficie se secó cuidadosamente con papel de filtro y se pesaron, devolviéndolos finalmente al mismo medio. El grado de hinchamiento normalizado a un tiempo t (Q_t) se calculó en términos de peso de agua por peso de hidrogel seco empleando la ecuación 1.IV.1 descrita en la "Introducción general".

Una vez obtenidos los perfiles de hinchamiento, éstos se compararon usando el cálculo del factor de similitud, f_2 . El f_2 es un parámetro matemático independiente del modelo cinético y mide la similitud entre dos curvas. La expresión matemática del f_2 es la siguiente:

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \cdot \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \cdot 100 \right\} \quad (2.III.18)$$

donde n es el número de pares de puntos que se comparan, R_t es el porcentaje de hinchamiento en la formulación que se toma de referencia a cada tiempo y T_t es el porcentaje de hinchamiento en la formulación que se compara a cada tiempo.

Para el cálculo del factor de similitud se debe emplear un número de puntos tal que incluya sólo el primer valor mayor del 85% del hinchamiento en equilibrio para cualquiera de las dos formulaciones. Si el f_2 es mayor o igual a 50 indica que las curvas son similares.

Asimismo, los datos de los perfiles se ajustaron a los modelos cinéticos de orden uno y orden dos para determinar el modelo que mejor describe la cinética de hinchamiento de los hidrogeles; las ecuaciones de ambos modelos se detallan en la

“Introducción general” (ecuaciones 1.IV.4 y 1.IV.6). El ajuste del modelo cinético se realizó mediante la herramienta Solver del Excel.

Los hidrogeles ensayados en el primer estudio a pH 7.5 fueron B24, B40, B80, B160, M24, M40, M80, M160, A24, A40, A80, A160 y en el segundo estudio a pH 1.2, 4.5, 6.8 y 7.5 fueron B40, M40, A40. Los experimentos se realizaron por triplicado.

6. Toxicidad en cultivos Caco-2

El objetivo de este ensayo fue determinar la toxicidad de los hidrogeles a través de la evaluación de la capacidad para producir muerte celular. El ensayo de MTT es un ensayo colorimétrico basado en la capacidad de las células vivas metabólicamente activas para reducir, por acción de la succinato deshidrogenasa mitocondrial, el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) de color amarillo en formazán, un compuesto insoluble que precipita en forma de cristales de color azul oscuro (figura 2.III.4). La cantidad de producto formado se puede disolver en DMSO y cuantificar por absorbancia utilizando un lector de placas de ELISA. La cantidad de cristales formados es proporcional al número de células viables existentes.

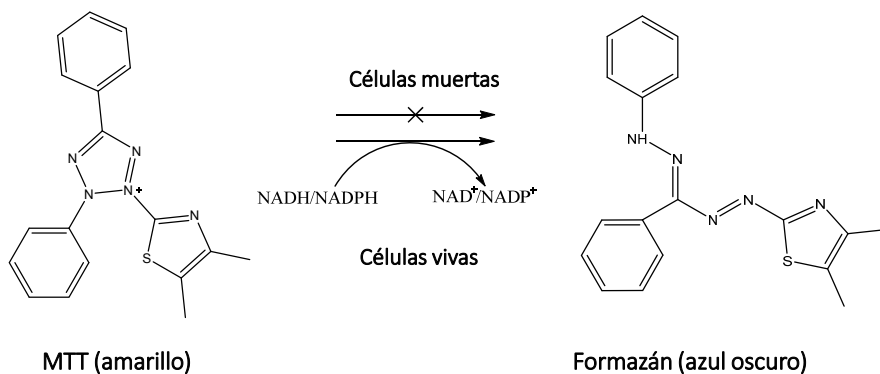


Figura 2.III.4. Esquema del fundamento del ensayo colorimétrico con MTT

Para considerar válido este estudio, las células tienen que estar en fase de crecimiento exponencial durante todo el experimento, y los valores de absorbancia obtenidos al disolver los cristales deben encontrarse dentro del rango adecuado para poder aplicar la ley de Lambert-Beer (ecuación 2.III.19):

$$A = \varepsilon \cdot C \cdot l \quad (2.III.19)$$

donde A es la absorbancia, ε es el coeficiente de extinción molar, C es la concentración del compuesto ensayado, y l es la longitud del paso de la luz a través de la muestra.

Los hidrogeles ensayados fueron M24, M40, M80, M160 que tras la liofilización se molturaron y dispersaron en PBS (5 mg/ml). Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos de fondo plano con una densidad de 25000 células por pocillo. Las células se sembraron en el fondo del pocillo y se cultivaron en condiciones estándar; 24 horas tras la siembra se cambió el medio y se añadieron 50 μ l de muestras de hidrogel dispersadas. Las placas se incubaron durante 24, 48 o 72 h, tras lo cual se adicionaron 20 μ l de solución de MTT (5 mg/ml) a cada pocillo. Estas placas se sometieron a una nueva incubación a 37°C durante 3 h para permitir la reacción de reducción del MTT. A continuación, se retiró el contenido de los pocillos, los cristales de formazán se disolvieron en DMSO y se cuantificó su absorbancia a 490 nm mediante un lector de placas Labsystems Multiskan EX. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado para cada tipo de hidrogel.

Las diferencias entre los valores de supervivencia celular se estudiaron mediante la prueba estadística ANOVA de un factor con un nivel de significación $p = 0.05$. Como prueba *post hoc* se seleccionó una prueba paramétrica o no paramétrica en función de la homogeneidad de las varianzas determinada por la prueba de Levene.

7. Citocompatibilidad

En este ensayo se comprobó la citotoxicidad de los hidrogeles formados a través de la medida de la viabilidad de las células Caco-2 tras su sembrado e incubación sobre los hidrogeles. En primer lugar, en una placa de 12 pocillos se procedió a la gelificación del polímero para formar los hidrogeles, tras lo cual se añadió medio de cultivo y se cambió varias veces, para permitir la captación de dicho medio en el interior de la red polimérica y neutralizar el pH ácido de los hidrogeles. Tras 24 horas, se añadieron las células y se dejaron incubar durante 3 y 7 días cambiando el medio de cultivo. Pasado este tiempo, se realizó la tinción de las células utilizando el kit de citotoxicidad/viabilidad LIVE/DEAD®. Este kit utiliza dos colorantes para determinar la viabilidad de las células en una población basándose en las diferencias de la actividad esterasa y la integridad de la membrana plasmática que hay entre células

vivas y muertas. El kit de citotoxicidad/viabilidad LIVE/DEAD® discrimina rápidamente las células vivas de las muertas mediante la tinción simultánea con calceína AM verde fluorescente y homodímero-1 de etidio rojo fluorescente; el primero indica la actividad esterasa intracelular, mientras que el segundo indica la pérdida de integridad de la membrana plasmática. Mediante este sistema los niveles de fondo son bajos debido a que ambos colorantes son prácticamente no fluorescentes antes de interactuar con las células. Finalmente, tras la tinción las células se observaron con un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E800).

La tinción se realizó en los hidrogeles M40 y M80 a los 3 y 7 días de incubación tras el sembrado.

8. Mucoadhesividad

8.1. Mucoadhesividad *in vitro*

El ensayo de mucoadhesividad *in vitro* se realizó para estimar la capacidad mucoadhesiva de las formulaciones en el tracto gastrointestinal como ensayo previo y complementario al estudio de mucoadhesividad *in vivo*. Para ello, se usaron ratas Wistar macho de 12 semanas de edad, que fueron sacrificadas por inyección intraperitoneal de 90 mg/kg de pentobarbital sódico. Inmediatamente después, se extirpó el tracto gastrointestinal y se dividió en los siguientes segmentos: estómago, duodeno, yeyuno, íleon y colon. Estos tejidos se lavaron con suero salino y se les practicó una incisión longitudinal para abrirlos y exponer el lumen.

Para este ensayo se diseñó un sistema (figura 2.III.5) que consta de una superficie inclinada 45 grados sobre la cual se instaló un dispositivo que bombea un flujo constante de 4 ml/min. Sobre esta superficie se colocaron portaobjetos a los que se les pegaron con cianoacrilato los tejidos estudiados.

Para determinar si hay diferencias de mucoadhesividad debido al peso molecular del polímero se ensayaron las formulaciones B160, M160 y A160. Estos hidrogeles liofilizados fueron rehidratados durante 45 minutos a pH 1.2 y posteriormente se colocaron sobre los estómagos con un flujo de tampón a pH 1.2 durante 1.5 horas. Pasado ese tiempo, los mismos hidrogeles se colocaron sobre el tejido duodenal durante 15 minutos con un flujo constante de tampón a pH 4.5. El mismo procedimiento se llevó a cabo con los restantes tejidos: yeyuno a pH 6.8 durante 1.4

horas, íleon a pH 6.8 durante 1.4 horas y colon a pH 7.5 hasta las 48 horas desde el inicio del ensayo. Los tampones se prepararon según se describe en la Farmacopea Europea.⁴⁵ Como control negativo se utilizó un disco de polipropileno de peso similar a las muestras ensayadas.

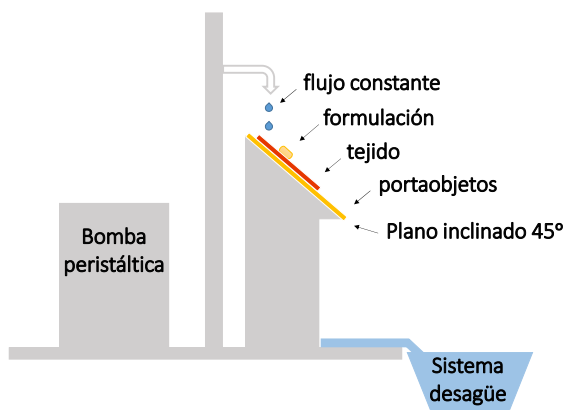


Figura 2.III.5. Esquema del sistema de plano inclinado diseñado para el estudio de mucoadhesividad

Con este planteamiento, un objeto o formulación que no sea adhesiva se desplazaría debido a la fuerza de la gravedad y a la fuerza de arrastre del flujo. En los portaobjetos se marcó la altura a la que se colocaron las formulaciones para determinar la magnitud de desplazamiento. El flujo de tampón tiene dos funciones, mantener hidratado el tejido y el hidrogel simulando las condiciones fisiológicas y producir la fuerza de arrastre.

Un sistema de grabación registró la evolución del ensayo para determinar si los hidrogeles se mantenían en el lugar en el que habían sido colocados o se desplazaban leve o totalmente cayendo del sistema.

8.2. Mucoadhesividad *in vivo*

El objetivo de este ensayo fue evaluar el tiempo de tránsito gastrointestinal de los hidrogeles como indicativo de su mucoadhesividad y capacidad para quedar retenidos en el tracto, permitiendo de ese modo actuar como sistemas de liberación durante un mayor periodo de tiempo. El protocolo de este estudio fue aprobado por el Comité de Ética con el código 2015/VSC/PEA/00008.

Los animales empleados fueron ratas macho de raza Wistar de unas 12 semanas de edad y 230-250 g de peso. Los animales se dividieron en grupos y subgrupos en función de la formulación administrada y del tiempo de sacrificio del animal, siguiendo el esquema de la tabla 2.III.6; el estudio se llevó a cabo en 36 animales, es decir, 3 ratas por subgrupo.

Grupo	Subgrupo	Formulación ensayada	Tiempo de sacrificio (h)
1	A	RB160	1
	B		2
	C		4.5
2	A	RM160	1
	B		2
	C		4.5
3	A	RA160	1
	B		2
	C		4.5
4	A	Sulfato de bario	1
	B		2
	C		4.5

Tabla 2.III.6. Esquema de los grupos y subgrupos de animales ensayados

Las formulaciones evaluadas fueron los hidrogeles base marcados con rodamina con grado de entrecruzamiento del 160%; se introdujeron 7 mg de dichas formulaciones liofilizadas en cápsulas de gelatina marca Torpac® tamaño 9. Como control de tránsito intestinal se escogió el sulfato de bario en polvo que se introdujo dentro de las cápsulas; se eligió este compuesto debido a que se trata de un sólido no absorbible a través del tracto gastrointestinal.

Los animales se sometieron a un periodo de ayuno de unas 2-4 horas, permitiéndoles el acceso libre a agua para garantizar su hidratación. A continuación se administraron las cápsulas mediante una sonda oral; las cápsulas se deshacen en contacto con los fluidos gástricos liberando su contenido. Las ratas se dejaron en jaulas individuales para permitir la recogida de heces de cada animal.

A los tiempos prefijados según el subgrupo (1, 2 o 4.5 horas) se sacrificaron los animales por dislocación cervical tras anestesia inhalatoria de isoflurano y se extrajeron los tractos gastrointestinales. Mediante el aparato In-Vivo FX Pro se obtuvieron fotografías de los tractos e imágenes de fluorescencia para los grupos a

los que se les había administrado la formulación marcada con rodamina; de los grupos controles se obtuvieron imágenes radiográficas. El mismo procedimiento se realizó con las heces de los animales, para determinar si la formulación había sido eliminada del organismo a los distintos tiempos.

Mediante el software ImageJ® se realizó la superposición de las imágenes de fluorescencia con las fotografías para los hidrogeles marcados con rodamina. Usando el mismo software se midió la longitud del intestino y la localización de los hidrogeles y el sulfato de bario para cada animal. Mediante una hoja de cálculo de Excel se realizaron los cálculos de la localización relativa de las formulaciones y los controles frente a la longitud total intestinal.

9. Liberación

En este estudio se evaluó la capacidad de los hidrogeles como sistemas de liberación modificada y la influencia del peso molecular del polímero y del grado de entrecruzamiento en los perfiles de liberación.

El ensayo se llevó a cabo en botellas de vidrio colocadas en un agitador orbital termorregulado (Stuart orbital incubator SI50) a 37°C y 100 movimientos oscilantes por minuto durante 48 horas. Para simular las condiciones gastrointestinales, a determinados periodos de tiempo el pH del medio se modificó según el esquema recogido en la tabla 2.III.7. La toma de muestras se realizó a tiempos prefijados (tabla 2.III.8) y el volumen retirado se repuso con el medio correspondiente. Al final del ensayo, los hidrogeles se trataron con HCl 35% durante 12 horas para desintegrar la red y recuperar el fármaco que pudiera quedar atrapado. Finalmente, el producto resultante se neutralizó, se centrifugó y el sobrenadante se cuantificó junto con el resto de muestras mediante HPLC para determinar la concentración de CPT. Los datos obtenidos se trataron matemáticamente con el Excel teniendo en cuenta las variaciones de volúmenes debidas a los cambios de pH. El porcentaje de liberación a cada tiempo se calculó tomando como dosis inicial la suma de la cantidad máxima liberada y la cantidad obtenida tras la desintegración del sistema.

Se ensayaron por triplicado los hidrogeles entrecruzados al 24%, 40%, 80% y 160% de los tres pesos moleculares de polímero.

Tiempo (h)	pH	Zona del tracto simulada	Composición
1.5	1.2	Estómago	A) 78 ml HCl 0.1 N + NaOH c.s.p. pH 1.2
0.25	4.5	Duodeno	B) A + 112 ml tampón fosfato pH 7.5 (50 mM) + 2.6 ml de NaOH 1 M
2.75	6.8	Yeyuno e íleon	C) B + 2.6 ml de NaOH 1 M
Hasta 48	7.5	Colon	D) C + 1.7 ml de NaOH 1 M

Tabla 2.III.7. Esquema del ensayo de liberación in vitro: periodos de tiempo a los que se ha estudiado cada pH, composición del medio y zona del tracto gastrointestinal que se simula en cada periodo

pH	Tiempos de muestreo (h)
1.2	0.083, 0.25, 0.5, 1, 1.5
4.5	1.58, 1.75
6.8	2, 3, 4, 4.5
7.5	4.58, 6, 8, 10, 24, 48

Tabla 2.III.8. Tiempos de toma de muestra expresados desde el inicio del ensayo

Los perfiles de liberación obtenidos se compararon mediante el cálculo del f_2 , usando la ecuación 2.III.18. En este caso, R_t es el porcentaje de fármaco liberado a cada tiempo en la formulación que se toma de referencia y T_t es el porcentaje liberado a cada tiempo para la formulación que se evalúa. Del mismo modo, se emplea un número de puntos tal que incluya sólo el primer valor mayor del 85% del porcentaje de fármaco liberado para cualquiera de las dos formulaciones. Si el f_2 es mayor o igual a 50 indica que las curvas son similares.

El ajuste de los perfiles para establecer el modelo cinético de liberación se realizó aplicando la ecuación 1.IV.7 de Korsmeyer-Peppas, descrita en la "Introducción general". Se utilizaron los valores experimentales hasta un porcentaje de liberación del 60% de la cantidad total existente en el hidrogel. Los valores teóricos de M_t/M_∞ se ajustaron mediante la herramienta Solver del Excel para hacer mínima la suma de cuadrados residuales (SSR) y hallar los parámetros n (exponente difusional) y K (constante cinética).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Estabilidad de la camptotecina

La estabilidad de las soluciones de CPT se ha valorado para determinar si las muestras de los ensayos se pueden mantener en determinadas condiciones de conservación, durante cierto tiempo, antes de su cuantificación mediante HPLC. Como paso previo, antes de proceder al cálculo de los parámetros representativos de la degradación se realizó el cálculo del estadístico F con objeto de analizar si se producía cambio en la concentración de CPT en las muestras en función del tiempo.

En todos los casos los valores de F calculados no resultaron ser significativos, por lo que se puede considerar que la CPT es estable en todas las condiciones de almacenamiento ensayadas durante el tiempo analizado.

2. Clasificación biofarmacéutica de la camptotecina

Se han realizado estudios de solubilidad y permeabilidad de este fármaco para poder clasificarlo según el BCS.

Los valores de concentración de saturación (C_s) así como el número de dosis se muestran en la tabla 2.IV.1. La solubilidad de la CPT en soluciones acuosas se sitúa en el rango de 6-14 $\mu\text{g/ml}$ dependiendo del valor de pH del medio; la C_s a pH 1.2 y 6.8 es mayor que a pH 4.5 y 7.5. Según estudios publicados, la dosis en humanos es de 6 $\text{mg/m}^2/\text{día}$,⁴⁶ que equivale a unos 11 mg para una persona de 70 kg y 1.70 m (fórmula de Mosteller). Para esta dosis de CPT, los valores de D_0 son superiores a 1 en todos los casos, lo que indica que se trata de un fármaco de baja solubilidad⁴⁷ para cualquiera de los pHs estudiados.

pH	C_s ($\mu\text{g/ml}$)	D_0
1.2	14.21 \pm 1.23	3.1
4.5	6.42 \pm 0.18	6.8
6.8	14.71 \pm 0.57	3.0
7.5	9.35 \pm 1.82	4.7

Tabla 2.IV.1. Valores de solubilidad (C_s) y número de dosis para la CPT a distintos pHs

Respecto a los estudios de permeabilidad *in vitro*, de los posibles modelos celulares utilizados para este estudio se ha seleccionado el de células de carcinoma de colon humano (Caco-2) ya que es el más ampliamente validado para la caracterización de la permeabilidad por difusión pasiva.⁴⁸⁻⁵⁰ A pesar de que su tasa de crecimiento es más lenta, su capacidad de expresión de transportadores así como su similitud con el intestino humano es mayor que la de otras células usadas para este fin.

Los valores de permeabilidad de CPT (5 μM , 10 μM y 50 μM) y metoprolol (100 μM) en células Caco-2 a los 21 días tras el sembrado se muestran en la tabla 2.IV.2 y figura 2.IV.1.

Caco-2 21 días	
CPT 5 μM	$3.12 \cdot 10^{-5} \pm 7.80 \cdot 10^{-6}$
CPT 10 μM	$2.60 \cdot 10^{-5} \pm 2.79 \cdot 10^{-8}$
CPT 50 μM	$7.88 \cdot 10^{-6} \pm 5.90 \cdot 10^{-7}$
MET 100 μM	$2.30 \cdot 10^{-5} \pm 2.20 \cdot 10^{-6}$

Tabla 2.IV.2. Valores de permeabilidad (cm/s) del metoprolol (MET) a 100 μM y de la CPT a 5 μM , 10 μM y 50 μM en Caco-2 a los 21 días tras la siembra

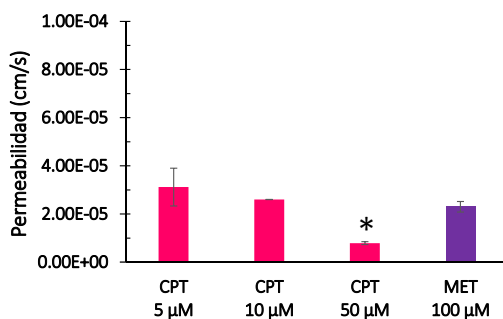


Figura 2.IV.1. Permeabilidad (cm/s) del metoprolol (MET) a 100 μM y CPT a 5 μM , 10 μM y 50 μM en Caco-2 a los 21 días tras la siembra. (*) = Diferencias estadísticamente significativas (comparado con metoprolol)

Como se puede observar en la figura 2.IV.1., la permeabilidad de la CPT a 50 μM es significativamente inferior a la del metoprolol. Asimismo, existen diferencias estadísticamente significativas para las permeabilidades de CPT entre 5 y 50 μM y entre 10 y 50 μM . Estas diferencias de permeabilidad en función de la concentración son debidas a la absorción del antitumoral mediada por transportadores.

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos *in vitro*, se han llevado a cabo estudios de permeabilidad *in situ*. El método de Doluisio posee varias ventajas frente a otros similares, ya que se lleva a cabo sin recirculación, lo que evita la desorganización de la capa acuosa de difusión adyacente a la membrana y la alteración de las condiciones fisiológicas; además se mantienen condiciones de flujo sanguíneo e integridad tisular similares a las existentes *in vivo*.

La tabla 2.IV.3 y la figura 2.IV.2 muestran los valores de permeabilidad de CPT (5 μM , 10 μM y 50 μM) y metoprolol (100 μM) en intestino delgado (figura 2.IV.2 a) y colon (figura 2.IV.2 b). El valor de la constante aparente de velocidad de absorción

(k_{ap}) se ha transformado en valores de permeabilidad intestinal efectiva para posibilitar la comparación con los datos obtenidos en la técnica *in vitro*. Dicha transformación se ha realizado tomando como referencia la longitud intestinal media y el volumen perfundido de disolución.

	Intestino delgado	Colon
CPT 5 μ M	$8.51 \cdot 10^{-5} \pm 4.12 \cdot 10^{-6}$	$3.71 \cdot 10^{-5} \pm 5.64 \cdot 10^{-6}$
CPT 10 μ M	$7.55 \cdot 10^{-5} \pm 3.49 \cdot 10^{-6}$	$3.41 \cdot 10^{-5} \pm 7.44 \cdot 10^{-6}$
CPT 50 μ M	$7.49 \cdot 10^{-6} \pm 6.83 \cdot 10^{-7}$	$2.42 \cdot 10^{-5} \pm 5.70 \cdot 10^{-6}$
MET 100 μ M	$5.50 \cdot 10^{-5} \pm 2.20 \cdot 10^{-6}$	$8.14 \cdot 10^{-5} \pm 1.85 \cdot 10^{-5}$

Tabla 2.IV.3. Valores de permeabilidad (cm/s) del metoprolol (MET) a 100 μ M y de la CPT a 5 μ M, 10 μ M y 50 μ M en intestino delgado y colon

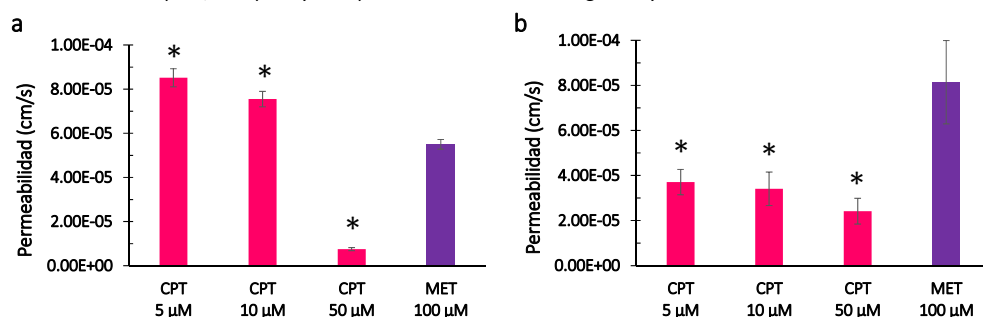


Figura 2.IV.2. Permeabilidad (cm/s) del metoprolol (MET) a 100 μ M y CPT a 5 μ M, 10 μ M y 50 μ M en a) intestino delgado y b) colon. (*) Diferencias estadísticamente significativas (comparado con metoprolol)

La existencia de diferencias entre las permeabilidades obtenidas con las distintas concentraciones de CPT ensayadas en intestino delgado y colon se muestran en la tabla 2.IV.4.

		Int. delgado			Colon		
		5 μ M	10 μ M	50 μ M	5 μ M	10 μ M	50 μ M
Int. delgado	5 μ M	NS					
	10 μ M						
	50 μ M						
Colon	5 μ M	S			NS		
	10 μ M	S					
	50 μ M	S					

Tabla 2.IV.4. Resultados estadísticos de ANOVA de un factor. S/NS = existen/no existen diferencias estadísticamente significativas

En la figura 2.IV.2 se observa que en intestino delgado a bajas concentraciones de CPT (5 y 10 μM) la permeabilidad es mayor que la del fármaco de referencia; sin embargo, la permeabilidad de la CPT disminuye significativamente a concentraciones mayores (50 μM) siendo menor que la del metoprolol. En cambio, en colon, las tres concentraciones ensayadas de CPT tienen una permeabilidad significativamente menor que la del metoprolol. Los resultados obtenidos *in situ* concuerdan con los observados en el estudio de permeabilidad en Caco-2.

Según los resultados se deduce que la CPT se absorbe tanto por difusión pasiva como por transportadores activos. La permeabilidad por difusión pasiva es baja, en cambio la existencia de transportadores de absorción (principalmente en intestino delgado y Caco-2 a los 21 días) aumentan la permeabilidad de dicho fármaco. Cuando la concentración de CPT es igual o mayor a 50 μM , los transportadores de absorción se saturan por lo que la permeabilidad del fármaco es menor.

Por todo ello, la CPT puede considerarse un fármaco de alta permeabilidad en intestino delgado para concentraciones $\leq 10 \mu\text{M}$ y de baja permeabilidad para concentraciones $\geq 50 \mu\text{M}$. Estas diferencias de permeabilidad en función de la concentración pueden ser atribuidas a la existencia de componentes de absorción y secreción activa como se ha propuesto en algunos estudios.^{26, 28} Por el contrario, este fármaco presenta baja permeabilidad en colon debido a la escasez de transportadores en este tramo intestinal.

En base a los resultados obtenidos en los estudios de solubilidad y permeabilidad se concluye que la CPT es un fármaco de baja solubilidad y permeabilidad dependiente de la concentración y del tramo intestinal en el que se encuentre. Por tanto, puede clasificarse como un fármaco clase II para bajas concentraciones ($\leq 10 \mu\text{M}$) en intestino delgado y un fármaco clase IV para altas concentraciones ($\geq 50 \mu\text{M}$) en intestino delgado y cualquier concentración en intestino grueso.

En este estudio se ha demostrado que la CPT es un buen candidato para ser administrado mediante un sistema de liberación controlada por vía oral, ya que con dicho sistema se obtendrían concentraciones bajas de fármaco que podrían absorberse rápidamente, facilitando el aprovechamiento del fármaco y reduciendo el tiempo de permanencia en lumen intestinal fuera del sistema de liberación.

3. Reacción de síntesis de los hidrogeles y marcaje con rodamina

El THPC actúa como reticulante tetrafuncional para la formación de hidrogeles a partir de polímeros aminados como el quitosán (figura 2.IV.3). El THPC puede reaccionar con aminas primarias y secundarias a través de la reacción de Mannich.⁴¹ Se ha propuesto que la reacción se inicia por la generación de formaldehído, el cual reacciona con los grupos amino para formar iones imonio. El derivado de THPC reacciona con los iones formados para completar el reemplazo del grupo hidroximetilo, lo que origina la condensación con la amina.

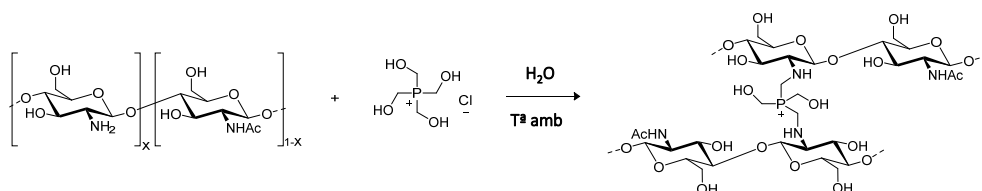


Figura 2.IV.3. Reacción de formación de hidrogeles a partir de quitosán y THPC

En la reacción de formación del hidrogel se han utilizado cantidades milimolares de THPC que producen formaldehído en un rango 1000 veces menor que la cantidad de THPC utilizada,⁴¹ por lo que la toxicidad de este compuesto se hipotetizó que sería baja. Chung y col. realizaron un estudio colorimétrico para la detección de formaldehído donde detectaron concentraciones milimolares del mismo en soluciones molares de THPC.⁴¹

La estructura química del THPC permite la unión covalente de una molécula de agente entrecruzante con cuatro aminas libres del quitosán. Sin embargo, cuando el número de grupos reactivos del THPC (grupos hidroximetilo) exceden al número de grupos amino reactivos, es probable que ciertas moléculas de THPC reaccionen con uno sólo de sus grupos hidroximetilo, consumiendo las aminas libres sin crear entrecruzamientos efectivos. También es posible que ante el exceso de moléculas de reticulante, dos grupos hidroximetilo de una misma molécula o de dos moléculas distintas de THPC se condensen con un único grupo amino primario (figura 2.IV.4). Por ello, en este trabajo se han estudiado varios porcentajes de reacción THPC-quitosán, concluyendo que la relación óptima es aquella que consigue crear hidrogeles consistentes (aspecto del hidrogel obtenido en la figura 2.IV.5) y capaces de retener y liberar fármacos con la mínima proporción de agente reticulante. Esta

mínima cantidad de agente entrecruzante evita la posible toxicidad derivada de la formación de formaldehído y la reactividad de los grupos hidroximetilo que no hayan reaccionado con el quitosán. Esta proporción óptima entre polímero y el agente reticulante se ha situado en el rango entre 24% y 160% (moles de THPC/moles de unidades de repetición de quitosán).

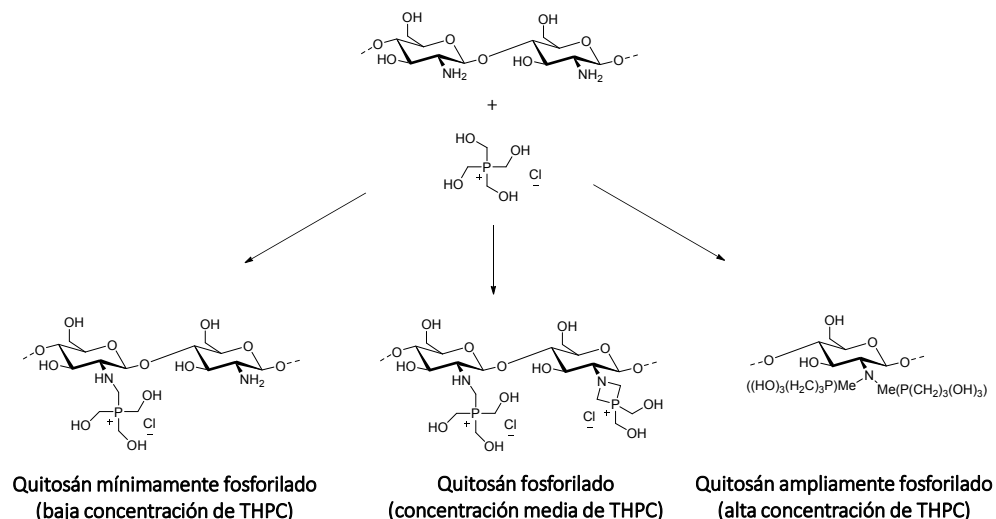


Figura 2.IV.4. Representación de los posibles grados de fosforilación del quitosán a distintas concentraciones de THPC. Nota: No muestra el entrecruzamiento. El quitosán se representa desacetilado para simplificar el esquema de reacción

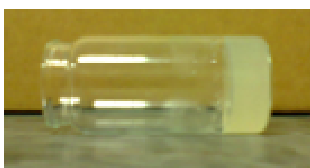


Figura 2.IV.5. Aspecto del hidrogel con CPT, NM40-CPT

Marcaje con rodamina

En la reacción del polímero con el marcador fluorescente en medio acuoso básico reaccionan el grupo isotiocianato de la rodamina con el grupo amino del quitosán, formando un enlace tiourea, según se muestra en la figura 2.IV.6.

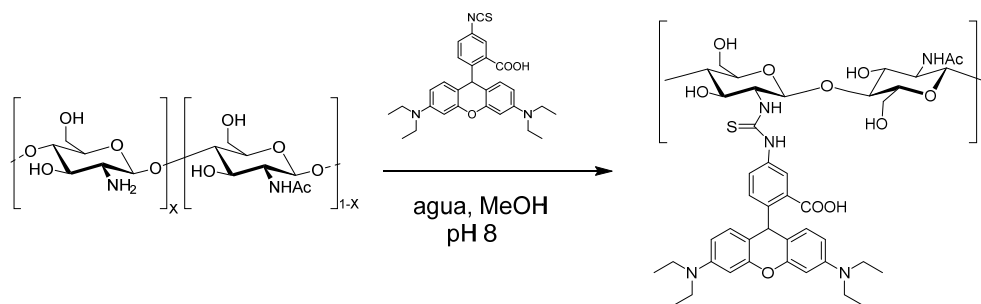


Figura 2.IV.6. Representación de la reacción de rodamina isotiocianato con quitosán

4. Caracterizaciones

4.1. Análisis elemental y espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente

Los resultados del análisis elemental del quitosán comercial de distintos pesos moleculares (BPM, MPM, APM), de los “hidrogeles base” y de los “hidrogeles con NMP”, así como el ICP-MS de fósforo de ambos tipos de hidrogeles, se recogen en las tablas 2.IV.5 y 2.IV.6.

El ICP-MS de los polímeros tratados con distintas concentraciones de THPC muestra que el porcentaje de fósforo incorporado a la red orgánica aumenta conforme incrementa la proporción de agente entrecruzante añadido. Asimismo, se observa que el proceso de fosforilación es porcentualmente muy similar entre polímeros de distinto peso molecular con el mismo porcentaje de entrecruzamiento (tabla 2.IV.5).

Comparando la fosforilación de los polímeros de distintos pesos moleculares tratados a distintas concentraciones de THPC, en ausencia o presencia de NMP, (tabla 2.IV.6) se observa que el disolvente no interfiere en la incorporación del agente entrecruzante, ya que el porcentaje de fósforo es muy similar en las parejas de valores correspondientes a presencia y ausencia de disolvente, esto es, B24-NB24, B160-NB160, etc.

	N%	C%	H%	P%
BPM	7.38	39.93	7.06	---
B24	5.90	40.43	6.87	1.7
B40	5.95	38.30	6.23	2.5
B80	5.48	37.61	6.14	5.5
B160	4.52	35.35	6.11	7.6
MPM	7.23	40.42	6.94	---
M24	5.81	37.75	6.50	2.0
M40	5.97	39.00	6.47	2.3
M80	5.21	36.73	6.38	5.3
M160	4.79	35.75	6.40	7.8
APM	7.30	40.56	7.00	---
A24	6.00	40.10	6.55	1.6
A40	5.67	40.07	7.04	2.5
A80	5.21	38.80	6.87	5.3
A160	4.66	35.72	6.35	6.7

Tabla 2.IV.5. Resultados del análisis elemental e ICP-MS de fósforo del quitosán sin tratar a los distintos PM y los “hidrogeles base” correspondientes entrecruzados con THPC.

	N%	C%	H%	P%
B24	5.90	40.43	6.87	1.7
NB24	6.95	40.00	6.74	1.6
B160	4.52	35.35	6.11	7.6
NB160	5.37	36.40	6.60	7.0
M24	5.81	37.75	6.50	2.0
NM24	6.94	40.00	6.34	1.8
M160	4.79	35.75	6.40	7.8
NM160	5.43	36.64	6.66	7.3
A24	6.00	40.10	6.55	1.6
NA24	7.17	40.62	6.71	1.3
A160	4.66	35.72	6.35	6.7
NA160	5.54	37.00	6.30	6.4

Tabla 2.IV.6. Resultados del análisis elemental e ICP-MS de fósforo de los “hidrogeles base” y de los “hidrogeles con NMP” correspondientes

4.2. Análisis termogravimétrico

Mediante el análisis termogravimétrico, se ha analizado la estabilidad térmica y los porcentajes de pérdida de masa de los polímeros comerciales y de los “hidrogeles base”. Además, se ha evaluado si la adición de NMP como disolvente del fármaco influye en la estabilidad de los hidrogeles, habiéndose analizado la presencia de éste en los hidrogeles de los tres PM de quitosán a los niveles de entrecruzamiento mínimo y máximo, 24% y 160%, respectivamente. De la misma forma, se ha estudiado si la adición de la CPT tiene influencia en la termoestabilidad de los hidrogeles, evaluando los hidrogeles correspondientes a los tres PM de quitosán con el nivel de reticulación mínima y máxima, 24% y 160%, respectivamente. Por último, también se ha valorado si la reacción con la rodamina afecta a la estabilidad térmica de los productos. Para ello, se han evaluado los tres PM de quitosán marcados con rodamina, denominados RBPM, RMPM y RAPM, y los hidrogeles resultantes del entrecruzamiento con la máxima cantidad de THPC ensayada (160% de reticulación): RB160, RM160, RA160.

Como se observa en las curvas de TGA de los distintos PM de quitosán (figura 2.IV.7 a), los tres PM muestran la misma pérdida de masa porcentual. En el análisis DTG se muestran los picos de pérdida de agua residual a los 75°C, de despolimerización a los 300°C y de pirólisis entre los 500 y 650°C (figura 2.IV.7 b).

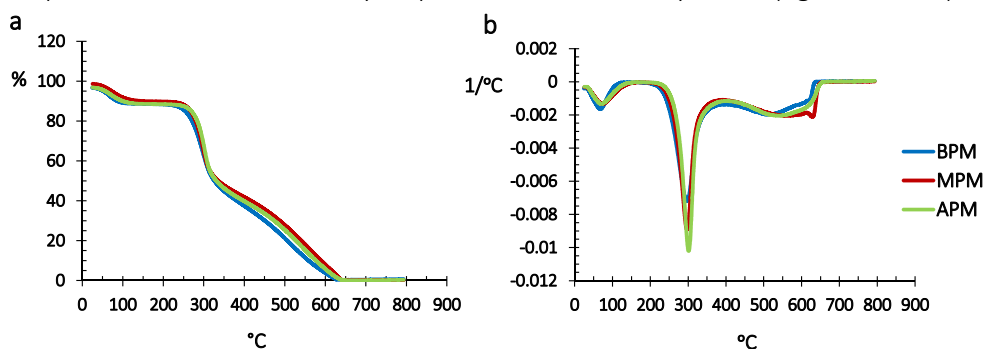


Figura 2.IV.7. Gráficas de a) TGA, b) DTG para el quitosán con distintos pesos moleculares

Si se compara el comportamiento de uno de los polímeros de quitosán (es indiferente el PM) con los distintos grados de entrecruzamiento con THPC (figuras 2.IV.8 a, 2.IV.9 a y 2.IV.10 a), se observa una clara disminución de la estabilidad térmica cuanto mayor es el grado de entrecruzamiento, así como un residuo de un

10 a un 25% en los hidrogeles, siendo despreciable el residuo de polímero sin entrecruzar a temperaturas superiores a 600°C. La pérdida de masa se origina a menor temperatura para los hidrogeles que para el polímero sin entrecruzar.

En las gráficas de TGA y DTG (figuras 2.IV.8, 2.IV.9 y 2.IV.10) para cualquiera de los PM de quitosán en las que se compara los distintos ratios de entrecruzamiento del hidrogel y el polímero sin entrecruzar, el primer evento térmico en el que se produce la pérdida de humedad o agua residual se da en todas las muestras a los 75°C. En cambio, la temperatura a la que se produce la máxima descomposición del producto ($T_{m\acute{a}x}$) es menor cuanto más entrecruzado esté el hidrogel, siendo máxima para el polímero sin entrecruzar. Es decir, la $T_{m\acute{a}x}$ varía de 200°C para el quitosán entrecruzado al 160% a 300°C para el quitosán sin entrecruzar. Esta tendencia observada es debida a que cuanto más reticulada esté una estructura, es más amorfa y, por tanto, más inestable térmicamente.

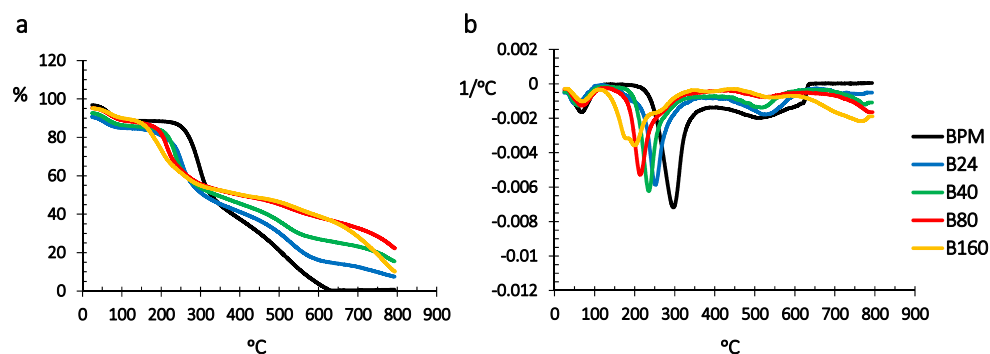


Figura 2.IV.8. Gráficas de a) TGA y b) DTG para el quitosán de bajo PM y sus hidrogeles base correspondientes con distintos porcentajes de entrecruzamiento

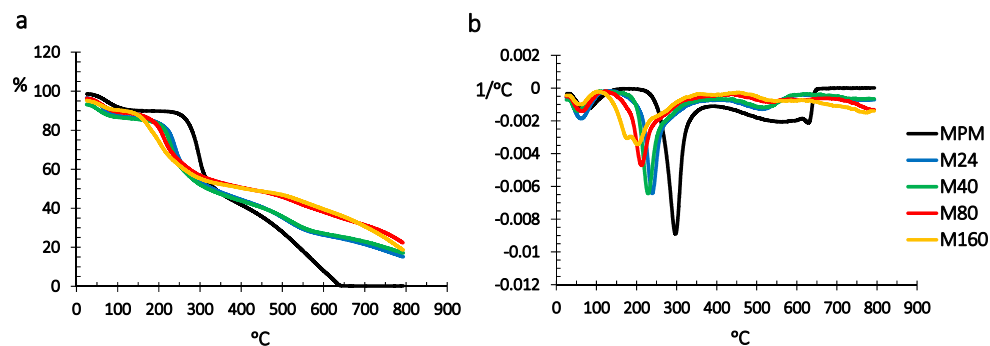


Figura 2.IV.9. Gráficas de a) TGA y b) DTG para el quitosán de medio PM y sus hidrogeles base correspondientes con distintos porcentajes de entrecruzamiento

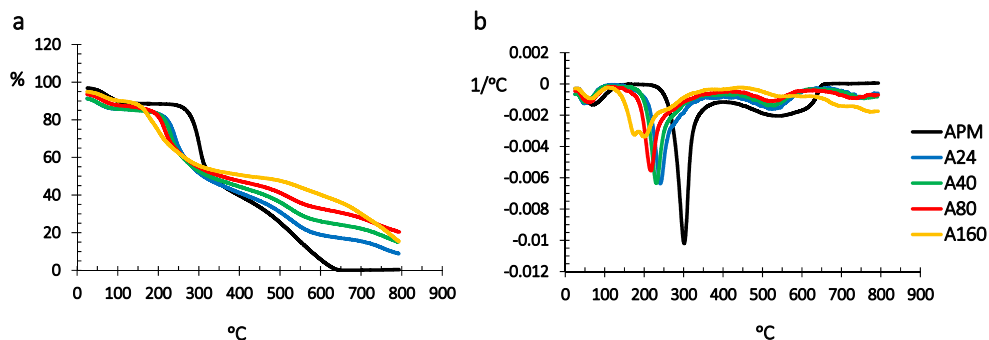


Figura 2.IV.10. Gráficas de a) TGA y b) DTG para el quitosán de alto PM y sus hidrogeles base correspondientes con distintos porcentajes de entrecruzamiento con THPC

En el caso de la adición de NMP al hidrogel, tanto en las gráficas TGA (figura 2.IV.11 a) como en las DTG (figura 2.IV.11 b) de todos los casos estudiados, no se observa ninguna alteración en la termoestabilidad debida a la adición de dicho solvente.

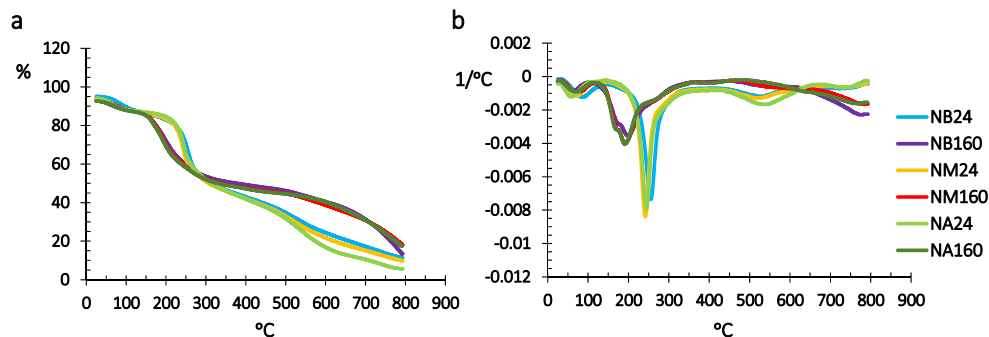


Figura 2.IV.11. Gráficas de a) TGA y b) DTG de los hidrogeles con NMP de mayor y menor grado de entrecruzamiento para el quitosán de distintos PM

Respecto a la adición de CPT al hidrogel, en las gráficas de TGA (figura 2.IV.12 a) se observa un mayor porcentaje de pérdida de masa entre los 200 y 300°C que corresponde al rango de temperaturas en el que funde este antitumoral. Este porcentaje de pérdida de masa se debe exclusivamente al fármaco, y no se observa que la estructura del hidrogel se vea afectada.

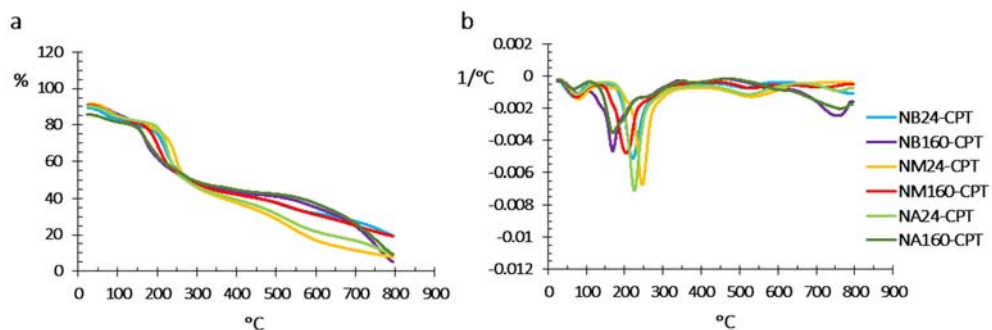


Figura 2.IV.12. Gráficas de a) TGA y b) DTG de los hidrogeles con CPT de mayor y menor grado de entrecruzamiento para el quitosán de distintos PM

Para las muestras de quitosán marcadas con rodamina, los perfiles de TGA y DTG (figura 2.IV.13) son muy similares a los del polímero comercial (ver figura 2.IV.7), de lo que se desprende que la reacción con la rodamina no afecta a la termoestabilidad del polímero. La misma conclusión se obtiene si se comparan los hidrogeles marcados con rodamina con aquellos sin marcar (representados en las figuras 2.IV.8 – 2.IV.10). La comparativa realizada para los hidrogeles entrecruzados al 160% demuestra que la reacción con rodamina no afecta a la estabilidad térmica del hidrogel.

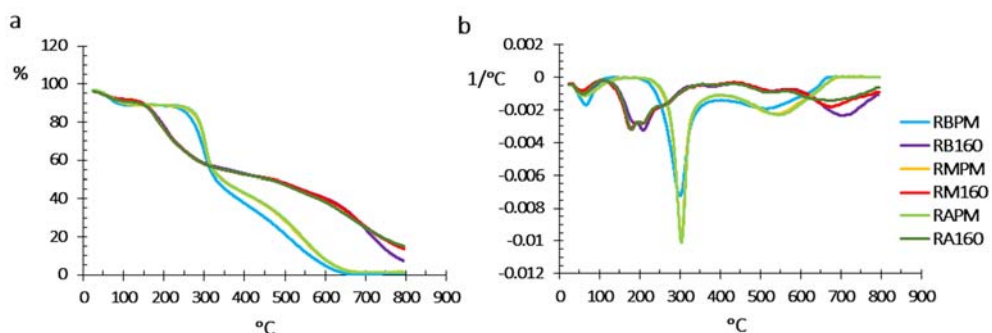


Figura 2.IV.13. Gráficas de a) TGA y b) DTG de los distintos pesos moleculares de quitosán marcados con rodamina y sus respectivos hidrogeles entrecruzados al 160%

4.3. Difracción de rayos X

El difractograma de rayos X del quitosán de medio PM sin tratar (MPM), modificado a diferentes concentraciones de THPC, en ausencia (M24, M160) y

presencia (NM24, NM160) de NMP como disolvente y en presencia de CPT (NM160-CPT) se representa en la figura 2.IV.14.

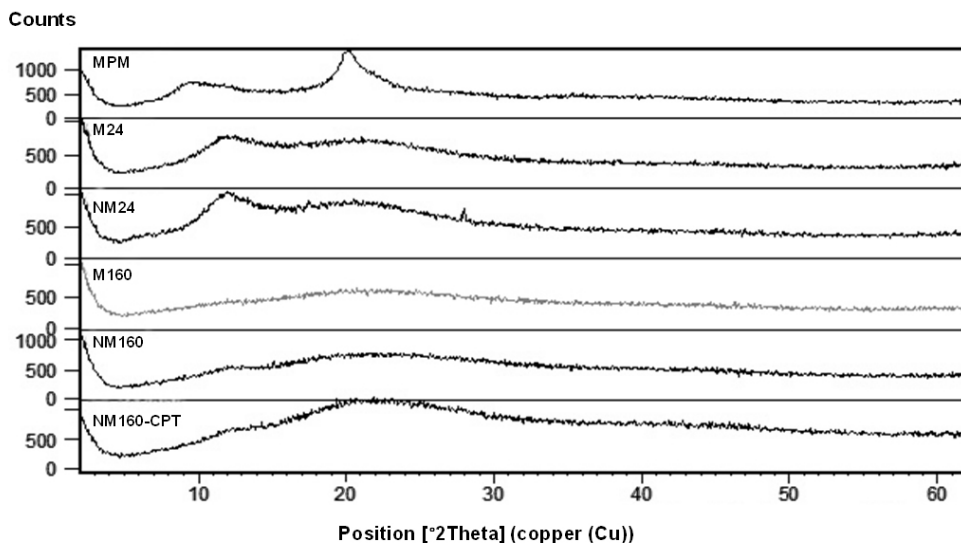


Figura 2.IV.14. Difractograma de rayos X del quitosán MPM, y los hidrogeles correspondientes entrecruzados con THPC al 24 y 160%, así como sus homólogos con NMP, y el hidrogel entrecruzado al 160% conteniendo CPT

El quitosán original presenta dos picos anchos característicos en ángulos (2θ) de 10 y 20 grados.⁵¹ Se produce una disminución de la cristalinidad al entrecruzar el polímero con THPC al 24%, observándose la pérdida de pico a 20 grados. Un aumento considerable en la incorporación de agente entrecruzante (entrecruzamiento al 160%), aumenta el grado de amorfización en el polímero, eliminando ambos picos del difractograma. La presencia de NMP no modifica la cristalinidad en comparación con el proceso llevado a cabo únicamente en condiciones acuosas. Asimismo, se observa que la encapsulación del fármaco no modifica la cristalinidad del polímero amorfizado en presencia del agente reticulante.

4.4. Microscopía de fluorescencia

Mediante microscopía de fluorescencia se observa la encapsulación de la CPT en el interior del sistema. Tras la obtención del hidrogel NM160-CPT, se hizo un lavado en agua unos segundos y se cortó en fragmentos. La figura 2.IV.15 muestra una

imagen de microscopía de un fragmento del hidrogel en el que se aprecia que la encapsulación del fármaco, con propiedades fluorescentes, es homogénea y estable.

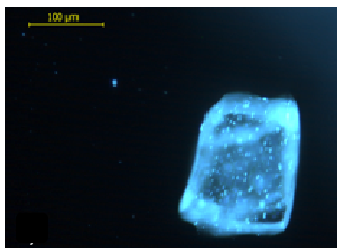


Figura 2.IV.15. Imagen de fluorescencia del hidrogel NM160-CPT

4.5. Microscopía electrónica de barrido

Las imágenes SEM (figura 2.IV.16) muestran la estructura interna del hidrogel liofilizado. No se observan diferencias evidentes entre los hidrogeles formados por quitosán de distintos PM; la estructura de la red polimérica en todos los casos está compuesta por cavidades y poros de tamaño irregular interconectados.

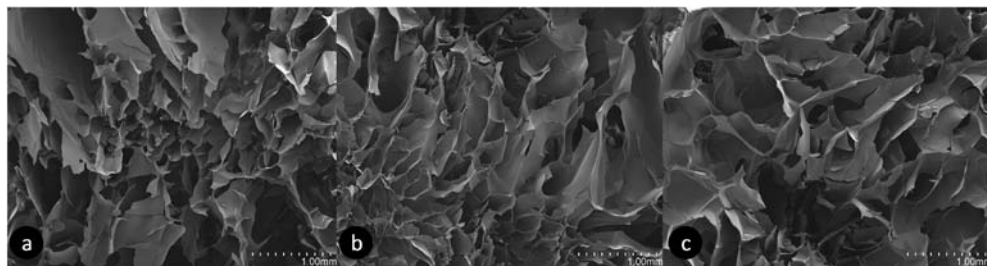


Figura 2.IV.16. Imágenes SEM de los hidrogeles entrecruzados al 160% con quitosán de PM a) bajo, b) medio, c) alto

5. Hinchamiento

Los estudios de hinchamiento se han realizado en dos partes para valorar la influencia de varios factores: PM del polímero, porcentaje de entrecruzamiento y pH del medio. Como ya se ha comentado, los valores de hinchamiento se han calculado como la diferencia entre el peso del hidrogel hinchado y el hidrogel seco, normalizando por el peso del hidrogel seco.

En el primer estudio se ha determinado el hinchamiento en equilibrio de los hidrogeles base con distinto porcentaje de entrecruzamiento y distinto PM del

polímero a pH 7.5. Los resultados se muestran en la tabla 2.IV.7 y figura 2.IV.17; para facilitar su comprensión, los hidrogeles se refieren según el PM del quitosán y el porcentaje de entrecruzamiento. La tabla 2.IV.8 recoge la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los valores de hinchamiento en equilibrio para las distintas variables.

	24%	40%	80%	160%
BPM	6.93 ± 1.03	5.48 ± 1.19	4.39 ± 0.96	2.04 ± 0.24
MPM	10.72 ± 1.57	6.07 ± 1.45	5.22 ± 0.88	3.43 ± 0.32
APM	11.51 ± 0.78	7.78 ± 1.37	6.45 ± 0.81	3.56 ± 0.63

Tabla 2.IV.7. Valores de hinchamiento en equilibrio, Q_{∞} , a las 48 h a pH 7.5

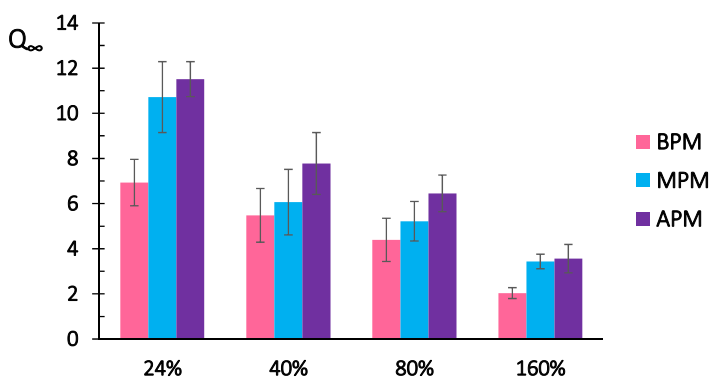


Figura 2.IV.17. Valores de hinchamiento en equilibrio, Q_{∞} , obtenidos experimentalmente a las 48 h a pH 7.5

Como se ha comentado, el equilibrio de hinchamiento es el resultado entre la presión osmótica que tiende a expandir el hidrogel y la elasticidad del polímero que se opone a esta expansión. En esta elasticidad influye, entre otros factores, el grado de entrecruzamiento de la matriz. En general, se observa que el hinchamiento es mayor cuanto menor es el porcentaje de entrecruzamiento y cuanto mayor es el PM del quitosán (diferencias estadísticamente significativas entre BPM-MPM y BPM-APM).

		BPM				MPM				APM			
		24%	40%	80%	160%	24%	40%	80%	160%	24%	40%	80%	160%
BPM	24%	NS S NS S S S											
	40%												
	80%												
	160%												
MPM	24%	S				S S NS S S S							
	40%	NS											
	80%	NS											
	160%	S											
APM	24%	S				NS				S S NS S S S			
	40%	NS				NS							
	80%	S				NS							
	160%	S				NS							

Tabla 2.IV.8. ANOVA de los valores Q_{∞} de los distintos hidrogeles a pH 7.5. S = existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$); NS = No existen diferencias estadísticamente significativas

En el segundo ensayo se han obtenido los perfiles de hinchamiento de los hidrogeles base de distinto PM de quitosán entrecruzados al 40% y se ha evaluado la influencia del pH y el PM en la dinámica de hinchamiento. Los valores de hinchamiento para cada tiempo se recogen en las tablas 2.IV.9 y 2.IV.10. En la figura 2.IV.18 se muestran los perfiles de hinchamiento en función del PM del quitosán que compone el hidrogel para cada pH y en la figura 2.IV.19 se presentan los perfiles de hinchamiento en función de la variación del pH del medio para cada PM del polímero.

Tiempo (h)	pH 1.2			pH 4.5		
	B40	M40	A40	B40	M40	A40
0.5	14.33 ± 0.08	17.61 ± 2.54	25.71 ± 5.52	3.71 ± 1.82	6.46 ± 0.49	8.47 ± 1.12
1	20.03 ± 0.06	20.25 ± 5.98	28.96 ± 4.22	4.80 ± 3.45	6.36 ± 0.02	8.93 ± 0.10
2	30.22 ± 0.11	27.53 ± 4.01	32.30 ± 2.45	4.19 ± 2.43	8.08 ± 0.26	9.83 ± 0.39
3	31.25 ± 3.93	31.52 ± 3.30	38.55 ± 4.40	5.64 ± 2.11	8.17 ± 0.15	10.57 ± 1.48
4	32.24 ± 0.21	31.60 ± 3.08	37.95 ± 2.76	5.04 ± 3.19	8.82 ± 0.89	10.07 ± 1.75
5	34.88 ± 1.70	32.95 ± 1.43	38.50 ± 1.99	6.52 ± 1.70	8.63 ± 0.01	10.41 ± 0.32
6	36.43 ± 2.41	34.49 ± 0.91	41.98 ± 3.81	5.28 ± 2.76	9.49 ± 0.86	10.97 ± 0.53
7	36.93 ± 2.46	37.13 ± 1.09	42.13 ± 3.07	5.38 ± 3.38	8.95 ± 0.94	10.59 ± 1.54
24	44.15 ± 3.47	43.68 ± 3.36	48.24 ± 2.14	5.73 ± 2.63	10.21 ± 0.76	12.42 ± 2.83
48	44.38 ± 2.73	45.10 ± 1.84	48.76 ± 1.23	6.69 ± 3.30	11.28 ± 0.33	14.28 ± 0.62

Tabla 2.IV.9. Valores de hinchamiento para cada tiempo, Q_t , de las muestras B40, M40 y A40 a pH 1.2 y pH 4.5

Tiempo (h)	pH 6.8			pH 7.5		
	B40	M40	A40	B40	M40	A40
0.5	4.22 ± 1.18	5.95 ± 0.60	5.21 ± 0.46	3.94 ± 0.49	5.09 ± 0.05	6.86 ± 1.27
1	4.56 ± 1.54	6.90 ± 0.93	5.50 ± 0.02	3.54 ± 1.25	5.27 ± 0.58	6.47 ± 1.05
2	4.95 ± 0.51	7.04 ± 1.23	6.10 ± 0.44	4.20 ± 1.53	5.44 ± 0.59	6.61 ± 0.02
3	4.48 ± 1.51	6.18 ± 0.23	5.50 ± 1.05	3.95 ± 1.06	5.42 ± 0.24	5.98 ± 0.03
4	4.81 ± 0.68	7.01 ± 0.25	5.30 ± 0.23	4.32 ± 1.53	5.24 ± 0.03	5.51 ± 0.52
5	4.33 ± 1.07	5.94 ± 1.04	5.86 ± 0.69	3.90 ± 0.91	5.16 ± 0.07	6.75 ± 1.24
6	4.41 ± 0.65	6.13 ± 0.78	5.90 ± 0.72	4.24 ± 0.95	5.19 ± 0.47	5.87 ± 0.99
7	4.32 ± 1.34	5.69 ± 0.53	5.78 ± 0.07	4.57 ± 0.70	5.71 ± 0.59	6.14 ± 0.42
24	5.21 ± 0.79	6.43 ± 0.18	6.72 ± 0.45	4.62 ± 0.59	5.43 ± 0.92	6.57 ± 0.04
48	6.11 ± 1.03	7.05 ± 2.30	7.85 ± 1.10	5.48 ± 0.85	6.06 ± 0.24	7.78 ± 0.34

Tabla 2.IV.10. Valores de hinchamiento para cada tiempo, Q_t , de las muestras B40, M40 y A40 a pH 6.8 y pH 7.5

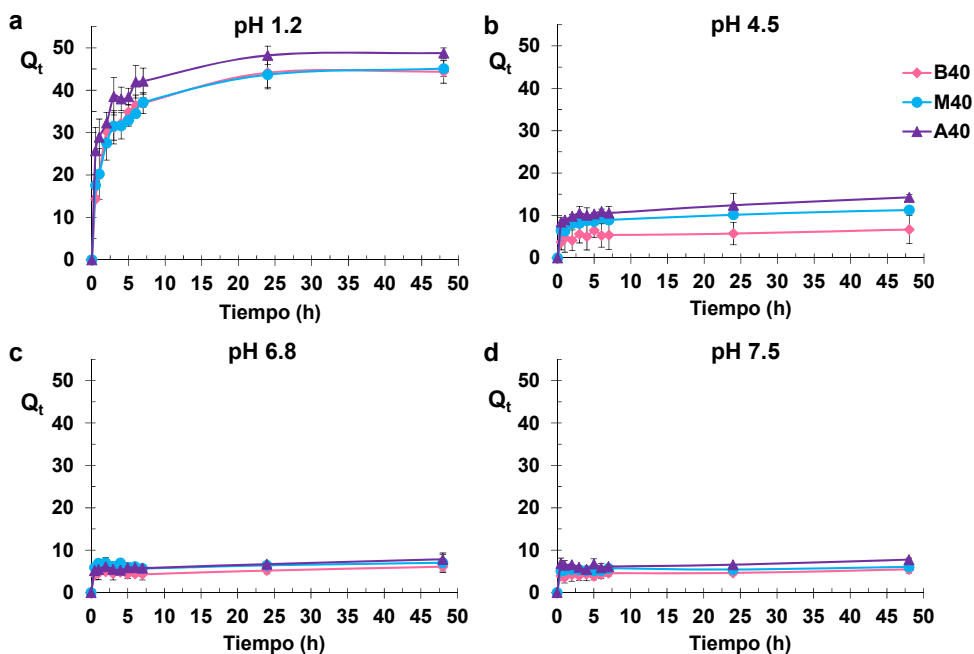


Figura 2.IV.18. Perfiles de hinchamiento de las muestras B40, M40 y A40 en a) pH 1.2, b) pH 4.5, c) pH 6.8 y d) pH 7.5. (Q_t : valor de hinchamiento a cada tiempo)

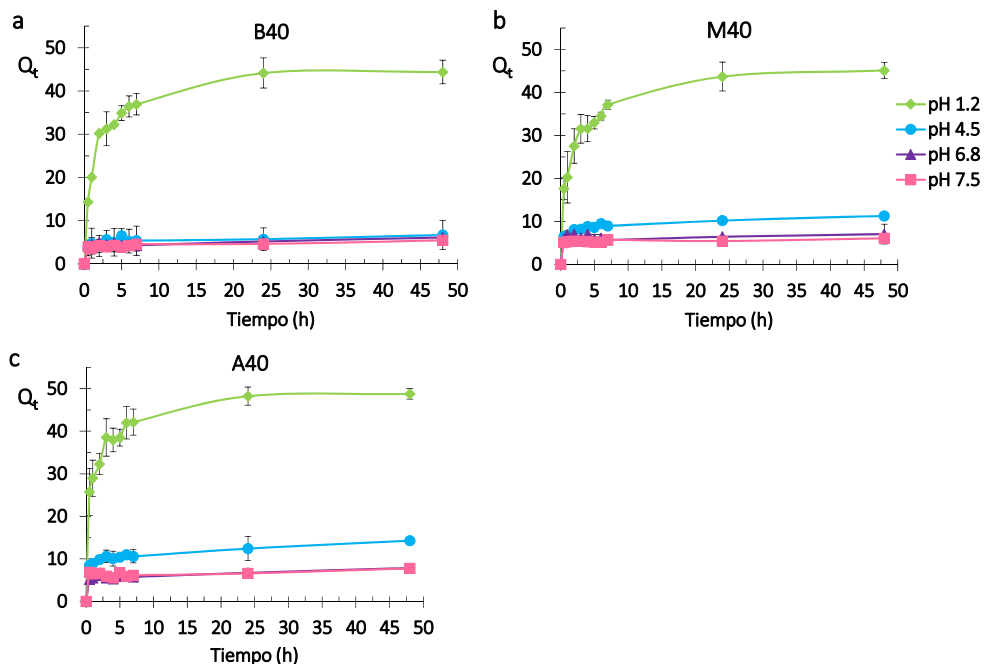


Figura 2.IV.19. Perfiles de hinchamiento a pH 1.2, pH 4.5, pH 6.8 y pH 7.5 de las muestras a) B40, b) M40 y c) A40. (Q_t : valor de hinchamiento a cada tiempo)

Para comparar los perfiles de hinchamiento se ha usado el cálculo del f_2 , cuyos resultados se muestran en la tabla 2.IV.11. En rojo se señalan los valores menores de 50, que indican que las curvas de hinchamiento son diferentes, y en verde los mayores de 50, para los hidrogeles con un perfil de hinchamiento similar. Las áreas marcadas en lila pertenecen a la comparativa entre distinto PM del quitosán para un mismo valor de pH; en cambio, las áreas marcadas en color gris abarcan la comparativa entre distintos pHs para un mismo tipo de hidrogel (mismo PM y porcentaje de entrecruzamiento).

En los resultados obtenidos se aprecia claramente la dependencia del pH en el hinchamiento del hidrogel, ya que a pH 1.2 el hinchamiento es significativamente mayor que en el resto de medios. Esto es debido a la protonación de los grupos amino del quitosán (ionización del polímero) que aumenta la repulsión electrostática entre las cadenas y la fuerza osmótica. Esta ionización produce un aumento en la hidrofilia de la red y las repulsiones electrostáticas favorecen la expansión de las cadenas, por lo que, en definitiva, aumenta la captación de medio acuoso. El hinchamiento a pH 6.8-7.5 es mínimo, mientras que a pH 4.5 es

ligeramente superior pero mucho menor que a pH 1.2. La explicación de este resultado es la misma, ya que a pH 4.5 los grupos amino del quitosán se encuentran protonados pero en menor proporción que a pH 1.2 (menor grado de ionización del polímero implica menor repulsión electrostática). En general, existen diferencias estadísticamente significativas en el hinchamiento de los hidrogeles en función del PM del polímero y del porcentaje de entrecruzamiento, ya que cuanto mayor es el PM del quitosán y menor es el grado de entrecruzamiento, mayor es el hinchamiento de la red polimérica.

	pH 1.2			pH 4.5			pH 6.8			pH 7.5		
	B40	M40	A40	B40	M40	A40	B40	M40	A40	B40	M40	A40
pH 1.2	B40											
	M40	70.33										
	A40	42.09	42.17									
pH 4.5	B40	10.62										
	M40		14.33		26.39							
	A40			14.16	22.06	43.25						
pH 6.8	B40	10.10			39.50							
	M40		12.31			33.49		26.74				
	A40			10.75			24.80	40.36	42.19			
pH 7.5	B40	9.80			33.83			51.65				
	M40		11.53			27.10			36.56		30.78	
	A40			11.17			26.88			46.61	24.88	40.22

Tabla 2.IV.11. Valores de f_2 de la comparativa entre curvas de hinchamiento para distintos PM de polímero en un determinado pH (áreas color lila) y para un mismo tipo de hidrogel (PM y porcentaje de entrecruzamiento) sometido a distintos valores de pH (áreas color gris). $f_2 < 50$, rojo, curvas diferentes; $f_2 \geq 50$, verde, curvas similares

Se ha realizado un análisis matemático de los perfiles de hinchamiento ajustando los datos a los modelos cinéticos de orden uno y de orden dos. Los valores de r^2 y de SSR para ambas cinéticas, así como los parámetros de hinchamiento en equilibrio (Q_∞) y constante de hinchamiento (K_∞) para la cinética elegida, se recogen en la tabla 2.IV.12.

		Orden uno		Orden dos			
		r^2	SSR	r^2	SSR	Q_{∞}	K_{∞} (h ⁻¹)
pH 1.2	B40	0.981	0.355	1.000	<0.001	45.78	33.52
	M40	0.927	0.572	0.999	<0.001	46.46	29.67
	A40	0.941	0.766	1.000	<0.001	49.79	49.61
pH 4.5	B40	0.128	6.918	0.994	0.282	6.64	6.32
	M40	0.612	1.421	0.998	0.036	11.36	9.45
	A40	0.569	1.033	0.995	0.051	14.33	9.74
pH 6.8	B40	0.284	1.634	0.992	0.446	6.09	4.27
	M40	0.004	32.326	0.997	0.118	7.00	12.43
	A40	0.420	1.261	0.993	0.223	7.85	5.35
pH 7.5	B40	0.276	1.039	0.993	0.492	5.44	4.38
	M40	0.106	1.705	0.997	0.161	6.01	10.72
	A40	0.062	2.979	0.992	0.262	7.69	7.05

Tabla 2.IV.12. Valores de r^2 y SSR de las cinéticas estudiadas y valores de Q_{∞} y K_{∞} de la cinética seleccionada (orden dos)

Los perfiles de hinchamiento de los hidrogeles a los valores de pH ensayados se ajustan perfectamente a una cinética de orden dos, explicada por Schott para el hinchamiento de polímeros semicristalinos entrecruzados, como la celulosa y la gelatina.⁵² Esta cinética de orden dos se ha justificado suponiendo que la velocidad de hinchamiento es directamente proporcional tanto al porcentaje de capacidad de hinchamiento remanente a un tiempo determinado como a la superficie interna de las zonas de la red polimérica capaces de hincharse pero que aún no han interactuado con el agua a tiempo t .

La figura 2.IV.20 muestra la variación del Q_{∞} , estimado según la cinética de orden dos, en función del pH (figura 2.IV.20 a) y en función del PM del quitosán (figura 3.IV.20 b). En estas gráficas se observa claramente la tendencia de hinchamiento, que concuerda con los datos obtenidos para los valores de hinchamiento en equilibrio calculados anteriormente. La influencia del PM del quitosán es apreciable principalmente a pH 4.5, con una diferencia del 6.64 al 14.33 en el Q_{∞} . La diferencia más notable es la existente entre los distintos valores de pH para un mismo hidrogel; como ya se ha explicado, el hinchamiento es mayor cuanto menor es el pH debido a que se trata de un polímero catiónico, susceptible de ionizarse a pH ácido.

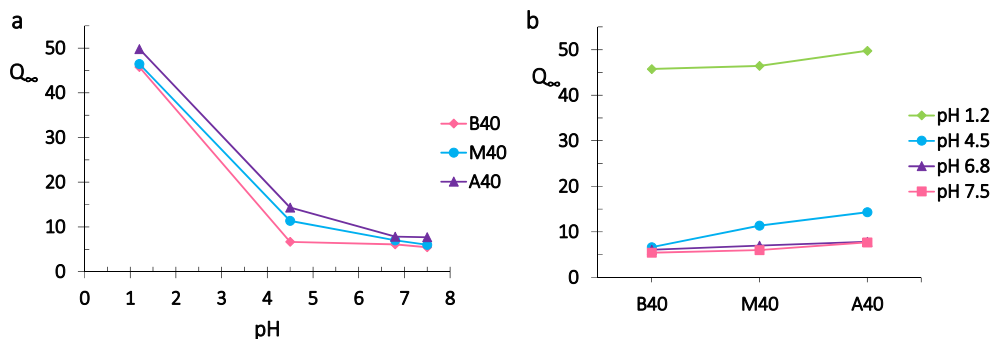


Figura 2.IV.20. a) Variación del Q_{∞} en función del pH para cada PM de hidrogel entrecruzado al 40%, b) Variación del Q_{∞} en función del PM para cada pH estudiado

6. Toxicidad en Caco-2

La toxicidad de los hidrogeles se ha valorado determinando el porcentaje de supervivencia celular tras la exposición de cultivos Caco-2 a los hidrogeles de quitosán MPM con distinto grado de entrecruzamiento. La tabla 2.IV.13 y figura 2.IV.21 muestra la supervivencia celular tras 24, 48 y 72 horas de exposición a las muestras evaluadas, comparado con un control positivo en ausencia de tratamiento. Los datos se expresan como porcentaje de la absorbancia del control no tratado.

	24 h	48 h	72 h
Control	99.35 ± 3.53	100.93 ± 4.46	101.53 ± 5.45
M24	97.63 ± 4.25	96.34 ± 3.26	95.30 ± 2.31
M40	95.10 ± 5.45	97.24 ± 4.72	89.34 ± 4.85
M80	94.45 ± 3.53	89.79 ± 4.13	88.64 ± 3.21
M160	84.37 ± 2.52	80.39 ± 5.36	79.25 ± 5.05

Tabla 2.IV.13. Porcentajes de supervivencia celular de los cultivos Caco-2 en ausencia (control) y presencia de los hidrogeles M24, M40, M80, M160 a las 24, 48 y 72 h

Para el hidrogel M24 no se observa toxicidad a ningún tiempo; en cambio, para el M40 a las 72 h, para el M80 a las 24 y 72 h, y para el M160 a todos los tiempos de exposición se observan diferencias estadísticamente significativas con el grupo control, es decir, el porcentaje de supervivencia celular es significativamente menor. La reducción de la supervivencia se sitúa en el rango del 10 al 20%, por lo que, en general, se puede concluir que los hidrogeles estudiados presentan baja toxicidad.

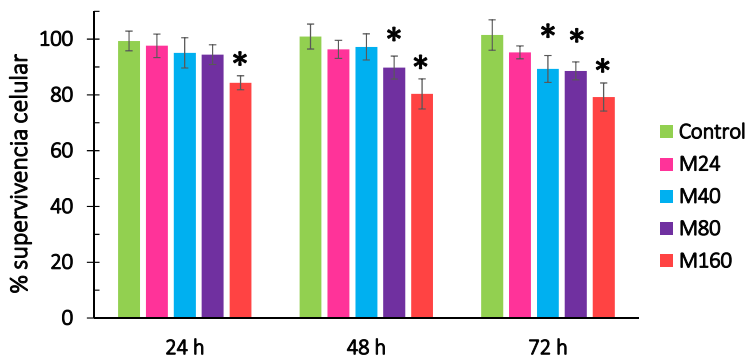


Figura 2.IV.21. Porcentajes de supervivencia celular de los cultivos Caco-2 en ausencia (control) y presencia de los hidrogeles M24, M40, M80, M160 a las 24, 48 y 72 h. (*) = Existen diferencias estadísticamente significativas respecto al control correspondiente

Los resultados de los cultivos celulares a largo plazo (un mes) han mostrado que la proliferación de las células expuestas a los hidrogeles es comparable a la de los controles, confirmando la naturaleza de baja toxicidad de los hidrogeles (datos no mostrados).

7. Citocompatibilidad

La capacidad de los hidrogeles para permitir el crecimiento de células Caco-2 sobre su superficie se ha evaluado mediante tinción con el kit de citotoxicidad/viabilidad LIVE/DEAD® y microscopía de las muestras. En la figura 2.IV.22 se muestran las imágenes obtenidas con contraste de fases y con fluorescencia; mediante el filtro para el verde se observan las células vivas teñidas con calceína AM y con el filtro para el rojo, las células muertas teñidas con homodímero-1 de etidio. Como se observa en las imágenes, la mayor parte de las células siguen vivas tras los 3 y 7 días de su sembrado, lo que demuestra la citocompatibilidad de los hidrogeles. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en los estudios de toxicidad y los descritos para hidrogeles proteicos entrecruzados con THPC.⁴¹

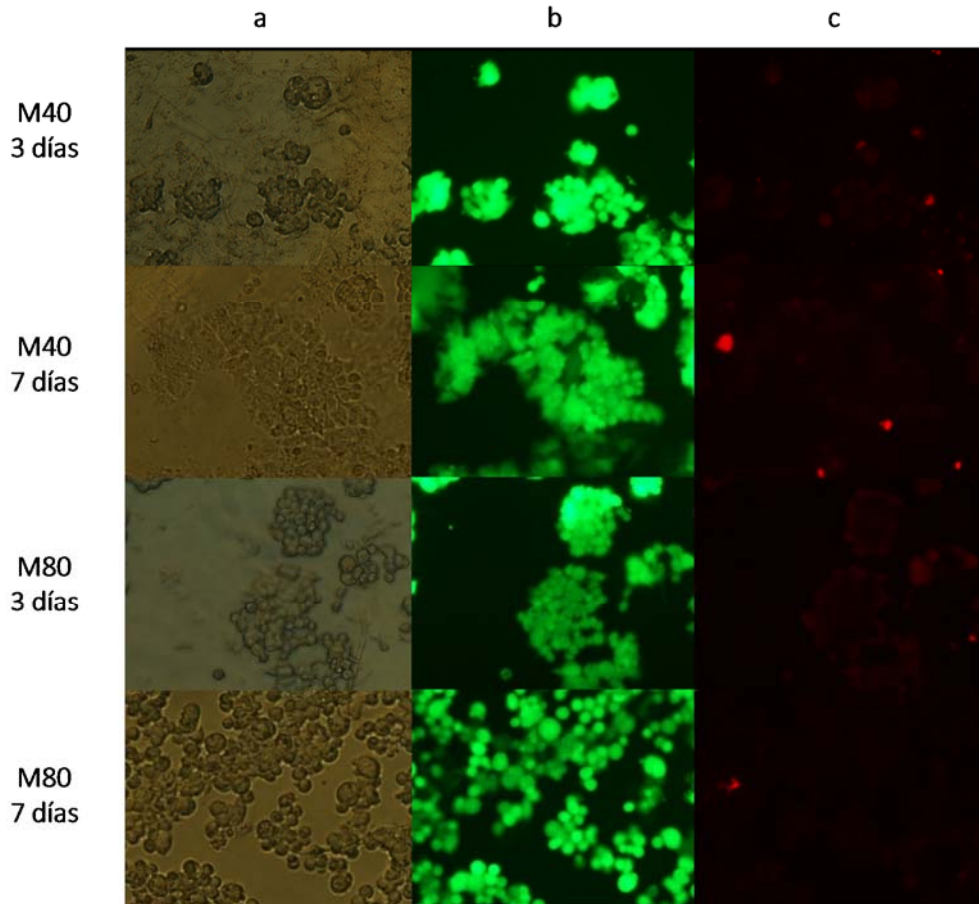


Figura 2.IV.22. Imágenes de microscopía obtenidas tras la tinción de células Caco-2 crecidas sobre los hidrogeles: a) imagen tomada con contraste de fases, b) imagen de células vivas tomada con fluorescencia (filtro para color verde), c) imagen de células muertas tomada con fluorescencia (filtro para color rojo)

8. Mucoadhesividad

8.1. Mucoadhesividad *in vitro*

Las propiedades mucoadhesivas se han evaluado *in vitro* usando el tejido gástrico e intestinal (duodeno, yeyuno, íleon y colon) de ratas. Los tejidos se han colocado sobre un plano inclinado 45 grados con un flujo continuo de tampón ajustado al pH correspondiente del segmento gastrointestinal estudiado. Los hidrogeles ensayados se han rehidratado en medio ácido y se han colocado sobre el

tejido gástrico; a los tiempos prefijados se ha cambiado el hidrogel de tejido y se ha cambiado el tampón utilizado. En la figura 2.IV.23 se muestran unas imágenes del ensayo. El control negativo estudiado se desplaza y cae del sistema durante los primeros cinco minutos. Para todos los hidrogeles ensayados y todas las condiciones de tejido-pH durante el tiempo del estudio, las muestras han permanecido adheridas sin desplazarse por acción de la gravedad o arrastre debido al flujo. Estos resultados sugieren que el sistema estudiado es mucoadhesivo, debido, entre otras causas, a la interacción entre las cargas positivas del quitosán y las cargas negativas de la mucina. No obstante, estos resultados se han contrastado posteriormente mediante un estudio *in vivo*, descrito a continuación.



Figura 2.IV.23. Imagen de los hidrogeles sobre el tejido gástrico tras una hora del inicio del experimento

8.2. Mucoadhesividad *in vivo*

Para confirmar la capacidad mucoadhesiva observada en el ensayo anterior y evaluar el tránsito gastrointestinal de los hidrogeles, se han administrado oralmente las formulaciones marcadas con rodamina y el sulfato de bario como control, y se ha estudiado su evolución por fluorescencia y rayos X, respectivamente. En la figura 2.IV.24 se muestran imágenes representativas de cada tiempo estudiado (1, 2 y 4.5 horas) para los hidrogeles entrecruzados al 160% de distinto PM y el control de tránsito gastrointestinal.

En las imágenes se aprecia como el sulfato de bario progresa de forma más compacta por el tracto gastrointestinal, a diferencia de los hidrogeles que van quedando retenidos en el mismo. Pasada una hora, el control se encuentra en el tramo medio del intestino delgado, a las dos horas al final del intestino delgado y a las 4.5 horas se encuentra retenido en el ciego. En el caso de los hidrogeles, las

señales fluorescentes en estómago a los distintos tiempos se deben al vaciado parcial de la cápsula que contiene la formulación; esto se ha confirmado al finalizar el estudio abriendo dicho órgano para comprobar si la señal fluorescente se debía a la retención del hidrogel fuera de la cápsula o a un problema de desintegración de la cápsula. Este problema se aprecia, en menor medida, en la imagen del control correspondiente al primer tiempo.

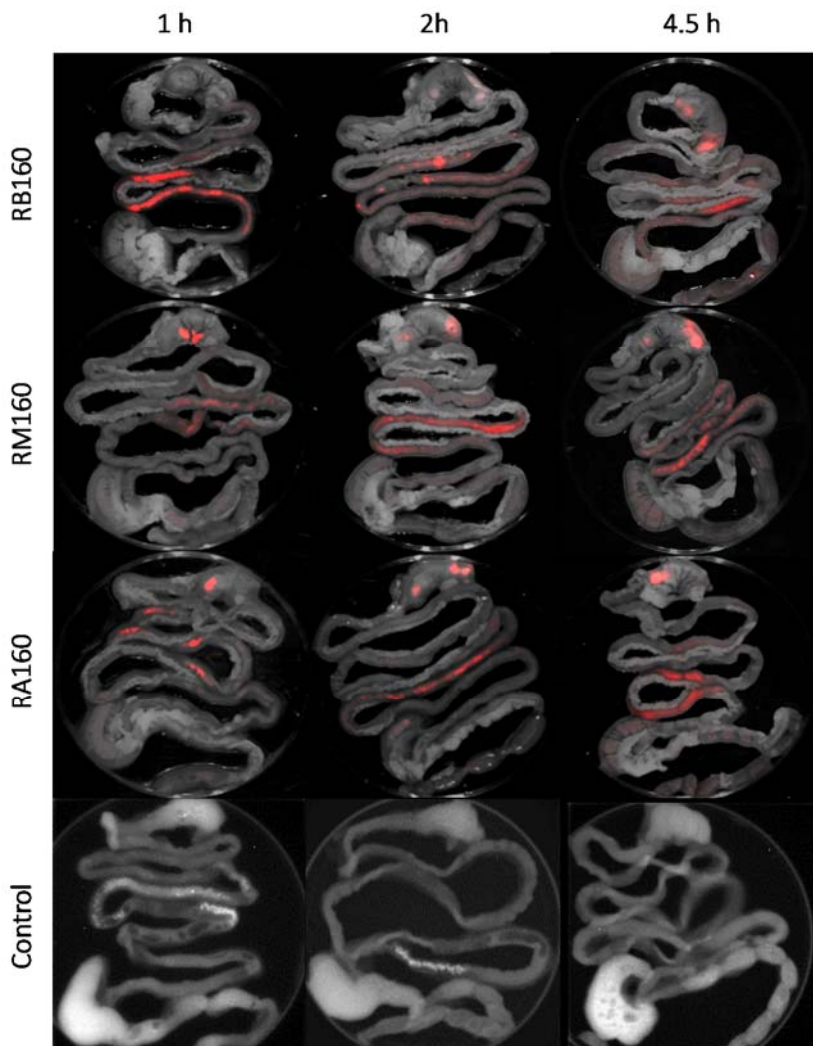


Figura 2.IV.24. Imágenes de fluorescencia de las formulaciones RB160, RM160, RA160 y de rayos X del sulfato de bario tras 1 h, 2 h y 4.5 h de la administración oral

La progresión de las formulaciones ensayadas y el control en el intestino se ha calculado en función de la longitud total del intestino y la localización de las muestras. La retención en estómago debida a la desintegración parcial de la cápsula se ha descartado en el cálculo. Los resultados se muestran en la figura 2.IV.25, donde las barras grises representan el 100% de la longitud total del tracto intestinal, las barras rosas la localización de los hidrogeles y las negras, la localización del control.

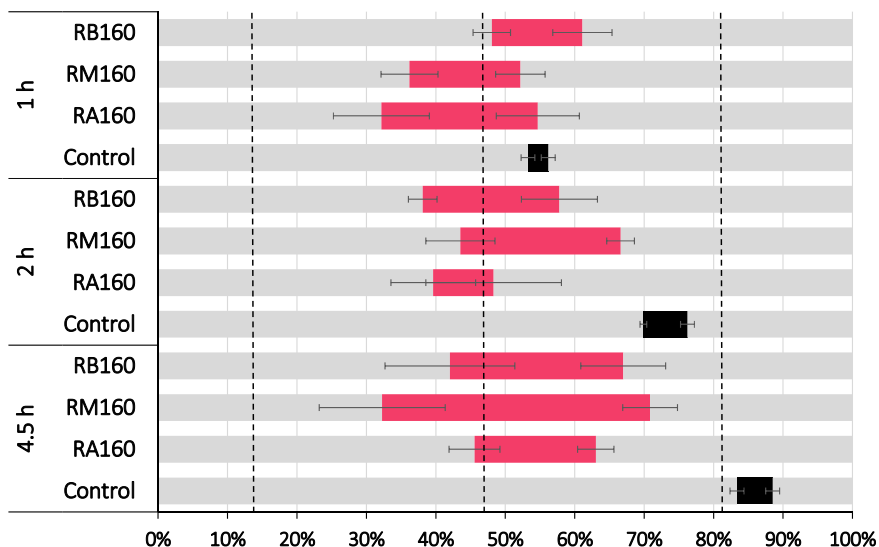


Figura 2.IV.25. Representación de la progresión de los hidrogeles (rosa) y el sulfato de bario (negro) respecto a la longitud del intestino completo (gris). Las líneas punteadas delimitan los tramos intestinales: duodeno, yeyuno, íleon e intestino grueso

El intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) representa el $81 \pm 2.5\%$ de la longitud total intestinal y el intestino grueso, el $19 \pm 2.5\%$ restante. No existen diferencias apreciables entre las formulaciones y el control tras una hora de la administración. A las dos horas, el sulfato de bario ha progresado más rápidamente; en el caso de los hidrogeles, su localización es más extensa debido a la distinta progresión (unos fragmentos son retenidos debido a la adhesión y otros avanzan más rápido). Pasadas 4.5 horas, el sulfato de bario se localiza entre el 80-90% de la longitud del intestino, mientras que los hidrogeles se encuentran retenidos entre el 30-70% de la longitud intestinal total. No se observan diferencias entre los distintos PM del polímero.

En conclusión, la capacidad mucoadhesiva del quitosán y, por ende, de los hidrogeles, permite mejorar las características de éstos como sistemas de liberación. La mucoadhesión del sistema prolonga el tiempo de permanencia en el tracto gastrointestinal y, en consecuencia, el tiempo de absorción que dispone el fármaco que se va liberando durante este periodo.

9. Liberación

Los estudios de liberación se han realizado en un medio con variación de pH a distintos tiempos para simular lo máximo posible la realidad fisiológica.

En base a los resultados obtenidos en los ensayos de hinchamiento se prevé que el hidrogel libere en mayor proporción el fármaco a pH ácido, pero dada su capacidad de mucoadhesión en el tracto gastrointestinal se pretende averiguar si es capaz de actuar como sistema de liberación modificada para la administración del agente antitumoral. Los tiempos de exposición a cada uno de los pHs se han establecido en base a los datos existentes en humanos, fijando un tiempo de permanencia en estómago de 1.5 horas para comprobar si, tras someter el sistema a un largo periodo de tiempo al pH de mayor hinchamiento, el hidrogel sigue manteniendo su capacidad de liberación prolongada en la zona de absorción de la CPT.

La tabla 2.IV.14 resume los porcentajes de liberación de fármaco del último tiempo de muestreo para cada pH. Los perfiles de liberación de los hidrogeles se muestran en la figura 2.IV.26. Los cambios de pH se han producido inmediatamente después de la toma de muestra a los tiempos: 1.5, 1.75 y 4.5 horas.

De los resultados obtenidos se concluye que aproximadamente un 30% del fármaco contenido en el hidrogel se libera tras 1.5 horas a pH 1.2, quedando un 70% restante susceptible de liberación a lo largo del intestino. A las 48 horas, los hidrogeles han liberado entre un 65 y un 97%, según la composición del hidrogel. Este sistema polimérico presenta una liberación modificada del fármaco capaz de suministrar el activo terapéutico al menos durante 48 horas.

		Tiempo (h)			
		1.5	1.75	4.5	48
24%	NB24-CPT	30.99 ± 3.04	31.45 ± 3.12	43.45 ± 0.72	82.05 ± 3.49
	NM24-CPT	37.97 ± 4.42	40.09 ± 4.19	54.17 ± 1.87	93.50 ± 6.74
	NA24-CPT	34.30 ± 6.95	35.00 ± 8.61	51.04 ± 3.60	97.85 ± 0.26
40%	NB40-CPT	27.94 ± 6.66	29.66 ± 2.26	40.30 ± 3.42	79.44 ± 5.02
	NM40-CPT	32.70 ± 9.28	35.45 ± 10.67	49.83 ± 13.54	84.52 ± 7.79
	NA40-CPT	37.92 ± 4.00	39.03 ± 6.18	55.79 ± 4.14	87.88 ± 6.80
80%	NB80-CPT	28.81 ± 1.06	30.56 ± 5.16	47.38 ± 0.63	72.94 ± 16.45
	NM80-CPT	32.35 ± 8.51	32.93 ± 4.34	48.19 ± 12.96	86.38 ± 6.88
	NA80-CPT	33.68 ± 9.45	37.58 ± 13.14	52.35 ± 10.21	86.66 ± 15.67
160%	NB160-CPT	30.70 ± 1.99	27.34 ± 4.80	46.58 ± 1.30	67.58 ± 4.01
	NM160-CPT	30.72 ± 2.08	32.52 ± 3.07	46.29 ± 5.82	65.84 ± 1.32
	NA160-CPT	37.52 ± 8.74	40.32 ± 10.52	53.57 ± 19.11	78.45 ± 18.35

Tabla 2.IV.14. Porcentaje de liberación de CPT al final de la exposición a cada pH desde los hidrogeles de distinto PM y porcentaje de entrecruzamiento

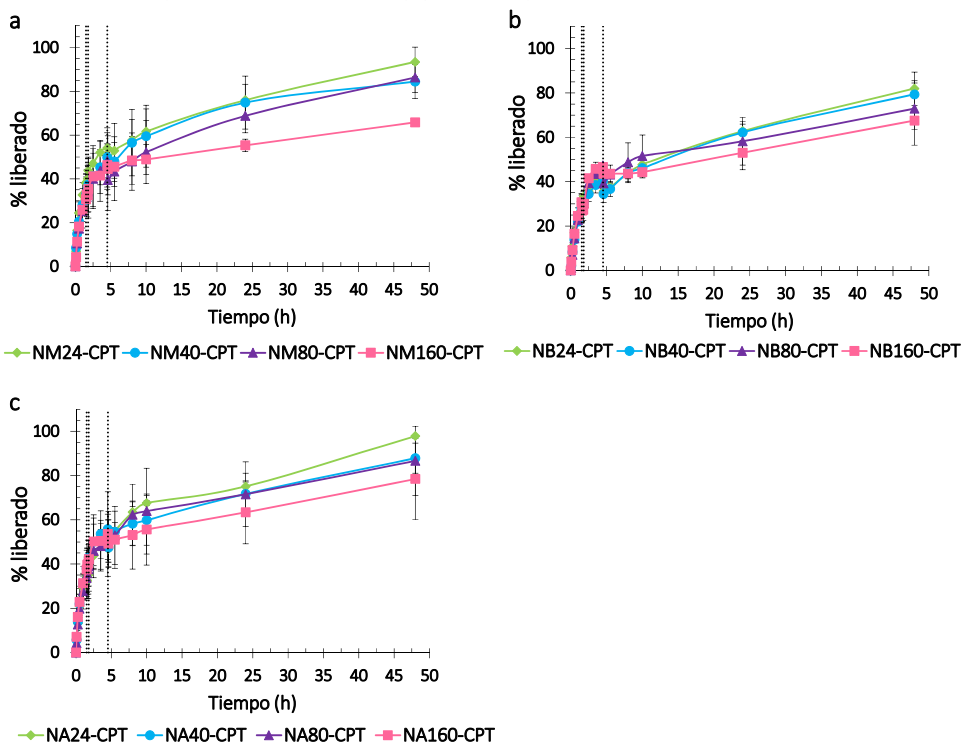


Figura 2.IV.26. Perfiles de liberación de CPT en función del porcentaje de entrecruzamiento (24, 40, 80 y 160%) para los distintos PM de quitosán: a) BPM, b)

MPM, c) APM. Las líneas punteadas señalan los tiempos a los que se han producido cambios de pH en el medio

Para comparar los perfiles de liberación se ha usado el parámetro f_2 . Los valores de f_2 para los hidrogeles de distinto porcentaje de entrecruzamiento y distinto PM de polímero se recogen en la tabla 2.IV.15. Para facilitar la comprensión de la tabla, los hidrogeles estudiados en la liberación de CPT se han escrito en función del PM del polímero (BPM, MPM y APM) y el porcentaje de entrecruzamiento. En color gris se han señalado las comparativas entre distintos PM de quitosán para un mismo porcentaje de reticulación y en lila las comparativas entre distinto porcentaje de entrecruzamiento para un mismo PM de polímero.

		BPM				MPM				APM							
		24%	40%	80%	160%	24%	40%	80%	160%	24%	40%	80%	160%				
BPM	24%																
	40%													67.55			
	80%													64.29	61.41		
	160%													58.14	55.22	65.96	
MPM	24%	47.41															
	40%	43.36													62.51		
	80%	62.61													54.58	53.90	
	160%	65.71													46.48	49.93	56.84
APM	24%	48.31															
	40%	42.44													59.62	65.91	
	80%	49.34													55.79	71.51	71.19
	160%	47.26													52.30	55.68	67.54

Tabla 2.IV.15. Valores de f_2 para las comparativas de los perfiles por PM (gris) y por grado de entrecruzamiento (lila). $f_2 < 50$, rojo, curvas diferentes; $f_2 \geq 50$, verde, curvas similares

En base a los valores de f_2 se concluye que existen diferencias entre los hidrogeles formados por quitosán BPM y APM para todos los porcentajes de reticulación y entre los BPM y MPM entrecruzados al 24 y 40% con THPC. Respecto al porcentaje de entrecruzamiento, sólo se han podido establecer diferencias estadísticamente significativas entre el quitosán MPM reticulado al 160% y el reticulado al 24 y 40%.

A pesar de que en las imágenes de SEM no se aprecian diferencias entre las estructuras de los hidrogeles con quitosán de distintos PM, se ha observado experimentalmente en los ensayos de liberación e hinchamiento que cuanto mayor

es el PM del polímero, mayor es la relajación de las cadenas, implicando un mayor porcentaje de hinchamiento y liberación. Una posible explicación a este fenómeno es la existencia de impedimento estérico que las cadenas de mayor longitud ofrecen al movimiento, lo que, en una gelificación rápida, conlleva una menor probabilidad de entrecruzamiento entre los grupos reactivos de una misma molécula de THPC y distintas cadenas del polímero. La figura 2.IV.27 ilustra dicho fenómeno.

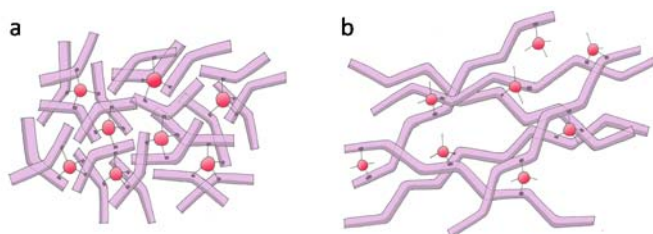


Figura 2.IV.27. Representación de entrecruzamiento con THPC (puntos rojos) entre cadenas de quitosán (líneas lilas) de a) bajo PM y b) alto PM

Los resultados obtenidos de los perfiles de liberación se han estudiado matemáticamente aplicando la ecuación de Korsmeyer-Peppas para determinar la cinética de liberación y averiguar los principales medios por los que se produce la liberación del activo terapéutico. La tabla 2.IV.16 recoge los valores del exponente difusional (n) y la constante cinética (K) así como la SSR obtenida tras el ajuste de los datos para la obtención de dichos parámetros.

	n	$K (h^{-1})$	SSR
NB24-CPT	0.30	0.25	$1.95 \cdot 10^{-2}$
NB40-CPT	0.33	0.22	$2.10 \cdot 10^{-2}$
NB80-CPT	0.29	0.25	$4.96 \cdot 10^{-2}$
NB160-CPT	0.26	0.26	$5.49 \cdot 10^{-2}$
NM24-CPT	0.31	0.32	$2.17 \cdot 10^{-2}$
NM40-CPT	0.31	0.29	$9.41 \cdot 10^{-3}$
NM80-CPT	0.32	0.26	$2.44 \cdot 10^{-2}$
NM160-CPT	0.24	0.28	$4.22 \cdot 10^{-2}$
NA24-CPT	0.40	0.28	$8.68 \cdot 10^{-3}$
NA40-CPT	0.28	0.33	$4.58 \cdot 10^{-2}$
NA80-CPT	0.40	0.28	$1.18 \cdot 10^{-2}$
NA160-CPT	0.24	0.33	$4.60 \cdot 10^{-2}$

Tabla 2.IV.16. Valores de n y K obtenidos ajustando el modelo cinético de Korsmeyer-Peppas a los valores experimentales de liberación y SSR de dicho ajuste

En todos los casos el exponente difusional es inferior a 0.45 por lo que se concluye que la liberación se produce por difusión a través de la matriz hinchada y a través de los poros. Estos valores de n también concuerdan con una liberación inicial tipo *burst* debida a la mayor expansión de las cadenas y el aumento del tamaño de los poros por la repulsión de las aminas protonadas a pH ácido, lo que facilita la liberación de las moléculas de CPT hacia el exterior.

V. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

Conclusiones

De acuerdo con los resultados de solubilidad y permeabilidad obtenidos, la CPT puede considerarse un fármaco clase II para bajas concentraciones ($\leq 10 \mu\text{M}$) en intestino delgado y un fármaco clase IV para altas concentraciones ($\geq 50 \mu\text{M}$) en intestino delgado y cualquier concentración en intestino grueso.

Se ha elaborado un nuevo sistema de liberación modificada de fármacos basado en un hidrogel compuesto por quitosán y THPC; el método de formación de dicho hidrogel es simple, rápido y económico. El entrecruzamiento covalente de la red polimérica se ha realizado por condensación de los grupos amino del quitosán con los grupos hidroximetilo del THPC a través de una reacción de Mannich. La reticulación del polímero disminuye la estabilidad térmica del sistema y amorfiza el compuesto; la estructura tridimensional es similar en los hidrogeles con distinto peso molecular.

Se trata de hidrogeles sensibles al pH, con un hinchamiento mayor a pH 1.2 debido a la protonación de los grupos amino de su estructura. El peso molecular del polímero y el grado de reticulación influyen en el hinchamiento, ya que cuanto mayor es el peso molecular y menor es el porcentaje de entrecruzamiento mayor es el hinchamiento del hidrogel. El hinchamiento de los hidrogeles sigue una cinética de orden dos que supone que la velocidad de hinchamiento es directamente proporcional al porcentaje de la capacidad de hinchamiento remanente a un tiempo determinado.

Se ha demostrado la citocompatibilidad y la baja toxicidad de los hidrogeles en células de carcinoma de colon humano.

Los hidrogeles presentan tiempos de tránsito gastrointestinal más elevados que el sistema de referencia empleado y favorecen la retención de la formulación a lo largo del intestino delgado.

Los perfiles de liberación se ajustan al modelo matemático Korsmeyer-Peppas, donde la constante cinética toma valores de 0.22 a 0.33 h⁻¹ y el exponente difusional es, en todos los casos, inferior a 0.45. Esto indica que la liberación se produce por difusión a través de la matriz hinchada y a través de los poros. Existen diferencias de liberación entre los hidrogeles formados por quitosán de BPM y quitosán de APM.

En definitiva, en este trabajo se ha propuesto un nuevo sistema de liberación de fármacos tipo hidrogel que podría permitir el tratamiento oral con CPT. Este sistema, que controla su liberación, aportaría bajas concentraciones del fármaco en el lugar de absorción, evitando la saturación de los transportadores, aumentando así la permeabilidad aparente, y reduciendo los efectos adversos derivados de la exposición intestinal a altas concentraciones de fármaco.

Conclusions

According to the results of solubility and permeability obtained, camptothecin can be considered a class II drug for low concentrations ($\leq 10 \mu\text{M}$) in small intestine and class IV drug for high concentrations ($\geq 50 \mu\text{M}$) in small intestine and any concentration in the large intestine.

It has been developed a new modified drug release system based on a hydrogel composed by chitosan and THPC; the formation method is simple, fast and

inexpensive. Covalent crosslinking of the polymer network has been made by condensation of the chitosan amino groups with the THPC hydroxymethyl groups by a Mannich reaction. Crosslinking the polymer decreases thermal stability of the system and makes it more amorphous; the tridimensional structure is similar in hydrogels with different molecular weight.

The hydrogels are pH-sensitive and show a higher swelling capacity at pH 1.2 due to protonation of the amino groups of its structure. The molecular weight of the polymer and the degree of crosslinking influence swelling behaviour. The larger the molecular weight and the lower the percentage of crosslinking, the greater the swelling of the hydrogel is. Swelling follows a second order kinetics which implies that the swelling rate is directly proportional to the percentage of swelling capacity still available at a given time.

It has been demonstrated the hydrogels cytocompatibility and low toxicity in human colon carcinoma cell line.

Gastrointestinal transit time of the hydrogels is higher than that of the reference used and they favor the formulation retention along the small intestine.

The release profiles are adjusted to Korsmeyer-Peppas mathematical model, with kinetic constant values ranging from 0.22 to 0.33 h⁻¹ and the diffusional exponent is, in all cases, less than 0.45. This indicates that drug release occurs by diffusion through the swollen matrix and through the pores. There are differences in the release profiles of hydrogels formed by low and high molecular weight chitosan.

In this research work it has been proposed a new hydrogel drug delivery system that would allow oral treatment with CPT. This system, that controls the antitumor drug release, would provide constant low drug concentrations in small intestine, avoiding transport saturation (thereby increasing the apparent permeability) and reducing adverse effects resulting from intestinal exposure to high drug concentrations.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Mudie D.M., Amidon G.L., Amidon G.E. Physiological parameters for oral delivery and in vitro testing. *Mol. Pharm.* 2010; 7 (5): 1388-1405.
2. Cook M.T., Tzortzis G., Charalampopoulos D., Khutoryanskiy V.V. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *J. Control Release* 2012; 162 (1): 56-67.
3. Amidon G.L., Lennernas H., Shah V.P., Crison J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm. Res.* 1995; 12 (3): 413-420.
4. Guideline on the Investigation of Bioequivalence. En: Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) E.M.A.E., editor. London, 2010.
5. CDER. Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System: U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration, 2000.

6. Zur M., Gasparini M., Wolk O., Amidon G.L., Dahan A. The low/high BCS permeability class boundary: physicochemical comparison of metoprolol and labetalol. *Mol. Pharm.* 2014; 11 (5): 1707-1714.
7. Bromberg L. Intelligent hydrogels for the oral delivery of chemotherapeutics. *Expert Opin Drug Deliv* 2005; 2 (6): 1003-1013.
8. O'Neill V.J., Twelves C.J. Oral cancer treatment: developments in chemotherapy and beyond. *Br. J. Cancer* 2002; 87 (9): 933-937.
9. Bromberg L. Polymeric micelles in oral chemotherapy. *J. Control Release* 2008; 128 (2): 99-112.
10. National Patient Safety Agency. Oral anti-cancer medicines: Risks of incorrect dosing. 2008.
11. Blanchette J., Peppas N.A. Oral chemotherapeutic delivery: design and cellular response. *Ann. Biomed. Eng.* 2005; 33 (2): 142-149.
12. Blanchette J., Peppas N.A. Cellular evaluation of oral chemotherapy carriers. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2005; 72 (4): 381-388.
13. Schellens J.H., Creemers G.J., Beijnen J.H., Rosing H., de Boer-Dennert M., McDonald M., et al. Bioavailability and pharmacokinetics of oral topotecan: a new topoisomerase I inhibitor. *Br. J. Cancer* 1996; 73 (10): 1268-1271.
14. von Pawel J., Gatzemeier U., Pujol J.L., Moreau L., Bildat S., Ranson M., et al. Phase II comparator study of oral versus intravenous topotecan in patients with chemosensitive small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 2001; 19 (6): 1743-1749.
15. Giovanella B.C., Stehlin J.S., Wall M.E., Wani M.C., Nicholas A.W., Liu L.F., et al. DNA topoisomerase I--targeted chemotherapy of human colon cancer in xenografts. *Science* 1989; 246 (4933): 1046-1048.
16. Thomas C.J., Rahier N.J., Hecht S.M. Camptothecin: current perspectives. *Bioorg. Med. Chem.* 2004; 12 (7): 1585-1604.
17. Legarza K., Yang L.X. New molecular mechanisms of action of camptothecin-type drugs. *Anticancer Res.* 2006; 26 (5A): 3301-3305.
18. Gerrits C.J., de Jonge M.J., Schellens J.H., Stoter G., Verweij J. Topoisomerase I inhibitors: the relevance of prolonged exposure for present clinical development. *Br. J. Cancer* 1997; 76 (7): 952-962.
19. Rodríguez Berna G. Tesis Doctoral: Estudios semisintéticos y biológicos de 20-(S)-Camptotecina en terapia antitumoral y obtención de materiales porosos en condiciones biomiméticas. Universitat Politècnica de Valencia, 2015.

20. Fassberg J., Stella V.J. A kinetic and mechanistic study of the hydrolysis of camptothecin and some analogues. *J. Pharm. Sci.* 1992; 81 (7): 676-684.
21. Khan A.R., Magnusson J.P., Watson S., Grabowska A.M., Wilkinson R.W., Alexander C., et al. Camptothecin prodrug block copolymer micelles with high drug loading and target specificity. *Polym. Chem.* 2014; 5 (18): 5320-5329.
22. Fox M.E., Guillaudeau S., Fréchet J.M.J., Jerger K., Macaraeg N., Szoka F.C. Synthesis and In Vivo Antitumor Efficacy of PEGylated Poly(l-lysine) Dendrimer–Camptothecin Conjugates. *Mol. Pharm.* 2009; 6 (5): 1562-1572.
23. Barreiro-Iglesias R., Bromberg L., Temchenko M., Hatton T.A., Concheiro A., Alvarez-Lorenzo C. Solubilization and stabilization of camptothecin in micellar solutions of pluronic-g-poly(acrylic acid) copolymers. *J. Control Release* 2004; 97 (3): 537-549.
24. Soukasene S., Toft D.J., Moyer T.J., Lu H., Lee H.-K., Standley S.M., et al. Antitumor Activity of Peptide Amphiphile Nanofiber-Encapsulated Camptothecin. *ACS Nano* 2011; 5 (11): 9113-9121.
25. Li R., Shu C., Wang W., Wang X., Li H., Xu D., et al. Encapsulation of 10-Hydroxy Camptothecin in Supramolecular Hydrogel as an Injectable Drug Delivery System. *J. Pharm. Sci.* 2015; 104 (7): 2266-2275.
26. Gupta E., Vyas V., Ahmed F., Sinko P., Cook T., Rubin E. Pharmacokinetics of orally administered camptothecins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2000; 922: 195-204.
27. Ahmed A.E., Jacob S., Giovannella B.C., Kozielski A.J., Stehlin J.S., Jr., Liehr J.G. Influence of route of administration on [3H]-camptothecin distribution and tumor uptake in CASE-bearing nude mice: whole-body autoradiographic studies. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1996; 39 (1-2): 122-130.
28. Laloo A.K., Luo F.R., Guo A., Paranjpe P.V., Lee S.H., Vyas V., et al. Membrane transport of camptothecin: facilitation by human P-glycoprotein (ABCB1) and multidrug resistance protein 2 (ABCC2). *BMC Med* 2004; 2: 16.
29. Blanchette J., Kavimandan N., Peppas N.A. Principles of transmucosal delivery of therapeutic agents. *Biomed. Pharmacother.* 2004; 58 (3): 142-151.
30. Schoener C.A., Hutson H.N., Peppas N.A. pH-responsive hydrogels with dispersed hydrophobic nanoparticles for the oral delivery of chemotherapeutics. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2013; 101 (8): 2229-2236.
31. Bromberg L., Temchenko M., Hatton T.A. Dually Responsive Microgels from Polyether-Modified Poly(acrylic acid): Swelling and Drug Loading. *Langmuir* 2002; 18 (12): 4944-4952.

32. Bromberg L., Temchenko M., Hatton T.A. Smart Microgel Studies. Polyelectrolyte and Drug-Absorbing Properties of Microgels from Polyether-Modified Poly(acrylic acid). *Langmuir* 2003; 19 (21): 8675-8684.
33. Alakhov V., Pietrzynski G., Patel K., Kabanov A., Bromberg L., Hatton T.A. Pluronic block copolymers and Pluronic poly(acrylic acid) microgels in oral delivery of megestrol acetate. *J. Pharm. Pharmacol.* 2004; 56 (10): 1233-1241.
34. Bhattarai N., Gunn J., Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010; 62 (1): 83-99.
35. Speer D.P., Chvapil M., Eskelson C.D., Ulreich J. Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials. *J. Biomed. Mater. Res.* 1980; 14 (6): 753-764.
36. Zeiger E., Gollapudi B., Spencer P. Genetic toxicity and carcinogenicity studies of glutaraldehyde--a review. *Mutat. Res.* 2005; 589 (2): 136-151.
37. Huang L.L., Sung H.W., Tsai C.C., Huang D.M. Biocompatibility study of a biological tissue fixed with a naturally occurring crosslinking reagent. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998; 42 (4): 568-576.
38. Sung H.W., Huang R.N., Huang L.L., Tsai C.C. In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 1999; 10 (1): 63-78.
39. Mi F.L., Tan Y.C., Liang H.C., Huang R.N., Sung H.W. In vitro evaluation of a chitosan membrane cross-linked with genipin. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2001; 12 (8): 835-850.
40. Reeves W.A., Guthrie J.D. Intermediate for Flame-Resistant Polymers - Reactions of Tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium Chloride. *Ind. Eng. Chem.* 1956; 48 (1): 64-67.
41. Chung C., Lampe K.J., Heilshorn S.C. Tetrakis(hydroxymethyl) phosphonium chloride as a covalent cross-linking agent for cell encapsulation within protein-based hydrogels. *Biomacromolecules* 2012; 13 (12): 3912-3916.
42. Doluisio J.T., Billups N.F., Dittert L.W., Sugita E.T., Swintosky J.V. Drug Absorption I: An In Situ Rat Gut Technique Yielding Realistic Absorption Rates. *J. Pharm. Sci.*; 58 (10): 1196-1200.
43. Ferrando R., Garrigues T.M., Bermejo M.V., Martin-Algarra R., Merino V., Polache A. Effects of ethanol on intestinal absorption of drugs: in situ studies with ciprofloxacin analogs in acute and chronic alcohol-fed rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 1999; 23 (8): 1403-1408.

44. Tugcu-Demiroz F., Gonzalez-Alvarez I., Gonzalez-Alvarez M., Bermejo M. Validation of phenol red versus gravimetric method for water reabsorption correction and study of gender differences in Doluisio's absorption technique. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2014; 62: 105-110.
45. Farmacopea Europea. Consejo de Europa, 4ªEd. . 2002.
46. Ahmed F., Vyas V., Saleem A., Li X.G., Zamek R., Cornfield A., et al. High-performance liquid chromatographic quantitation of total and lactone 20(S)camptothecin in patients receiving oral 20(S)camptothecin. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998; 707 (1-2): 227-233.
47. Dahan A., Miller J.M., Amidon G.L. Prediction of Solubility and Permeability Class Membership: Provisional BCS Classification of the World's Top Oral Drugs. *The AAPS Journal* 2009; 11 (4): 740-746.
48. Volpe D.A. Application of Method Suitability for Drug Permeability Classification. *The AAPS Journal* 2010; 12 (4): 670-678.
49. Marino A.M., Yarde M., Patel H., Chong S., Balimane P.V. Validation of the 96 well Caco-2 cell culture model for high throughput permeability assessment of discovery compounds. *Int. J. Pharm.* 2005; 297 (1-2): 235-241.
50. Fassio F., Nolli M.L., Golzio L., Bertolino M., Canali S., Barone D. Validation of the CACO-2 Test for Intestinal Permeability Assessment of Drugs: The Usefulness of PAPP, the Apparent Permeability Coefficient. En: *Animal Cell Technology: Products from Cells, Cells as Products: Proceedings of the 16th ESACT Meeting April 25–29, 1999, Lugano, Switzerland*. Dordrecht. Springer Netherlands, 2002:551-553.
51. Kurita K., Yoshino H., Nishimura S.-I., Ishii S. Preparation and biodegradability of chitin derivatives having mercapto groups. *Carbohydr. Polym.* 1993; 20 (4): 239-245.
52. Schott H. Kinetics of swelling of polymers and their gels. *J. Pharm. Sci.* 1992; 81 (5): 467-470.

Capítulo 3
Hidrogeles iónicos basados en
un reticulante aniónico

I. INTRODUCCIÓN

La piel es el órgano más extenso del cuerpo, supone el 10-15% del peso corporal, y cumple multitud de funciones fisiológicas. La función primaria de la piel es servir de barrera de protección frente a la exposición a factores externos como toxinas, microorganismos, luz ultravioleta y daños mecánicos. Asimismo, se encarga de mantener la homeostasia de los fluidos corporales evitando la evaporación excesiva de agua interna, regula la temperatura corporal, tiene funciones de almacenamiento y metabolismo, recibe estímulos sensoriales y mantiene la forma del cuerpo.^{1,2}

Son múltiples las patologías y alteraciones que pueden afectar a la piel: alteraciones de la pigmentación, psoriasis, pénfigo, dermatitis, infecciones cutáneas bacterianas (celulitis, forúnculos, impétigo, etc.), micosis cutáneas (pitiriasis versicolor, dermatofitosis, candidiasis, etc.), infecciones cutáneas por virus (herpes simple, virus Varicela-Zoster, virus del papiloma humano, etc.), parasitosis (pediculosis, sarna, etc.), tumores cutáneos malignos (melanoma, etc.),

úlceras cutáneas, acné y lesiones cutáneas, entre otros.³ Dichas enfermedades y alteraciones de la piel, junto con ciertos signos y síntomas asociados a inflamación y/o dolor del sistema muscular, nervioso e incluso óseo, pueden ser tratadas de forma local mediante formulaciones desarrolladas para tal fin.

Las formas farmacéuticas comúnmente utilizadas para la administración tópica de principios activos a nivel local incluyen soluciones, suspensiones, tinturas, lociones, geles, ungüentos, pomadas, cremas y pastas.³ Las soluciones, suspensiones, tinturas y lociones se aplican en forma de compresas húmedas, nebulizaciones, baños, etc. Las soluciones tienen los fármacos disueltos, mientras que las suspensiones contienen partículas no disueltas. Las tinturas son soluciones que contienen colorantes que tiñen la piel, y las lociones son aquellas soluciones cuyo componente fundamental es el alcohol, propilenglicol o ciertos hidrocarburos. Los geles son fluidos semisólidos que se licuan en contacto con la piel dejando una capa no grasa y no oclusiva. Otras formas farmacéuticas con mayor consistencia son los ungüentos, pomadas, cremas y pastas, debido a la presencia de componentes grasos en su formulación. La mayor o menor presencia de dichos componentes les confiere distintas propiedades (creación de una capa impermeable que aumente la hidratación y la absorción percutánea de fármacos, protección mecánica de la piel, etc.) que las adecua para determinadas aplicaciones.

Es importante aclarar que las formas farmacéuticas tópicas destinadas a ejercer un efecto local en la piel no están exentas de poder originar niveles plasmáticos variables de fármaco, aunque se intenta que la absorción a nivel sistémico sea mínima.

En el caso de la administración transdérmica o percutánea, los fármacos aplicados sobre la piel se absorben hasta llegar a los vasos sanguíneos y alcanzar circulación sistémica. Con esta finalidad se emplean los sistemas terapéuticos transdérmicos o parches transdérmicos que son sistemas de liberación sostenida cuya función es suministrar el principio activo a una velocidad determinada para mantener concentraciones plasmáticas constantes. Se trata de sistemas multicapa con una cubierta protectora exterior impermeable (y, en ocasiones, oclusiva), una zona que contiene el principio activo y excipientes (reservorio o matriz), un módulo de liberación (membrana controladora de la liberación o matriz) y una capa

adhesiva. Además, contienen una película protectora que se retira en el momento de la aplicación.^{4,5} Los parches se dividen en distintos tipos según su diseño:^{3,6}

- Sistemas de depósito o reservorio: el fármaco está incluido en un reservorio líquido o semisólido y se libera de forma controlada a través de una membrana polimérica porosa. Estos sistemas permiten incorporar mayor cantidad de fármaco, aunque existe el riesgo de que la membrana de control se dañe y se libere de forma masiva el agente terapéutico.
- Sistemas matriciales: el fármaco se encuentra en el interior de una matriz polimérica hidrófila o hidrófoba cuyo entramado controla la liberación del activo. En este caso no existe membrana que controle la liberación y no existe peligro de que se produzca una liberación masiva de fármaco debido a las características propias de las matrices que lo contienen. El componente que actúa como matriz puede ser una membrana polimérica impregnada con el fármaco, un hidrogel (no provoca irritación, es compatible con la piel y se adapta bien), una matriz elastomérica o una matriz adhesiva (ejerce la función de continente del fármaco y la adhesiva). Un ejemplo de sistema terapéutico transdérmico constituido por una matriz tipo hidrogel es el propuesto por Maji y col.⁷ que evalúan un parche transdérmico para la liberación de alprazolam. La matriz de ese parche está compuesta por combinaciones de quitosán con PVA y entrecruzada con anhídrido maleico; la proporción de estos polímeros puede modificarse para optimizar sus propiedades físico-químicas.
- Sistemas mixtos: son aquellos formados por un reservorio de fármaco y una matriz de difusión.

Los parches como sistemas de liberación de fármacos también se han empleado para la aplicación tópica con efectos locales, denominándolos parches dérmicos o cutáneos. Ejemplos de parches comerciales que contienen principios activos para acción local son los parches Flector®, Qutenza® y Versatis®. Los parches Flector® (ITF-Labomed)⁸ están compuestos por diclofenaco epolamina para el tratamiento local del dolor, inflamación y tumefacción; los parches Qutenza® (Astellas Pharma Europe B.V.)⁹ contienen capsaicina indicada en el dolor neuropático periférico en adultos; y los parches Versatis® (Grünenthal)¹⁰ contienen lidocaína para el tratamiento de la neuralgia posherpética. También se ha

estudiado la aplicación de parches en cosmética para tratamientos despigmentantes, efecto lifting, para ojos cansados y arrugas, para eliminar puntos negros, con efectos rejuvenecedores, reductores, anticelulíticos, etc.⁶

Además de las indicaciones anteriormente mencionadas (patologías y alteraciones de la piel, musculares, nerviosas, óseas y tratamiento sistémico a través de administración transdérmica), la piel ha sido objeto de desarrollo de aplicaciones tecnológicas creando dispositivos integrados en películas flexibles y adherentes a la piel para el mapeo térmico mediante sensores térmicos de alta precisión,¹¹ detección rápida de analitos,¹² monitorización fisiológica,¹³ parches para la extracción de biomarcadores proteicos para la detección de infección por *Plasmodium falciparum* (malaria),¹⁴ materiales para mejorar la apariencia de la piel,¹⁵ etc.

Respecto a esta última aplicación, muy recientemente Robert Langer, del Instituto de Tecnología de Massachusetts en Cambridge, y sus colaboradores¹⁵ han publicado un trabajo en el que presentan una película elástica transparente con propiedades mecánicas similares a la piel joven sana (elongación, elasticidad y flexibilidad) que ha demostrado reducir visiblemente las arrugas y el hinchazón de las bolsas bajo los ojos (figura 3.1.1).

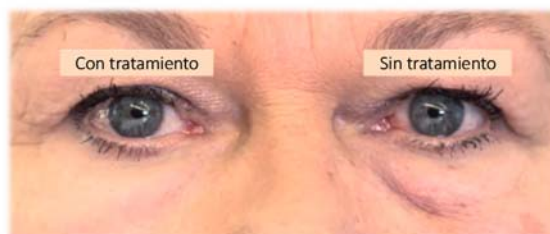


Figura 3.1.1. Impacto visual de la mejoría tras la aplicación de la formulación en la zona bajo los ojos (Yu, B. y col.¹⁵)

Se trata de una red polimérica tridimensional de polisiloxano entrecruzada químicamente *in situ* mediante un catalizador de platino. Los criterios que debe cumplir el material para tal fin son los siguientes: seguridad para la piel, sin irritación ni sensibilización; que sea aplicable como una formulación tópica fácilmente extensible y forme una “segunda piel” *in situ*; que se adhiera a la piel creando una capa protectora transpirable; que tenga propiedades mecánicas adecuadas para adaptarse a las respuestas mecánicas de la piel frente a los

movimientos normales, reforzando la tensión y retroceso elástico; que se mimetice con la piel sana y no interfiera en la apariencia normal en distintos tipos de piel.

Resulta evidente que los hidrogeles tienen especial cabida en este campo ya que pueden actuar como sistemas para liberación de fármacos con efecto local, como matrices para contener y controlar la liberación de los principios activos en parches y para formar películas poliméricas compatibles, adhesivas y flexibles sobre la piel con una gran variedad de potenciales aplicaciones.

Otro de los sectores en los que se ha centrado la investigación en este campo es el desarrollo de hidrogeles aplicados a la cicatrización de heridas. Son numerosos los trabajos publicados sobre este tema y los productos comercializados, algunos de ellos ya comentados en la "Introducción general". Asimismo, múltiples patentes han contribuido a aumentar este campo del conocimiento; por ejemplo, se ha patentado un xerogel para cicatrización de heridas formado por un polisacárido que, al contactar con fluidos, se rehidrata y forma un hidrogel, permitiendo la disolución y la liberación controlada de los principios activos que contiene. La conservación de este hidrogel seco antes de su aplicación aumenta la estabilidad de los principios activos durante el almacenamiento.¹⁶ Otra invención se refiere a una composición antioxidante compuesta por galatomanano y N-acetilcisteína con posible aplicación como apósito para cicatrización de úlceras, heridas, quemaduras y escaldaduras.¹⁷ Otra invención se refiere a un apósito que comprende al menos una capa interna compuesta de un hidrogel de hialuronato sódico y gelatina (impregnado con un péptido N-terminal de 20 aminoácidos de proadrenomedulina) y una capa externa compuesta por un poliuretano biodegradable y bioadsorbible; este apósito está diseñado para favorecer la cicatrización de heridas comprometidas y úlceras.¹⁸

Dada la importancia de estos sistemas poliméricos, la búsqueda de nuevas moléculas con capacidad entrecruzante permite desarrollar nuevas formulaciones con distintas características fisicoquímicas que pueden suponer un avance en diversas aplicaciones farmacéuticas.

En este capítulo se ha investigado el reticulante X como posible agente entrecruzante iónico. Trabajos anteriores han demostrado que administrado intraperitonealmente es capaz de regenerar tejido hepático.

Hasta el momento, este compuesto, con estructura de fosfoácido, no se ha descrito como agente entrecruzante. Sin embargo, en la bibliografía se describen varios ejemplos de moléculas con grupos fosfato capaces de formar hidrogeles por entrecruzamiento iónico, como el β -glicerol fosfato,¹⁹ el tripolifosfato,²⁰ el pirofosfato,²¹ la glucosa 1-fosfato²² y el hidrogenofosfato de amonio.²³

Por todo ello, se ha estudiado la formación de hidrogeles de quitosán por entrecruzamiento con el reticulante X, utilizando el piroxicam como fármaco modelo para evaluar cómo afecta el sistema elaborado a las características de liberación. Se han evaluado distintos aspectos de la formulación para su aplicación como sistema de liberación de fármacos vía tópica, así como su comportamiento a distintos valores de pH para caracterizar mejor el sistema.

II. OBJETIVOS / OBJECTIVES

Objetivos

Los objetivos de este trabajo de investigación han sido desarrollar un sistema de liberación modificada de fármacos basado en un polímero catiónico, quitosán, entrecruzado con una molécula aniónica, y explorar sus aplicaciones como sistema de administración tópica.

El trabajo realizado obedece a la siguiente secuencia:

- Elaboración de diversos hidrogeles de quitosán-reticulante X.
- Caracterización de los hidrogeles.
- Evaluación el hinchamiento de los hidrogeles.
- Determinación de los perfiles de liberación del piroxicam desde las redes poliméricas.

- Evaluación de la toxicidad del hidrogel y de sus componentes en cultivos celulares Caco-2.
- Estudio de la extensibilidad, adhesividad, irritación dérmica y capacidad cicatrizante de las formulaciones.
- Estudio de la permeabilidad transdérmica del piroxicam incorporado en el hidrogel.

Objectives

The objectives of this research work were to develop a modified drug delivery system based on chitosan, crosslinked with an anionic molecule, and to explore its applications as a topical delivery system.

The work carried out follows this sequence:

- Elaboration of various chitosan-crosslinker X hydrogels.
- Characterization of the hydrogels.
- Evaluation of the hydrogels swelling.
- Determination of the piroxicam release profiles from the polymer networks.
- Evaluation of the toxicity of the hydrogel and its components in Caco-2 cell cultures.
- Study of the extensibility, adhesiveness, dermal irritation and wound healing capacity of the formulations.
- Study of the transdermal permeability of piroxicam incorporated inside the hydrogel.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

Los materiales usados en este trabajo de investigación han sido los siguientes: quitosán (GD = 81%, PM = 190-310 kDa), piroxicam, dimetilsulfóxido (DMSO), KH_2PO_4 , NaCl, HCl 35%, NaH_2PO_4 y bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), suministrados por Sigma Aldrich. Otros materiales: agua destilada, Eutanax® (suministrado por SEA-UMH); Salvacam® (producto de Oficina de Farmacia), piel de oreja de cerdo (Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia).

2. Obtención de los hidrogeles

En una preparación estándar, se tomaron 0.77 g de quitosán al 2% en HCl 0.1 N (15 mg de quitosán seco, 0.05 mmoles de unidades repetitivas de quitosán) y se adicionaron distintos volúmenes de una solución stock de reticulante X en agua

(100 mg/ml), cuyas cantidades molares fueron 0.02, 0.05, 0.10, 0.13 mmoles, para obtener un porcentaje de entrecruzamiento (moles de reticulante X/moles de unidades de repetición de quitosán) de 50%, 100%, 200%, 275%, respectivamente. Esta mezcla se agitó con el vórtex durante un minuto hasta obtener una dispersión homogénea y blanquecina.

Las formulaciones se liofilizaron obteniendo hidrogeles secos en forma de disco; este producto se puede molturar fácilmente y puede ser rehidratado en medio acuoso formando un hidrogel viscoso fácilmente extensible.

3. Método de cargado del fármaco

El cargado de piroxicam, empleado como fármaco modelo, se realizó de forma simultánea a la formación del hidrogel. Se preparó una solución stock de 2.5 mg/ml de piroxicam en acetona y se colocó 1 ml en un vial, dejándolo evaporar durante una noche para permitir la formación de una película de fármaco en la parte inferior del recipiente. Una vez obtenida la película de piroxicam, se añadieron 0.77 g de la solución de polímero al vial que contenía el fármaco y se dejó en agitación, dos horas aproximadamente, hasta que el fármaco se despegó de las paredes del vial y se dispersó en el polímero. A continuación, se adicionó el agente reticulante y se agitó con el vórtex durante un minuto hasta obtener una dispersión homogénea y blanquecina.

Mediante dicha metodología se obtuvieron hidrogeles a partir de quitosán con distintos porcentajes de entrecruzamiento. En la tabla 3.III.1 se resumen las nomenclaturas utilizadas para denominar a cada una de las formulaciones:

Porcentaje de entrecruzamiento (reticulante X/quitosán)	Hidrogeles base	Hidrogeles con piroxicam
50%	M0-50	MP-50
100%	M0-100	MP-100
200%	M0-200	MP-200
275%	M0-275	MP-275

Tabla 3.III.1. Esquema de los hidrogeles estudiados en base a su porcentaje de entrecruzamiento y presencia o ausencia de fármaco

4. Caracterizaciones

4.1. Análisis elemental

La determinación del contenido de carbono, hidrógeno y nitrógeno de las muestras en estado sólido se llevó a cabo en un equipo LECO CHNS-932, utilizando sulfanamida como referencia.

4.2. Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente

El contenido en fósforo se determinó disolviendo el compuesto en 3-10 ml de agua regia, diluyendo con agua bidestilada hasta 30-50 ml y midiendo la disolución en un espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente Varian 715-ES.

4.3. Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico se realizó en una electrobalanza Perkin-Elmer Diamond, previamente calibrada, con platino como material de referencia, que consta de un termopar de Pt / Pt-Rh (10%). Las muestras en polvo introducidas en portamuestras de platino se calentaron en flujo de aire o argón (100 ml/min) desde temperatura ambiente hasta 900°C a una velocidad de calentamiento de 10°C/min. Antes de realizar las medidas de las muestras, se midió la línea base en un portamuestras vacío para corregir los resultados obtenidos para las formulaciones caracterizadas.

4.4. Difracción de rayos X

Las muestras pulverizadas se colocaron y presionaron en un portamuestras para obtener una superficie plana y uniforme. Los diagramas de difracción de rayos X se registraron utilizando un difractómetro Philips X'Pert Plus con radiación $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$, 40 kV), velocidad de barrido en el rango de 0.6° a 10.0° (2θ) por minuto, con un paso de 0.02° (2θ) y un tiempo de análisis de 5 segundos.

4.5. Espectrometría de resonancia magnética nuclear

La espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica que utiliza las propiedades magnéticas de ciertos núcleos. La forma, el tamaño y el

desplazamiento de los picos mostrados en el espectro son indicadores de la presencia, estructura y coordinación química del núcleo estudiado.

El espectro de ^{31}P -RMN en disolución para el reticulante X se registró a 25°C en un instrumento Bruker Avance 300 MHz usando MeOD como disolvente. El espectro de ^{31}P -RMN en sólido para la muestra M0-275 se obtuvo mediante un espectrómetro Bruker AV-400-WB a 79.5 MHz.

4.6. Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) proporcionan información sobre la topografía de la superficie de la muestra, la apariencia, morfología y tamaño de las estructuras formadas, con mayor resolución que la obtenida con el SEM.

Las muestras se adhirieron con una cinta de doble haz adhesivo sobre portamuestras cilíndricos y se tomaron imágenes con un microscopio de barrido de emisión de campo marca ZEISS modelo ULTRA 55. Se estudió el quitosán sin tratar, el quitosán disuelto en HCl 0.1 N y posteriormente liofilizado, y el hidrogel M0.

5. Hinchamiento

La característica que define a los hidrogeles es su capacidad para captar agua o fluidos acuosos hinchándose hasta el equilibrio, pero dicha capacidad varía en función del tipo de hidrogel (tipo de polímero, peso molecular, tipo y grado de entrecruzamiento, etc.). En este estudio se evaluó la influencia del porcentaje de entrecruzamiento y el pH del medio en el grado de hinchamiento del hidrogel.

El análisis dinámico del hinchamiento se llevó a cabo en las muestras M0-100 y M0-275, que fueron preparadas en moldes para obtener hidrogeles con forma de disco. A continuación, se introdujeron en cestillos metálicos, que permiten la entrada de fluido pero evitan la salida de la formulación, con la finalidad de evitar que la posible desintegración del sistema imposibilitara la extracción del hidrogel para su pesado. Los cestillos se introdujeron en vasos con distintos medios tamponados a pH 1.2, 4.5, 6.8 y 7.5 durante 48 horas a 37°C. A intervalos de tiempo prefijados, los cestillos se extrajeron del medio, su superficie se secó cuidadosamente con papel de filtro y se pesaron, devolviéndolos finalmente al mismo medio. Previamente al inicio del ensayo, los cestillos y las muestras se

pesaron individualmente en una balanza (Acculab, Sartorius Group, Atilon, máx. 220 g, d = 0.1 mg). Cada condición de pH y grado de entrecruzamiento se estudió por triplicado.

El peso de los hidrogeles para cada tiempo se calculó por diferencia entre el peso total y el peso del cestillo usado en cada muestra. El grado de hinchamiento normalizado a un tiempo t (Q_t) se calculó en términos de peso de agua por peso de hidrogel seco empleando la ecuación 1.IV.1 de la “Introducción general”.

6. Liberación

En este estudio se evaluó la capacidad de los hidrogeles como sistemas de liberación modificada y la influencia del porcentaje de entrecruzamiento y el pH del medio en los perfiles de liberación.

El ensayo se llevó a cabo en vasos colocados en un agitador orbital termorregulado (Stuart orbital incubator SI50) a 37°C y 100 movimientos oscilantes por minuto durante 48 horas. Los hidrogeles MP-100 y MP-275 se introdujeron en cestillos metálicos, que permiten la entrada y salida de fluido y fármaco disuelto pero evitan la salida del hidrogel. El uso de los cestillos tuvo como finalidad evitar que la posible desintegración del sistema causara errores en la toma de muestras. Los cestillos se introdujeron en vasos con distintos medios tamponados a pH 1.2, 4.5, 6.8 y 7.5 durante 48 horas a 37°C. La toma de muestras se realizó a determinados tiempos (0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 24 y 48 horas) y el volumen retirado se repuso con el medio correspondiente. Las concentraciones de piroxicam se analizaron por HPLC y los datos obtenidos se trataron matemáticamente con una hoja de cálculo de Excel. El experimento se realizó por triplicado para cada valor de pH y porcentaje de entrecruzamiento.

Los perfiles de liberación obtenidos se compararon mediante el cálculo del f_2 , usando la ecuación 2.III.18, tal y como se describe en el apartado “Liberación” del capítulo 2.

El ajuste de los perfiles para establecer el modelo cinético de liberación se realizó aplicando la ecuación 1.IV.7 de Korsmeyer-Peppas, descrita en la “Introducción general”. Se utilizaron los valores experimentales hasta un porcentaje de liberación del 60% de la cantidad total existente en el hidrogel.

Para caracterizar mejor el proceso de liberación se recurrió también al estudio del modelo de orden uno (ecuación 3.III.1) y al de Peppas-Sahlin²⁴ (ecuación 3.III.2):

$$M_t = M_0 e^{k_1 t} \quad (3.III.1)$$

donde k_1 es la constante cinética de orden uno y M_t es la cantidad de fármaco liberada a tiempo t .

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_D t^m + k_R t^{2m} \quad (3.III.2)$$

donde el término $k_D t^m$ corresponde a la contribución del mecanismo de difusión fickiana (k_D es la constante difusional), y el término $k_R t^{2m}$ al mecanismo de transporte tipo Caso II (k_R es la constante de relajación/erosión). El coeficiente m es el exponente de difusión puramente fickiana para una matriz de cualquier forma geométrica que presenta liberación controlada.

El ajuste de los modelos cinéticos y el cálculo de los parámetros se realizó mediante la herramienta Solver del Excel para minimizar la SSR entre las concentraciones experimentales y las teóricas.

6.1. Cuantificación del fármaco en las muestras

Para el análisis de las muestras de piroxicam se empleó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa con detección por ultravioleta. El sistema cromatográfico utilizado fue un Sistema Alliance® HPLC, que consta de los siguientes módulos:

- Módulo de Separaciones Waters™ 2695 compuesto por una bomba cuaternaria e inyector automático integrado.
- Detector de absorbancia Waters™ 2487 doble λ .
- Registrador-integrador Empower™.

En cuanto a las condiciones cromatográficas, se utilizó una fase estacionaria reversa compuesta por:

- Precolumna Phenomenex® KJ0-4282 con dos filtros de 2 μm y relleno con micropartículas C18 de 40 μm de tamaño (Phenomenex AJO-4287, C18 4 x 3.0 mm).

- Columna de acero inoxidable Waters™ modelo Nova Pak® C18 de 150 mm de longitud, 3.9 mm de diámetro y tamaño de partícula de 4 µm.

Se trabajó con un método isocrático a velocidad de flujo 1 ml/min y con temperatura de columna de 30°C. La fase móvil fue una mezcla en proporción volumétrica 50:50 de solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0.1% y acetonitrilo. Los componentes de la fase móvil se filtraron mediante un filtro Millipore tipo HNWP de nylon de 0.45 µm de diámetro de poro antes de incorporarse al sistema cromatográfico para eliminar posibles partículas en suspensión. La detección se realizó con una longitud de onda de 356 nm. En estas condiciones el tiempo de retención del compuesto ensayado fue de 7 minutos.

El procedimiento seguido para la validación de los métodos analíticos se describe en el apartado 2.1 “Cuantificación del fármaco en las muestras” del capítulo 2.

El coeficiente de determinación, r^2 , de la curva de calibración fue superior a 0.997. El estudio de precisión reflejó que los coeficientes de variación de todos los puntos de la recta fueron menores del 10%. Respecto a los ensayos de exactitud realizados sobre los patrones de concentración conocida, el error relativo fue siempre menor del 10%. Las concentraciones de las muestras cuantificadas fueron siempre superiores a los límites de detección y cuantificación. Por todo ello, el método analítico empleado en este trabajo es suficientemente selectivo y sensible para la correcta cuantificación del piroxicam.

7. Toxicidad en cultivos Caco-2

El fundamento teórico de este ensayo se encuentra descrito en el apartado 5 “Toxicidad en cultivos Caco-2” del capítulo 2. Los hidrogeles M0-100 y M0-275 liofilizados se molturaron y dispersaron en PBS (5 mg/ml); también se estudió la toxicidad del reticulante X y del quitosán (ambos a 5 mg/ml). Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos de fondo plano con una densidad de 25000 células por pocillo. Las células se cultivaron en condiciones estándar; 24 h tras la siembra se cambió el medio y se añadieron 50 µl de las muestras ensayadas. Las placas se incubaron durante 24, 48 o 72 h, tras lo cual se adicionaron 20 µl de solución de MTT (5 mg/ml) a cada pocillo. Estas placas se sometieron a una nueva incubación a 37°C durante 3 h para permitir la reacción de reducción del MTT. A

continuación, se retiró el contenido de los pocillos, los cristales de formazán se disolvieron en DMSO y se cuantificó su absorbancia a 490 nm mediante un lector de placas Labsystems Multiskan EX. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado para cada elemento ensayado.

Las diferencias entre los valores de supervivencia celular se estudiaron mediante la prueba estadística ANOVA de un factor con un nivel de significación $p = 0.05$. Se seleccionó una prueba post hoc paramétrica o no paramétrica en función de la homogeneidad de las varianzas determinada por la prueba de Levene.

8. Extensibilidad

Mediante este ensayo se valoró la extensibilidad de las formulaciones, basándose en el aumento de la superficie de una determinada cantidad de muestra al ser sometida, progresivamente, a presiones crecientes a intervalos de tiempo iguales. El ensayo de extensibilidad se realizó de acuerdo al procedimiento normalizado de trabajo PN/L/CP/003/00 de determinación de extensibilidad recogido en la segunda edición del Formulario Nacional (Orden SSI/23/2015).

En este caso, se depositaron 0.5 g de muestra entre dos placas de cristal y se comprimieron mediante la aplicación de pesos crecientes (5, 15, 50, 100, 150, 200, 300, 500, 1000, 1500 y 1800 g) durante 30 segundos. Tras cada intervalo de tiempo se calculó el área de extensión con la ayuda de un papel milimetrado situado bajo la placa inferior.

Los ensayos se realizaron por cuadruplicado para las siguientes formulaciones: hidrogel M0-275 rehidratado (120 mg hidrogel seco/ml agua, equivale a 30 mg quitosán/ml agua), gel comercial de carbómero (Salvacam®) y quitosán rehidratado. Esta última formulación se preparó liofilizando quitosán al 2% en HCl 0.1 N y añadiendo agua hasta obtener la misma concentración de polímero que la del hidrogel, esto es, 30 mg/ml.

9. Adhesión a la piel

La adhesión de la lámina polimérica o parche a la piel se midió en términos de fuerza requerida para despegarla de la piel, empleando una modificación de la prueba Loop Tack.²⁵

Esta medida se realizó en un dinamómetro constituido por un soporte inferior en el que se coloca la piel y un dispositivo superior con una función de pinza que es capaz de elevarse registrando la fuerza ejercida para tal fin. Se prepararon placas con piel de oreja de cerdo firmemente sujeta, estas placas se colocaron sobre la parte inferior del dinamómetro. Sobre la piel se extendieron 0.4 g del hidrogel rehidratado (120 mg hidrogel seco/ml agua) con un grosor aproximado de 1 mm y un área de 1.9 x 4.5 cm; el hidrogel se dejó secar durante 30 minutos y se pegó encima una cinta adhesiva de 1.9 x 4.5 cm. Los extremos de la cinta se sujetaron en la parte superior del instrumento mediante un agarre tipo pinza. La medición de la adhesividad del parche a la piel se realizó elevando dicho dispositivo superior con una velocidad de 500 mm/s y se registró la fuerza máxima realizada para despegar el hidrogel de la piel. Se realizaron 5 mediciones para el hidrogel M0-275.

10. Irritación dérmica

Se evaluó la irritación aguda dérmica de la formulación M0-275 en conejos según el procedimiento descrito en la guía OCDE 404.²⁶ El protocolo de este ensayo fue aprobado por el Comité de Ética con el código 2016/VSC/PEA/00137. Dicho protocolo se describe a continuación:

En primer lugar, se afeita la zona dorsal del animal donde se va a aplicar la formulación intentando no causar abrasión. A las 24 horas del afeitado se procede a la aplicación de la formulación; en este caso se aplicaron 0.3 gramos del hidrogel rehidratado (120 mg hidrogel seco/ml agua) en un área de 6 cm² aproximadamente. El parche se deja 15 minutos, tras lo cual se retira y se observa la piel. Si no presenta signos de irritación se aplica nuevamente la formulación en otra zona de la piel y se deja 1 hora. En caso de no apreciarse efectos irritantes al retirar el hidrogel se repite el procedimiento dejando el parche 4 horas. Al retirar cada parche la zona se lava con una gasa humedecida para eliminar los restos de formulación. Si tras la eliminación de la formulación a las 4 horas no se observa irritación en la piel, el animal se observa durante 14 días. Se trata de un ensayo secuencial, por lo que este procedimiento se realiza primero en un conejo; a continuación, se ensaya un segundo conejo, que sirve de test confirmatorio si en el test inicial se ha observado que la formulación no es irritante. El procedimiento en el segundo animal es el mismo, retirando la formulación a 15 minutos, 1 hora y 4

horas. Si el resultado en los dos conejos es el mismo no es necesario ensayar un tercero; de lo contrario, se ensaya un tercer animal de la misma forma.

Durante el ensayo se tomaron fotografías de las áreas tratadas y el área control (piel sin tratar) a distintos tiempos para evaluar la presencia de signos de irritación. El ensayo se realizó en dos conejos.

11. Permeabilidad

Para determinar la cinética de difusión y la carga cutánea de fármaco tras la exposición a hidrogeles con piroxicam, se realizó el estudio de permeabilidad *in vitro* en células de Franz. A continuación se describe la preparación de la piel, el montaje de las células de difusión y el protocolo experimental.

11.1. Preparación de la piel

En los experimentos de absorción transdérmica se utilizó como membrana la piel de oreja de cerdo por sus características similares a las de la piel humana.²⁷

Para mantener la homogeneidad de las condiciones del ensayo, se seleccionaron cerdos blancos sin ningún tipo de manchas y se utilizó la cara exterior de la oreja por ser una zona con muy poco vello. Se separó la piel de la cara exterior de la oreja del cartílago mediante un bisturí quirúrgico ayudado de unas pinzas quirúrgicas, teniendo especial cuidado en mantener la integridad de la piel. A continuación, con ayuda de un dermatomo eléctrico (modelo Aesculap-Wagner C. GA 176, Braun Surgical S.A.) se procedió a cortar la piel obtenida a 600 μm de grosor. Para ello se fijó sobre una placa de poliestireno y se realizó el corte mediante deslizamiento horizontal paralelo a la superficie de la piel. De esta manera se obtuvieron láminas de espesor constante (600 μm), constituidas por epidermis completa (estrato córneo y epidermis viva) y parte de la dermis. Estas porciones de piel se envasaron inmediatamente en sobres de papel de aluminio y fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización.

Antes del comienzo del ensayo, las muestras de piel se descongelaron y mantuvieron humedecidas con suero fisiológico mientras se realizó el montaje del ensayo para evitar la desecación y degradación de la piel.

11.2. Células de difusión

Los ensayos de permeabilidad se llevaron a cabo en células de difusión denominadas células de Franz (figura 3.III.1). Se trata de un sistema cerrado constituido por dos piezas cilíndricas de vidrio neutro, que forman el compartimento dador y el receptor, entre las cuales se sitúa la membrana de difusión. El compartimento receptor posee una tubuladura en un lado que permite la toma de muestras y la reposición del volumen retirado durante el muestreo. La piel se coloca sobre el compartimento receptor de manera que el estrato córneo quede expuesto al compartimento dador y la capa dérmica en contacto con la solución receptora. En el interior del compartimento receptor, previamente a la colocación de la piel, se introduce un imán para asegurar la continua agitación de la solución receptora durante el ensayo. De esta manera se facilita su homogeneización y se evita la formación de capas estáticas de difusión en las proximidades de la piel. La estanqueidad del sistema se garantiza por la presencia de bordes esmerilados en las zonas que están en contacto con la membrana y por la fijación de ambas piezas mediante una pinza metálica que ejerce presión entre ellas y facilita el sellado. Esta pinza se encuentra unida a un soporte metálico que facilita la colocación y estabilidad de las células de Franz en el baño termostatzado. Para simular las condiciones fisiológicas, las células se introducen en un baño a 37°C para mantener una temperatura constante de 32°C a nivel de la piel.



Figura 3.III.1. Esquema de los componentes de una célula de Franz

11.3. Protocolo experimental

Para garantizar que las muestras de piel son aptas para el estudio, previamente al inicio del experimento es necesario comprobar la integridad de las membranas. Para ello se deben seguir los siguientes pasos:

- Una vez montada la muestra de piel entre las dos piezas de vidrio, se añade 1 ml de la solución receptora (composición detallada más abajo) en el compartimento dador y transcurridos 5 minutos se comprueba visualmente que no haya ninguna pérdida de líquido hacia el compartimento receptor. Si aparece humedad en dicho compartimento, posiblemente se deba a la presencia de algún poro y, por tanto, se descarta la muestra.

- Si se cumple el anterior requisito, se rellena el receptor con la misma solución con cuidado de que no queden burbujas y se procede a la medición de la resistencia al paso de corriente eléctrica, TER (*Transcutaneous Electrical Resistance*), mediante un polímetro. El criterio de aceptación es un valor de resistencia superior a 3 k Ω .²⁸

La solución de tampón fosfato pH 7.4 empleada en el compartimento receptor corresponde a la siguiente composición:

KH ₂ PO ₄ (9.08 g/l).....	1.92 ml
Na ₂ HPO ₄ (9.46 g/l).....	8.08 ml
NaCl.....	9.20 g
H ₂ O destilada.....	c.s.p. 1 l

Para este ensayo, en el compartimento dador se colocaron 0.5 g de formulación ensayada (equivalente a 2.5 mg de piroxicam). El área útil de difusión de cada una de las células fue de 2.01 cm² y el volumen del compartimento receptor fue de 10 ml. Los ensayos se realizaron en condiciones no oclusivas para simular lo máximo posible las condiciones de utilización clínica.

Se estudió el hidrogel MP-275 rehidratado (120 mg hidrogel seco/ml de solución) en dos medios distintos: formulación 1 (solución de propilenglicol al 10% en agua) y formulación 2 (mezcla de glicerol (10%), alcohol isopropílico (10%) y propilenglicol (10%) en agua). Las formulaciones se colocaron sobre la piel (tiempo 0) y durante el transcurso del ensayo se tomaron muestras del compartimento receptor a las 14, 16, 18, 20, 22 y 24 horas, reponiendo el volumen extraído con el mismo volumen de tampón a pH 7.4. Al finalizar el ensayo, las células de Franz se desmontaron y se eliminaron los restos de formulación de las muestras de piel. A continuación, se recogieron individualmente las formulaciones del compartimento dador y las muestras de piel. Estas últimas se trataron con metanol durante 24

horas en agitación magnética para realizar la extracción del fármaco. El metanol rompe las uniones intercelulares y solubiliza el piroxicam acumulado dentro de las capas epiteliales. Previamente, se comprobó que la capacidad de extracción del metanol para este fármaco es del 97%. Los restos de hidrogel obtenidos del compartimento dador se trataron con HCl 35% y sonicación para romper la estructura y metanol para disolver el piroxicam remanente en su interior. Posteriormente, se neutralizaron con la adición de una solución diluida de NaOH.

Finalmente, se tomó 1 ml de cada una de las muestras obtenidas del tratamiento de extracción de la piel y del dador y se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 minutos, para recoger el sobrenadante que contiene el fármaco. El piroxicam presente en las muestras de dador, receptor y piel se cuantificó por HPLC, según el método descrito en el apartado 6.1. Los resultados se trataron en una hoja Excel para cuantificar el flujo transdérmico, el coeficiente de permeabilidad y la carga cutánea a las 24 horas de exposición.

Los ensayos se realizaron por septuplicado ($n = 7$) para cada formulación ensayada. Los resultados se evaluaron mediante la prueba estadística t-student para muestras independientes con un intervalo de confianza del 95%.

12. Cicatrización

El objetivo de este estudio fue determinar la capacidad cicatrizante de los hidrogeles obtenidos mediante la evaluación de la tasa de cicatrización de heridas de espesor total.

El estudio se realizó en ratas Wistar hembra de 12 semanas de edad y 250-290 g de peso, según el protocolo UMH-DI-MBS-03-14 aprobado por el Comité de Ética. Los animales se mantuvieron en jaulas individuales durante todo el estudio para evitar el empeoramiento de las heridas por contacto entre ellos.

Los animales se dividieron en cuatro grupos de $n = 4$: las ratas del grupo 1 se trataron con apósitos de quitosán, las del grupo 2 con 0.25 ml de solución de reticulante X 180 mg/ml en agua, las del grupo 3 con el hidrogel M0-275 y a las del grupo 4 no se les aplicó tratamiento. Las cantidades de formulación ensayadas para los apósitos de quitosán fueron 0.77 g de polímero al 2% y, para los del hidrogel, 0.77 g de polímero al 2% entrecruzado el reticulante X al 275%, ambos liofilizados.

En primer lugar, los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico 40 mg/kg por vía intraperitoneal y se les administró buprenorfina subcutánea 0.3 mg/kg como analgésico. Una vez comprobado el estado de anestesia profunda, se afeitó la zona superior del lomo y se desinfectó con alcohol. A continuación, se realizó una escisión de la piel de 3 cm de diámetro, se fotografió y se cubrió la herida con la correspondiente formulación estudiada, una gasa antiadherente y un esparadrapo. En el caso del grupo sin tratamiento, la herida se cubrió únicamente con la gasa antiadherente y el esparadrapo. Durante las dos semanas tras la creación quirúrgica de la herida, se les administró paracetamol 1 g/l en el agua de bebida.

Los días 7, 14 y 21 tras la escisión de la piel se reanestesiaron los animales, se retiraron los vendajes y se fotografió el estado de las heridas; a continuación, se reaplicaron las formulaciones correspondientes (nuevos apósitos) y se volvieron a cubrir con la gasa antiadherente y el esparadrapo. El día 23 los animales se sacrificaron mediante inyección intravenosa de pentobarbital sódico (Eutanax®) 90 mg/kg y la piel cicatrizada se extirpó para su posterior estudio microscópico.

Las muestras de piel se fijaron con formalina al 4% en PBS y por deshidratación con alcoholes, tras lo cual se embebieron en parafina líquida; posteriormente, se seccionaron con un microtomo para parafina (marca Leica modelo RM2125RT) y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Estas muestras histológicas se observaron mediante un microscopio óptico vertical (marca Leica modelo DMR) registrando las imágenes digitales con una cámara (Leica modelo DFC450C) para estudiar el estado de la piel en los distintos grupos de tratamiento.

Las fotografías tomadas durante todo el ensayo se analizaron con el software ImageJ® para cuantificar el área de las heridas y calcular la evolución de la disminución del tamaño de las heridas en los distintos grupos mediante una hoja de cálculo de Excel. El porcentaje de cierre de la herida para cada tiempo se determinó mediante la ecuación 3.III.3:

$$\% \text{ cierre herida} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \cdot 100 \quad (3.III.3)$$

donde A_0 es el área de la herida inicial y A_t es el área de la herida a tiempo t .

Las diferencias entre los porcentajes de cierre de la herida se estudiaron mediante la prueba estadística ANOVA de un factor con un nivel de significación $p = 0.05$. Se seleccionó una prueba *post hoc* paramétrica o no paramétrica en función de la homogeneidad de las varianzas determinada por la prueba de Levene.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Mecanismo de reacción quitosán-reticulante X

El hidrogel compuesto por quitosán-reticulante X se prepara mediante la interacción iónica entre las cargas positivas de los grupos amino del polímero y los aniones del fosfoácido. El mecanismo de formación se basa en el hecho de que el quitosán es un polímero básico débil (pK_a 6.5) y, por tanto, cuando el pH de la disolución disminuye, el grado de ionización del polímero aumenta. En este mismo sentido, los pK_a del grupo fosfórico del reticulante X son 1.5 y 6.6, mientras el pK_a del grupo ácido es 3.4 (figura 3.IV.1).

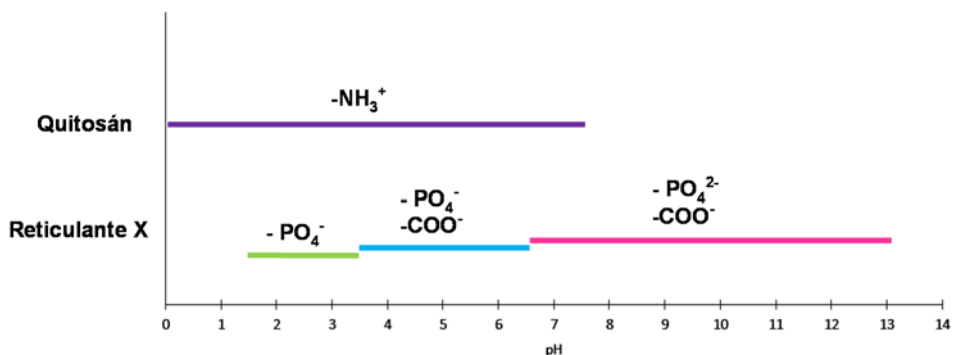


Figura 3.IV.1. Estado iónico del quitosán y del reticulante X en función del pH del medio (representación basada en el pKa de los grupos ionizables)

La solución de quitosán al 2% en HCl 0.1 N tiene un valor de pH 1.4, por lo que los grupos amino se encuentran protonados en su mayoría; el reticulante X a una concentración de 100 mg/ml en agua tiene un valor de pH 8.5, lo que implica que los grupos $\text{-H}_2\text{PO}_4$ y -COOH están desprotonados, ofreciendo así tres cargas negativas capaces de interactuar con las cargas positivas del quitosán. Una vez producida la reacción, el pH del hidrogel es 7.0 lo que sugiere que se produce una interacción iónica entre grupos de diferente carga.

2. Caracterizaciones

2.1. Análisis elemental y espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente

Los resultados del análisis elemental del quitosán sin tratar y de los hidrogeles sin fármaco, así como el ICP-MS de fósforo de dichos hidrogeles, se recogen en la tabla 3.IV.1.

	N%	C%	H%	P%
Quitosán	7.23	40.42	6.94	---
M0-50	5.92	36.74	6.25	1.3
M0-100	6.23	38.65	6.79	2.4
M0-200	5.14	37.35	6.13	5.2
M0-275	4.97	36.47	6.83	5.7

Tabla 3.IV.1. Resultados del análisis elemental del quitosán comercial y del ICP-MS de fósforo de dicho polímero y de los hidrogeles sin fármaco

El ICP-MS de los hidrogeles muestra que el porcentaje de fósforo incorporado a la red orgánica aumenta conforme incrementa la proporción de agente entrecruzante añadido.

2.2. Espectrometría de resonancia magnética nuclear

La figura 3.IV.2 muestra los espectros de RMN de ^{31}P del reticulante X (figura 3.IV.2 a) y del hidrogel M0-275 (figura 3.IV.2 b).

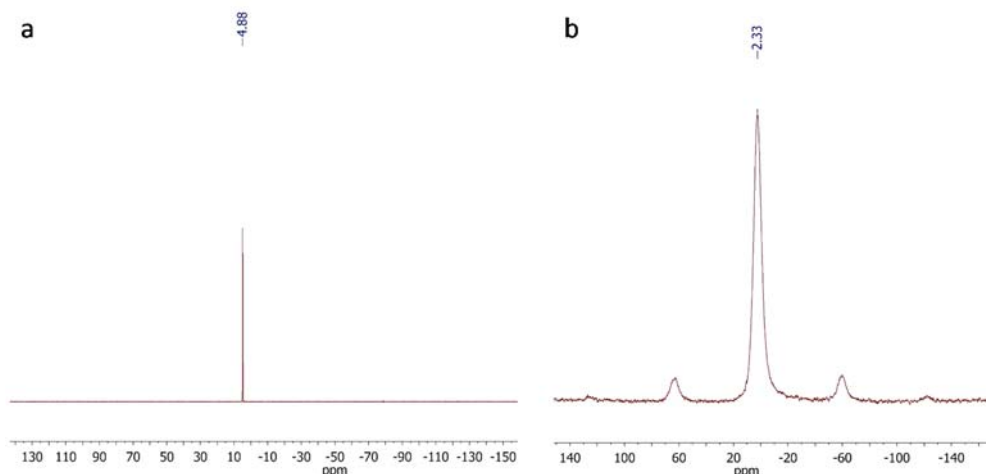


Figura 3.IV.2. a) Espectro ^{31}P -RMN en disolución para el reticulante X puro, y b) espectro ^{31}P -RMN en estado sólido para la muestra M0-275

Los espectros de RMN de fósforo de la molécula reticulante y de la red formada por dicha molécula y el polímero muestran un leve desplazamiento de 4.8 a 2.3 ppm, respectivamente. Este desplazamiento posiblemente esté asociado a la interacción no covalente de los hidroxilos del grupo fosfórico con las aminas del quitosán.

2.3. Análisis termogravimétrico

Las curvas del análisis termogravimétrico (TGA) y su primera derivada (DTG) se han utilizado para determinar la estabilidad térmica de los hidrogeles obtenidos. En el TGA del polímero sin entrecruzar se observan tres eventos térmicos y para el hidrogel cuatro eventos térmicos. La pérdida de masa para los hidrogeles es más paulatina e incompleta (quedando un residuo del 9 al 34%, en función del grado de entrecruzamiento) que la del polímero, que a los 650°C se ha consumido por

completo (figura 3.IV.3 a). El mismo comportamiento se observa en los hidrogeles que contienen fármaco, cuanto mayor es el porcentaje de entrecruzamiento, mayor es el residuo final (figura 3.IV.4 a).

En las gráficas de DTG se observan los puntos de mayor descomposición de la muestra en función de la temperatura. En el caso del quitosán, la pérdida de agua residual se produce a los 75°C, la despolimerización de las cadenas a los 300°C y la pirolisis entre los 500°C y los 650°C. La temperatura a la que se produce la máxima rapidez de descomposición ($T_{m\acute{a}x}$) es de 300°C en el quitosán. En cambio, en los hidrogeles los picos de $T_{m\acute{a}x}$ se encuentran a temperaturas ligeramente inferiores. En los hidrogeles con un porcentaje de entrecruzamiento del 100 al 275%, el pico de máxima descomposición se desdobra en dos, con valores entre 175°C y 275°C (figura 3.IV.3 b). Teniendo en cuenta que cuanto mayor sea la temperatura a la que descompone, mayor es la energía aplicada para descomponerlo y, por tanto, el compuesto es térmicamente más estable, se puede concluir que cuanto mayor es el porcentaje de entrecruzamiento del hidrogel, menor es su estabilidad térmica.

En el caso de los hidrogeles que contienen piroxicam (figura 3.IV.4 b), el comportamiento de descomposición térmica es el mismo que el descrito para los hidrogeles sin fármaco. El pico de máxima descomposición se origina a menor temperatura cuanto mayor es el grado de entrecruzamiento, demostrando que la estabilidad térmica es menor.

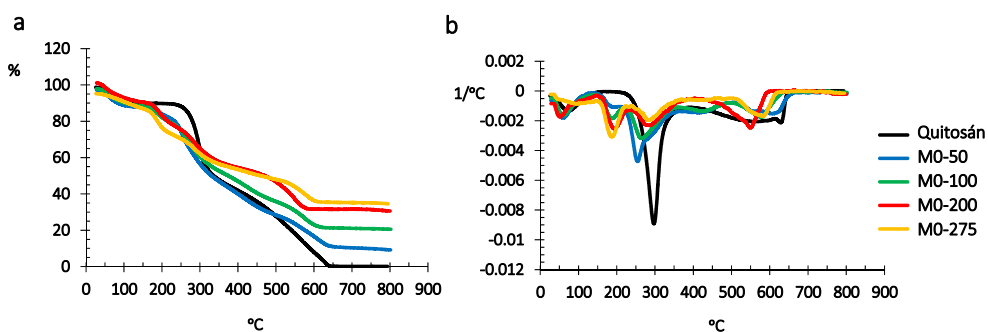


Figura 3.IV.3. Gráficas de a) TGA y b) DTG del quitosán y los hidrogeles sin fármaco con distintos porcentajes de entrecruzamiento

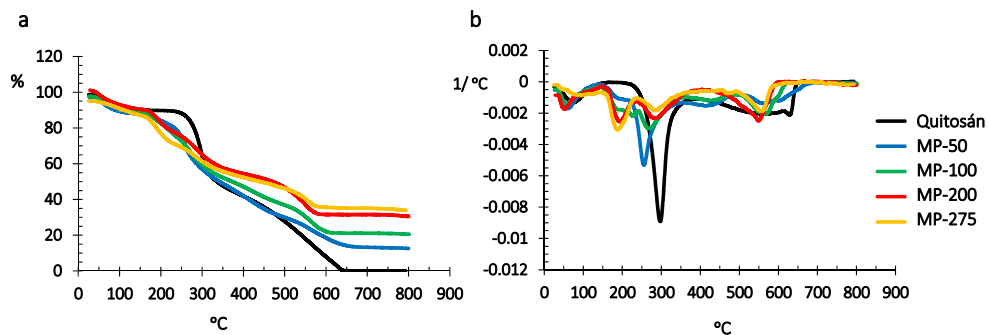


Figura 3.IV.4. Gráficas de a) TGA y b) DTG del quitosán y los hidrogeles con piroxicam con distintos porcentajes de entrecruzamiento

2.4. Difracción de rayos X

El efecto del entrecruzamiento en la cristalinidad del polímero se caracterizó por difracción de rayos X. Una estructura es cristalina si su difractograma muestra picos claros y definidos. Los desplazamientos de los picos caracterizan un cristal, es decir, una forma cristalina sólo es idéntica a otra si todos los desplazamientos de los picos son iguales en la posición 2θ .

En la figura 3.IV.5 se recogen los espectros de difracción del agente reticulante, del polímero sin entrecruzar (quitosán) y de los hidrogeles formados, en presencia o ausencia de fármaco.

El difractograma del reticulante X demuestra que este compuesto orgánico presenta una estructura cristalina; en cambio, en el caso del quitosán se observan dos picos anchos característicos debido a la ausencia de orden del polímero. La adición del reticulante dio lugar a una pérdida de cristalinidad generalizada en la estructura, reflejada en el aplanamiento de ambos picos a 10θ y 20θ ; sin embargo, se observan picos claramente definidos que podrían ser interpretados como zonas específicas de la red con mayor ordenamiento frente al quitosán en su estado original. Comparando los hidrogeles con distintos porcentajes de entrecruzamiento (M0-50 – M0-275) se observa que el aumento de la proporción de reticulante supone un leve aumento de la cristalinidad en estas zonas específicas del sistema, aunque en general se produce una amorfización de la estructura. Finalmente, la encapsulación del fármaco en la red no parece influir en la cristalinidad de la estructura, tal como muestra el difractograma del MP-50 y MP-275.

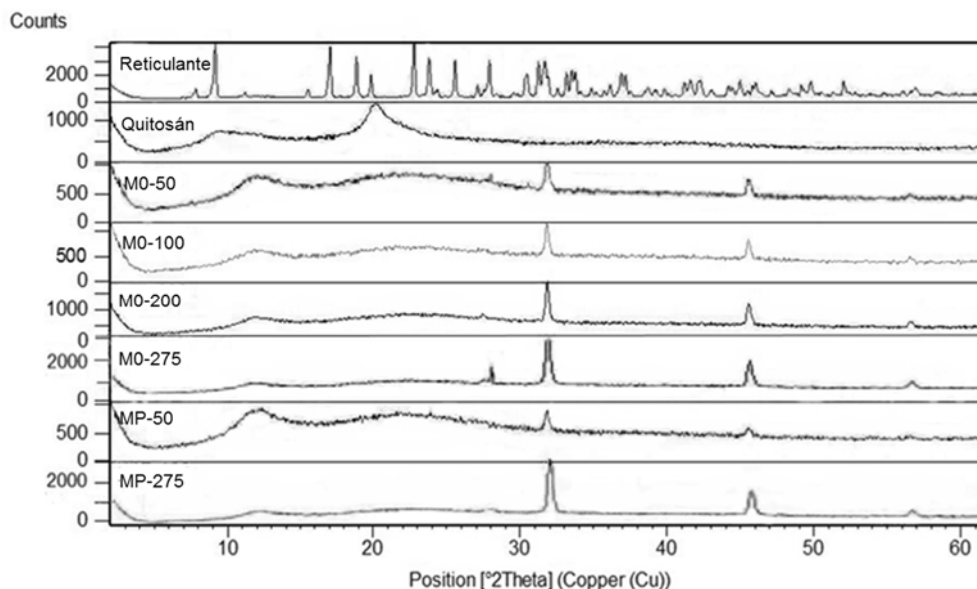


Figura 3.IV.5. Difractograma de rayos X del reticulante X, del quitosán y de los hidrogeles entrecruzados del 50 al 275% sin farmaco y al 50 y 275% con piroxicam

2.5. Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo

Las imágenes de FESEM (figura 3.IV.6) muestran la estructura de quitosán sin tratar, el quitosán disuelto en HCl 0.1 N y sometido a liofilización, y el hidrogel MO-275 (liofilizado). Se observa que el quitosán sin tratar tiene una estructura más rugosa, frente al quitosán sometido a disolución y liofilización que presenta una estructura homogénea y laminar. La adición del agente reticulante al polímero genera una estructura amorfa con hendiduras y poros, aunque se observan pequeñas formas cristalinas que pueden debidas a moléculas de reticulante que no han entrecruzado la red polimérica.

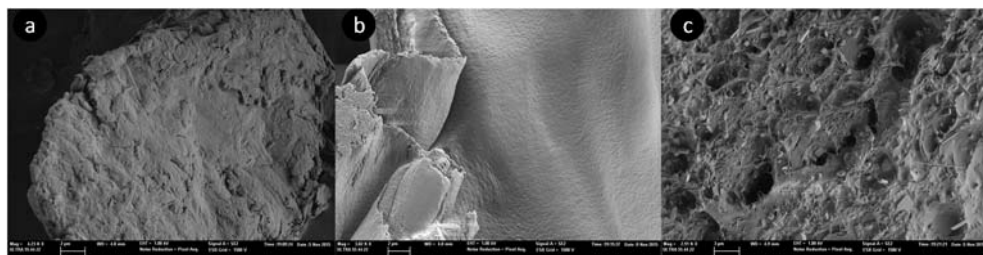


Figura 3.IV.6. Imágenes de FESEM de las muestras de a) quitosán sin tratar, b) quitosán anteriormente disuelto en HCl 0.1 N, c) MO-275

3. Hinchamiento

En este ensayo se ha evaluado la influencia del pH y el porcentaje de reticulación en la dinámica de hinchamiento de los hidrogeles entrecruzados al 100% y al 275%. Los valores de hinchamiento para cada tiempo se muestran en las tablas 3.IV.2 y 3.IV.3 y los perfiles se representan en la figura 3.IV.7.

Tiempo (h)	pH 1.2		pH 4.5	
	M0-100	M0-275	M0-100	M0-275
0.25	23.62 ± 0.25	11.96 ± 1.50	26.49 ± 3.90	10.53 ± 1.01
0.5	18.15 ± 2.00	10.69 ± 1.79	24.39 ± 2.96	9.33 ± 1.03
1	7.09 ± 0.76	6.91 ± 0.51	15.08 ± 1.55	6.71 ± 0.72
1.5	4.94 ± 0.22	5.25 ± 1.41	12.92 ± 2.00	5.98 ± 0.46
2	4.64 ± 0.43	1.00 ± 0.35	4.34 ± 0.41	3.46 ± 0.78
3	1.06 ± 0.31	0.53 ± 0.12	2.39 ± 0.44	2.07 ± 0.33
4	0.10 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.34 ± 0.06	0.76 ± 0.07
5			0.00 ± 0.00	0.12 ± 0.05

Tabla 3.IV.2. Valores de hinchamiento para cada tiempo, Q_t , de las muestras M0-100 y M0-275 a pH 1.2 y 4.5

Tiempo (h)	pH 6.8		pH 7.5	
	M0-100	M0-275	M0-100	M0-275
0.25	30.26 ± 1.54	12.71 ± 1.32	18.01 ± 1.33	9.40 ± 0.10
0.5	28.30 ± 2.20	11.84 ± 0.98	14.40 ± 1.24	8.64 ± 0.95
1	27.66 ± 3.17	11.86 ± 1.88	14.32 ± 0.54	8.06 ± 0.87
1.5	26.75 ± 2.88	11.80 ± 1.18	13.97 ± 0.76	7.58 ± 0.33
2	26.77 ± 2.89	11.60 ± 1.16	13.20 ± 1.25	6.73 ± 0.94
3	25.84 ± 2.67	11.47 ± 1.15	12.37 ± 1.87	6.36 ± 0.69
4	23.64 ± 2.51	11.19 ± 2.14	11.75 ± 1.58	5.69 ± 0.52
5	22.84 ± 2.36	10.61 ± 1.53	11.50 ± 0.78	5.67 ± 0.59
6	21.63 ± 3.14	10.22 ± 1.31	11.27 ± 0.68	5.59 ± 0.94
7	21.84 ± 1.57	10.13 ± 0.85	11.38 ± 0.70	5.39 ± 0.21
8	21.04 ± 2.41	9.64 ± 0.54	11.50 ± 0.37	5.43 ± 0.37
24	15.02 ± 1.90	9.44 ± 0.40	10.74 ± 0.48	5.28 ± 0.48
32	12.90 ± 1.12	9.43 ± 1.17	9.71 ± 0.54	5.17 ± 0.54
48	10.85 ± 0.97	6.36 ± 1.12	9.28 ± 0.50	5.10 ± 0.86

Tabla 3.IV.3. Valores de hinchamiento para cada tiempo, Q_t , de las muestras M0-100 y M0-275 a pH 6.8 y 7.5

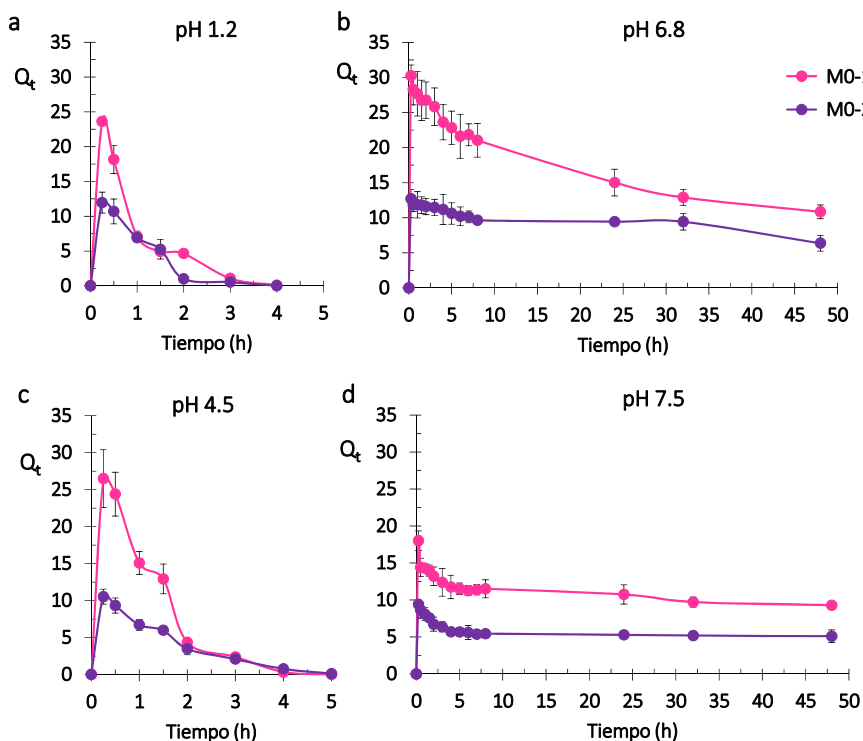


Figura 3.IV.7. Perfiles de hinchamiento de las muestras MO-100 y MO-275 en medio acuoso tamponado a: a) pH 1.2, b) pH 6.8, c) pH 4.5 y d) pH 7.5

El estudio de hinchamiento pone de manifiesto el carácter iónico del entrecruzamiento de la red polimérica, ya que a $\text{pH} \leq 4.5$ el hidrogel pierde su integridad en pocas horas (de 2 a 4 horas). En cambio, a valores de pH cercanos a la neutralidad, esto es, pH 6.8 y 7.5, se observa un efecto de sobrehinchamiento, ya que inicialmente retiene mayor cantidad de agua y posteriormente se alcanza el hinchamiento en equilibrio. La diferencia en los resultados obtenidos en función del pH se debe al distinto grado de ionización de los grupos funcionales que forman parte del enlace iónico responsable del entrecruzamiento del hidrogel. Cuando el hidrogel se encuentra en un medio de pH relativamente neutro, las moléculas de reticulante X tienen mayor número de cargas negativas, lo que favorece un mayor número de interacciones polímero-agente entrecruzante. Sin embargo, a pH ácido el reticulante no tiene suficientes cargas negativas para mantener el entrecruzamiento del polímero.

En cuanto al entrecruzamiento, se observa que el valor de hinchamiento es de 1.5 a 2.5 veces mayor para el hidrogel menos reticulado. Por ello, se concluye que a mayor porcentaje de entrecruzamiento menor es el hinchamiento, debido a que los enlaces entre cadenas limitan la relajación y expansión de la red polimérica.

4. Liberación

Se ha estudiado los perfiles de liberación de los hidrogeles MP-100 y MP-275 en medios acuosos tamponados a pH 1.2, 4.5, 6.8 y 7.5. Las tablas 3.IV.4 y 3.IV.5 recogen los porcentajes de fármaco liberado para cada tiempo. Los perfiles de liberación se representan gráficamente para comparar la influencia del pH (figura 3.IV.8) y la influencia del porcentaje de entrecruzamiento (figura 3.IV.9) en la liberación del activo. Los valores del factor de similitud para cada una de estas comparativas se recogen en la tabla 3.IV.6.

Tiempo (h)	pH 1.2		pH 4.5	
	MP-100	MP-275	MP-100	MP-275
0.25	50.06 ± 6.51	7.14 ± 0.93	26.59 ± 1.37	17.64 ± 2.29
0.5	81.78 ± 10.21	25.10 ± 6.23	50.84 ± 7.23	30.83 ± 7.65
1	94.29 ± 8.19	61.56 ± 6.58	78.94 ± 6.84	56.28 ± 7.70
1.5	99.99 ± 0.10	98.48 ± 4.50	91.84 ± 4.08	68.81 ± 3.15
2		99.38 ± 5.59	95.69 ± 5.38	86.26 ± 4.85
3		99.98 ± 0.22	96.33 ± 3.12	97.64 ± 7.07
4		99.99 ± 0.02	98.54 ± 3.14	98.33 ± 4.13
5			99.99 ± 0.33	99.99 ± 0.01

Tabla 3.IV.4. Porcentajes de liberación del piroxicam a los distintos tiempos de muestreo para los hidrogeles MP-100 y MP-275 a pH 1.2 y 4.5

Tiempo (h)	pH 6.8		pH 7.5	
	MP-100	MP-275	MP-100	MP-275
0.25	20.00 ± 7.13	11.38 ± 1.48	16.57 ± 2.15	11.79 ± 2.71
0.5	42.84 ± 6.35	21.15 ± 5.25	33.56 ± 8.33	23.37 ± 3.47
1	73.69 ± 8.04	38.59 ± 7.21	63.54 ± 11.87	43.34 ± 7.23
1.5	85.62 ± 10.38	50.45 ± 2.31	79.36 ± 3.63	48.64 ± 10.08
2	91.59 ± 8.82	58.64 ± 3.30	88.75 ± 4.99	54.58 ± 5.25
3	97.45 ± 6.08	73.68 ± 4.59	97.02 ± 6.05	66.96 ± 4.17
4	97.87 ± 3.78	88.91 ± 3.43	98.56 ± 2.81	74.51 ± 2.88
5	98.93 ± 5.17	94.47 ± 5.89	98.39 ± 3.13	81.77 ± 5.10
6	99.59 ± 2.33	96.95 ± 7.10	98.37 ± 3.25	86.63 ± 8.10
7	99.99 ± 0.25	99.45 ± 1.21	99.95 ± 1.20	91.55 ± 4.79
8		100.09 ± 3.24	99.48 ± 1.23	93.29 ± 3.95
24			99.47 ± 2.32	98.58 ± 4.29
30			99.94 ± 1.23	98.37 ± 2.59
48			99.98 ± 0.37	99.99 ± 2.22

Tabla 3.IV.5. Porcentajes de liberación del piroxicam a los distintos tiempos de muestreo para los hidrogeles MP-100 y MP-275 a pH 6.8 y 7.5

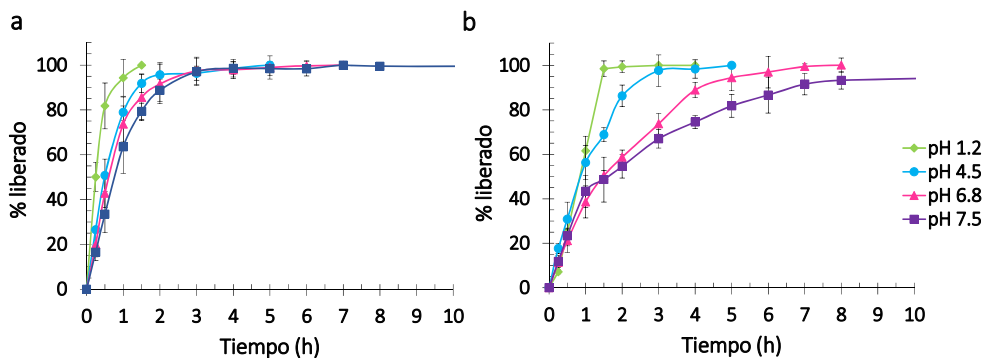


Figura 3.IV.8. Perfiles de liberación de piroxicam en función del pH del medio para el hidrogel a) MP-100 y b) MP-275

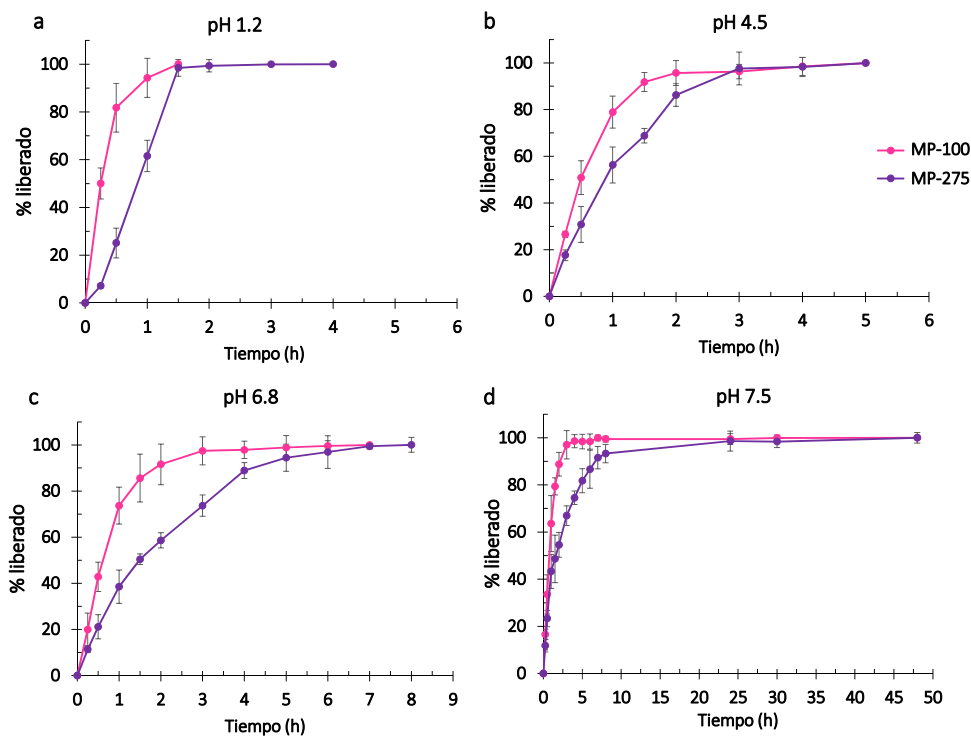


Figura 3.IV.9. Perfiles de liberación del piroxicam en función del porcentaje de entrecruzamiento del hidrogel a pH a) 1.2, b) 4.5, c) 6.8, d) 7.5

		pH 1.2		pH 4.5		pH 6.8		pH 7.5	
		100	275	100	275	100	275	100	275
pH 1.2	100		17.24						
	275								
pH 4.5	100	30.87			35.45				
	275		39.47						
pH 6.8	100	25.57		58.81			28.06		
	275		28.60		37.71				
pH 7.5	100	20.85		42.53		55.37			31.89
	275		28.70		36.89		58.95		

Tabla 3.IV.6. Valores de f_2 para las comparativas de los perfiles en función del pH (color gris) y del grado de entrecruzamiento (color lila). $f_2 < 50$, rojo, curvas diferentes; $f_2 \geq 50$, verde, curvas similares

En base a los valores de f_2 se concluye que existen diferencias significativas entre la liberación de los hidrogeles con distinto grado de reticulación a cualquier pH. Asimismo, se observan diferencias entre los perfiles de liberación de un mismo hidrogel a distintos valores de pH, excepto para el MP-100 a pH 4.5-6.8, y a pH 6.8-7.5, y para el MP-275 a pH 6.8-7.5, en cuyos casos los perfiles obtenidos son similares ($f_2 > 50$).

Los perfiles de liberación se han estudiado matemáticamente aplicando la ecuación de Korsmeyer-Peppas para determinar la cinética de liberación y el mecanismo de liberación del fármaco. La tabla 3.IV.7 recoge los valores del exponente difusional (n) y la constante cinética (K) así como la SSR obtenida tras el ajuste de los datos a dicho modelo matemático.

En general, el valor del exponente difusional se encuentra entre 0.5 y 1, excepto en el caso del MP-275 a pH 1.2. Dicho rango de valores de n concuerdan con una liberación influida tanto por la difusión como por la relajación de las cadenas poliméricas, denominada "Transporte anómalo". Según estos resultados, el modelo de Korsmeyer-Peppas sugiere el estudio de los modelos cinéticos de orden uno y de Peppas-Sahlin para caracterizar mejor la liberación. La tabla 3.IV.7, que recoge los valores de SSR de estos ajustes, muestra que el modelo cinético de liberación que mejor se ajusta a los datos experimentales es la cinética de orden uno. Dicha cinética es representativa de las formas farmacéuticas con liberación combinada por difusión de Fick y relajación/erosión de la matriz polimérica, lo que concuerda con los parámetros obtenidos por el modelo de Korsmeyer-Peppas y las observaciones experimentales de desintegración de la matriz a pH ácido (pH 1.2-4.5). Cuanto mayor es el pH del medio y el porcentaje de entrecruzamiento del hidrogel, los valores de la constante de orden uno son menores, y, por tanto, la liberación es más lenta y prolongada.

		Korsmeyer-Peppas			Primer orden		Peppas-Sahlin
		n	k (h ⁻¹)	SSR	k ₁ (h ⁻¹)	SSR	SSR
MP-100	pH 1.2	0.71	1.34	5.08·10 ⁻¹²	3.04	2.53·10 ⁻³	1.71·10 ⁻²
	pH 4.5	0.73	0.80	1.40·10 ⁻³	1.47	3.91·10 ⁻³	9.67·10 ⁻²
	pH 6.8	0.87	0.74	1.40·10 ⁻³	1.20	6.23·10 ⁻³	1.57·10 ⁻¹
	pH 7.5	0.95	0.64	6.10·10 ⁻⁵	0.98	7.67·10 ⁻³	4.08·10 ⁻¹
MP-275	pH 1.2	1.39	0.62	5.79·10 ⁻⁴	1.06	1.04·10 ⁻¹	2.05·10 ⁻¹
	pH 4.5	0.73	0.53	2.01·10 ⁻³	0.85	8.31·10 ⁻³	6.00·10 ⁻²
	pH 6.8	0.67	0.36	2.98·10 ⁻³	0.48	6.24·10 ⁻³	4.45·10 ⁻²
	pH 7.5	0.57	0.37	7.67·10 ⁻³	0.39	2.46·10 ⁻²	2.18·10 ⁻¹

Tabla 3.IV.7. SSR del ajuste de los modelos cinéticos de liberación: Korsmeyer-Peppas, orden uno y Peppas-Sahlin, y parámetros de los modelos: Korsmeyer-Peppas (n y k) y orden uno (k_1)

5. Toxicidad en Caco-2

La toxicidad de los hidrogeles y de sus componentes se ha evaluado en cultivos celulares Caco-2. La tabla 3.IV.8 y la figura 3.IV.10 muestran la supervivencia celular tras 24, 48 y 72 horas de exposición a las muestras evaluadas, comparado con un control en ausencia de tratamiento. Los datos se expresan como porcentaje de la absorbancia del control no tratado.

	24 h	48 h	72 h
Control	96.35 ± 4.24	100 ± 5.04	103 ± 3.45
Reticulante X	96.96 ± 5.02	94.18 ± 4.54	95.36 ± 3.51
Quitosán	104.82 ± 6.59	98.89 ± 3.02	107.89 ± 5.68
M0-100	96.78 ± 4.74	105.43 ± 3.23	106.84 ± 4.56
M0-275	94.22 ± 3.81	104.52 ± 5.33	98.51 ± 4.35

Tabla 3.IV.8. Porcentajes de supervivencia celular de los cultivos Caco-2 a las 24, 48 y 72 h en ausencia (control) y presencia de: reticulante X, quitosán, M0-100 y M0-275

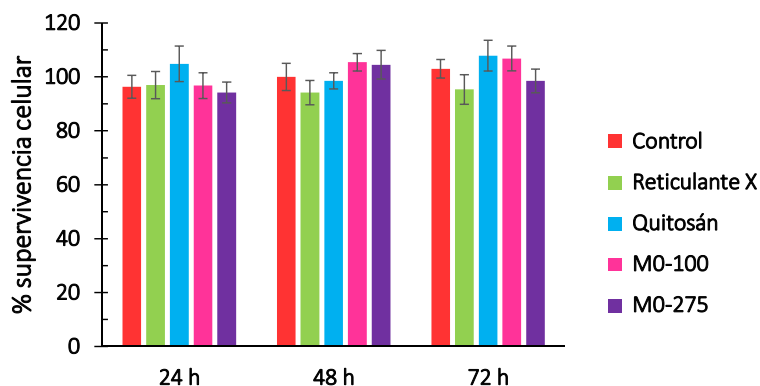


Figura 3.IV.10. Porcentajes de supervivencia celular de los cultivos Caco-2 a las 24, 48 y 72 h en ausencia (control) y presencia de: reticulante X, quitosán M0-100 y M0-275

No existen diferencias estadísticamente significativas en porcentaje de supervivencia celular entre los distintos grupos, por lo que se concluye que tanto los componentes de partida (polímero y reticulante) como los hidrogeles obtenidos carecen de toxicidad.

6. Extensibilidad

La obtención de unas propiedades reológicas óptimas facilita la extensión de la formulación en la superficie epitelial para formar una lámina que permita la liberación uniforme del fármaco, asegurando la eficacia del preparado. El hidrogel liofilizado se puede molturar fácilmente obteniendo un polvo fino que se rehidrata formando un hidrogel viscoso y untuoso. La extensibilidad de los hidrogeles M0-100 y M0-275 se ha evaluado comparándolos con el polímero sin entrecruzar, a la misma concentración, y con una formulación comercial de gel de carbómero (Salvacam®). Los resultados se recogen en la tabla 3.IV.9 y figura 3.IV.11.

Peso (g)	Área (cm ²)			
	Comercial	Quitosán	M0-100	M0-275
0	0.10 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.16 ± 0.01
5	0.32 ± 0.03	1.02 ± 0.13	0.39 ± 0.06	0.46 ± 0.09
15	0.54 ± 0.09	2.07 ± 0.45	0.56 ± 0.07	0.58 ± 0.06
50	0.82 ± 0.11	3.08 ± 0.66	0.80 ± 0.10	0.78 ± 0.09
100	1.23 ± 0.14	4.10 ± 0.47	1.16 ± 0.14	1.09 ± 0.15
150	1.52 ± 0.22	5.27 ± 0.39	1.40 ± 0.22	1.29 ± 0.22
200	1.72 ± 0.28	5.67 ± 0.45	1.58 ± 0.29	1.45 ± 0.29
300	2.02 ± 0.32	6.58 ± 0.73	1.86 ± 0.29	1.71 ± 0.27
500	2.53 ± 0.32	7.50 ± 0.87	2.29 ± 0.29	2.06 ± 0.26
1000	3.08 ± 0.41	8.75 ± 0.89	2.76 ± 0.38	2.44 ± 0.35
1500	3.57 ± 0.41	10.37 ± 0.90	3.14 ± 0.38	2.71 ± 0.35
1800	3.96 ± 0.41	11.50 ± 0.79	3.44 ± 0.36	2.91 ± 0.31

Tabla 3.IV.9. Valores del área de extensión del gel comercial, el quitosán y los hidrogeles M0-100 y M0-275 en función del peso aplicado

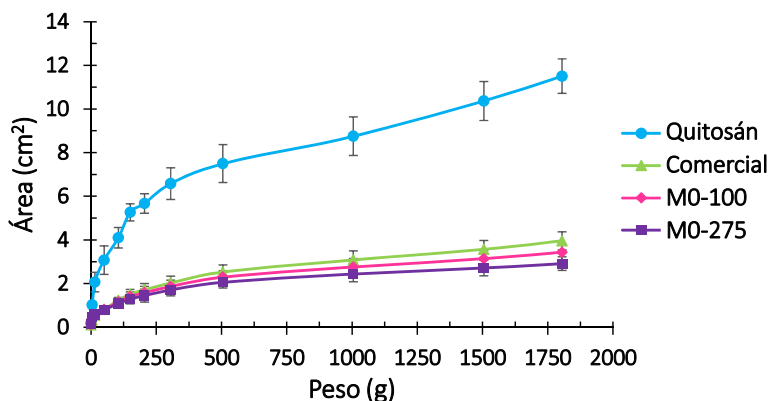


Figura 3.IV.11. Valores del área de extensión del gel comercial, el quitosán y los hidrogeles M0-100 y M0-275 en función del peso aplicado

Las formulaciones tipo hidrogel evaluadas tienen una extensibilidad similar a la del gel comercial por lo que se consideran aptas para la aplicación tópica. Como se esperaba, la solución de quitosán a la misma concentración que los hidrogeles tiene una extensibilidad de 3 a 4 veces mayor, debido a la ausencia de entrecruzamiento entre sus cadenas que limite su movimiento y extensión.

7. Adhesión a la piel

El hidrogel rehidratado (figura 3.IV.12 a) es una formulación semisólida de consistencia viscosa y uniforme. Tras su aplicación sobre la piel, en forma de una capa fina de producto, se produce el secado de la red polimérica, de modo que a los 20-30 minutos se forma una película transparente que queda adherida a la piel (figura 3.IV.12 b), adaptándose a su forma y con cierta elasticidad que permite realizar los movimientos normales. La adhesión a la piel de esta película polimérica, o parche, se ha analizado mediante la prueba Loop Tack (figura 3.IV.12 c), obteniéndose una fuerza de adhesión de 3.17 ± 0.57 Newton.

No existe un método estándar para realizar esta medición, pero en estudios similares²⁹ se obtienen fuerzas de adhesión inferiores (0.7-2.25 en función del tipo de adhesivo). La desventaja de los adhesivos es que su retirada causa dolor, siendo éste mayor cuanto mayor es la fuerza adhesiva. La formulación propuesta en este trabajo tiene una adhesividad a la piel adecuada y no se despegaba cuando se humedece ligeramente. Sin embargo, se puede retirar fácilmente de la piel rehidratándola durante unos minutos con un algodón o gasa empapada en agua y posteriormente con una leve fricción sin causar dolor.

La figura 3.IV.12 d-f muestra imágenes de la película de hidrogel despegada de la piel sin rehidratación previa, se aprecia que el hidrogel forma una capa fina, consistente y casi transparente.

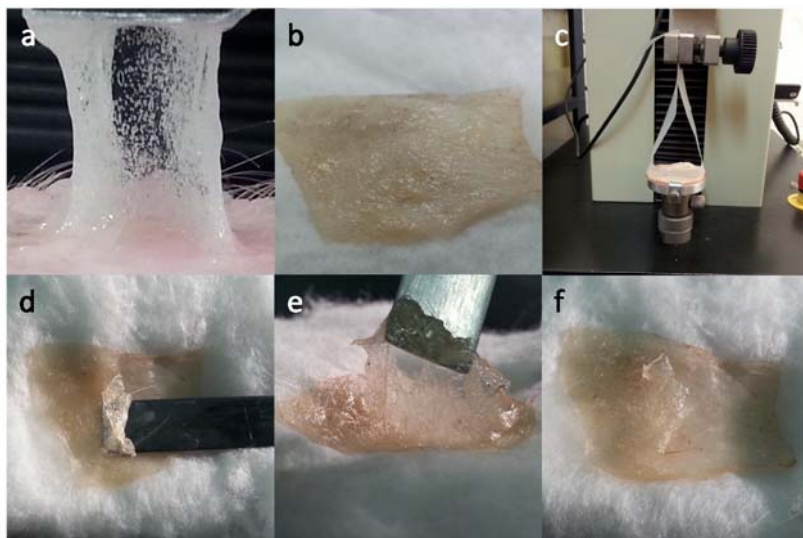


Figura 3.IV.12. a) Aspecto del hidrogel rehidratado, b) hidrogel seco sobre la piel formando una lámina casi transparente, c) esquema del ensayo de adhesión del parche, d-f) aspecto del parche al ser despegado de la piel sin rehidratación previa

8. Irritación dérmica

El estudio de irritación dérmica se ha realizado en conejos ya que la piel de estos animales es más sensible que la piel humana; además se asume que los compuestos que provocan corrosión o irritación son similares en humanos y en conejos. El motivo de prolongar la exposición hasta las 4 horas es comprobar si aumenta la sensibilidad de la piel al compuesto, de manera que en caso de que éste provocara irritación es más fácil detectarlo. Este test puede ser sobre-predictivo, es decir, se trata de un test conservador para la irritación/corrosión en humanos; esto implica que los efectos observados con este ensayo puede que no ocurran en humanos.³⁰

El estudio se ha realizado en dos conejos ya que, según la guía OCDE TG 404, la reducción de 3 a 2 animales ensayados no tiene impacto en la clasificación y en los dos animales ensayados se han obtenido los mismos resultados.

La figura 3.IV.13 recoge distintas imágenes del ensayo: en las imágenes a-d se distingue la formulación recién aplicada (a), a los 15 minutos (b), tras 1 hora (c) y tras 4 horas (d) de su aplicación. En las siguientes imágenes se muestra la piel

después de la retirada del parche aplicado durante 4 horas; inmediatamente después de su eliminación la piel se encuentra ligeramente sonrosada debido a la leve fricción necesaria para su completa eliminación (figura 3.IV.13 e). Sin embargo, el enrojecimiento desaparece rápidamente y durante los siguientes 14 días de observación no se aprecia ningún signo de irritación en la piel; así lo demuestran las imágenes f, g, h, que corresponden a las 2 horas, 2 días y 7 días de su retirada, respectivamente.

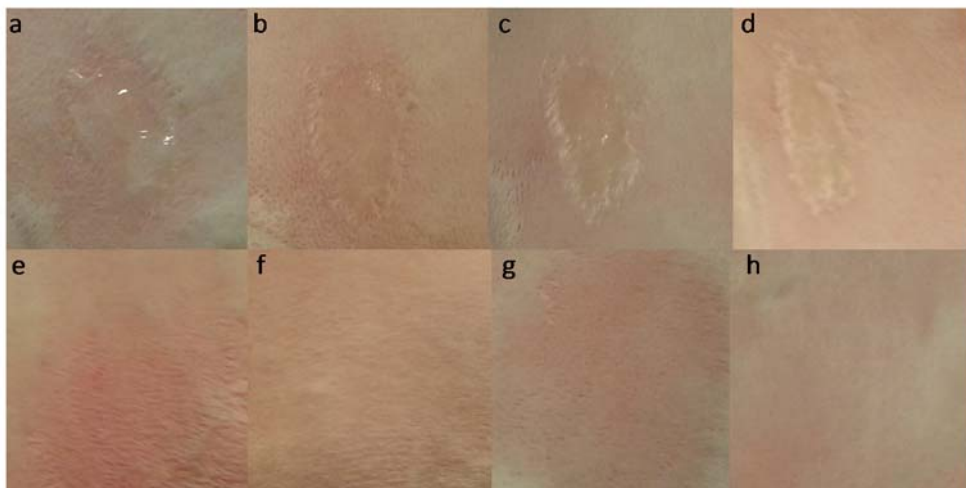


Figura 3.IV.13. Imágenes de la piel del conejo: a) inmediatamente tras la aplicación de la formulación, b) a los 15 minutos, c) a la hora, d) a las 4 h de su aplicación. Imágenes de la piel tras la retirada del parche aplicado durante 4 h: e) recién eliminado, f) a las 2 h, g) a los 2 días, h) a los 7 días tras su eliminación

En ambos conejos a cualquiera de los tiempos de exposición ensayados no se ha producido irritación ni enrojecimiento de la piel durante todo el periodo evaluado, por lo que se concluye que se trata de una formulación no irritante para la piel con potenciales aplicaciones clínicas en humanos.

9. Permeabilidad

La evaluación de la aplicación de los hidrogeles como sistemas de liberación modificada de fármacos en piel se ha realizado determinando la cantidad de fármaco presente en piel y receptor y la constante de permeabilidad (K_p). Se ha evaluado el hidrogel MP-275 rehidratado en dos medios de distinta composición.

En la formulación 1, el medio está compuesto por propilenglicol al 10%; en la formulación 2, el medio está compuesto por un 10% de propilenglicol, 10% de glicerol y 10% de alcohol isopropílico. En la tabla 3.IV.10 se recogen los valores de fármaco permeado por cm^2 , la constante de permeabilidad y la cantidad de fármaco en piel a las 24 horas para estas formulaciones. Los perfiles de fármaco permeado a receptor para cada tiempo se representan en la figura 3.IV.14.

		Formulación 1	Formulación 2
Fármaco permeado (mg/cm^2)	Tiempo (h)		
	14	$8.34 \cdot 10^{-4} \pm 9.40 \cdot 10^{-5}$	$9.98 \cdot 10^{-5} \pm 3.33 \cdot 10^{-5}$
	16	$9.10 \cdot 10^{-4} \pm 1.11 \cdot 10^{-4}$	$1.73 \cdot 10^{-4} \pm 9.60 \cdot 10^{-5}$
	18	$1.04 \cdot 10^{-3} \pm 1.11 \cdot 10^{-4}$	$2.06 \cdot 10^{-4} \pm 1.32 \cdot 10^{-4}$
	20	$1.15 \cdot 10^{-3} \pm 1.51 \cdot 10^{-4}$	$2.20 \cdot 10^{-4} \pm 1.08 \cdot 10^{-4}$
	22	$1.26 \cdot 10^{-3} \pm 1.95 \cdot 10^{-4}$	$2.82 \cdot 10^{-4} \pm 1.22 \cdot 10^{-4}$
24	$1.37 \cdot 10^{-3} \pm 1.73 \cdot 10^{-4}$	$2.98 \cdot 10^{-4} \pm 1.21 \cdot 10^{-4}$	
Kp (cm/s)		$1.11 \cdot 10^{-5} \pm 2.51 \cdot 10^{-6}$	$3.97 \cdot 10^{-6} \pm 2.23 \cdot 10^{-6}$
Fármaco en piel (mg/cm^2)		$1.31 \cdot 10^{-2} \pm 8.72 \cdot 10^{-3}$	$3.20 \cdot 10^{-2} \pm 9.89 \cdot 10^{-3}$

Tabla 3.IV.10. Cantidad de fármaco permeado a cada tiempo, constante de permeabilidad y cantidad de fármaco en piel a las 24 horas para las formulaciones 1 y 2

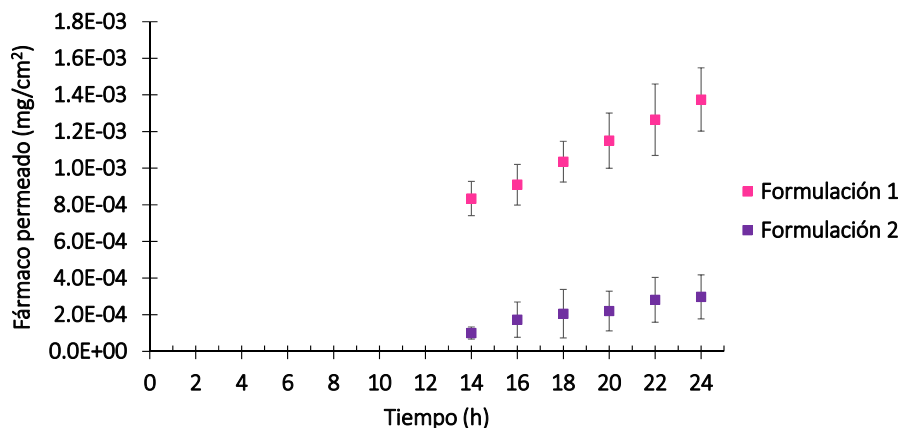


Figura 3.IV.14. Fármaco permeado por cm^2 en función del tiempo para las formulaciones 1 y 2

La constante de permeabilidad de la formulación 1 es significativamente mayor que la de la formulación 2, por lo que la cantidad que llega a receptor es mayor. En cambio, la cantidad de fármaco retenida en piel a las 24 horas es significativamente mayor con la formulación 2.

En base a los resultados obtenidos se concluye que el hidrogel M0-275 permite la administración de fármacos a nivel tópico, sin que se absorban de forma considerable. La permeabilidad del fármaco en la piel se puede regular modificando el medio de rehidratación del hidrogel. Este sistema polimérico podría servir como vehículo para el tratamiento tópico de afecciones cutáneas (como alteraciones de la pigmentación, infecciones bacterianas o víricas, micosis, úlceras, lesiones) o como formulación cosmética, pudiendo limitar la absorción transdérmica para minimizar los efectos secundarios a nivel sistémico.

10. Cicatrización

Debido a las propiedades hemostáticas, antimicrobianas y cicatrizantes del quitosán³¹ y de regeneración del reticulante X se ha planteado la posibilidad de emplear el hidrogel MP-275 liofilizado como apósito para la curación de heridas. Para ello, se ha evaluado la evolución de las heridas de espesor total creadas quirúrgicamente en la zona dorsal de ratas Wistar. El modelo animal usado es uno de los más comunes para los estudios de cicatrización.³²⁻³⁴ El tamaño de las heridas creadas (3 cm de diámetro) se ha establecido en base a estudios previos³⁵ que ponen de manifiesto que cuando el área es menor la auto-regeneración del tejido domina el proceso y no se aprecia el efecto cicatrizante de las formulaciones ensayadas.

En la figura 3.IV.15 se muestra la evolución de las heridas durante 21 días en los animales tratados con el hidrogel y los correspondientes controles (sin tratamiento, tratado con quitosán o con reticulante X). El porcentaje de cierre de la herida, referido al área inicial, se recoge en la tabla 3.IV.11 y figura 3.IV.16 para cada tiempo estudiado. Observando los porcentajes de cierre de la herida, el tratamiento de los grupos con quitosán o con reticulante X no suponen ninguna ventaja frente al grupo control. En el caso del grupo tratado con el hidrogel, a los 7 días el área de la herida es menor que para el grupo sin tratamiento, con un porcentaje de cierre de la herida del 39.79% frente al 26.10% del grupo sin

tratamiento. A los 14 y 21 días de la escisión quirúrgica de la piel ambas heridas presentan un porcentaje de cierre similar, debido a la auto-regeneración del tejido.

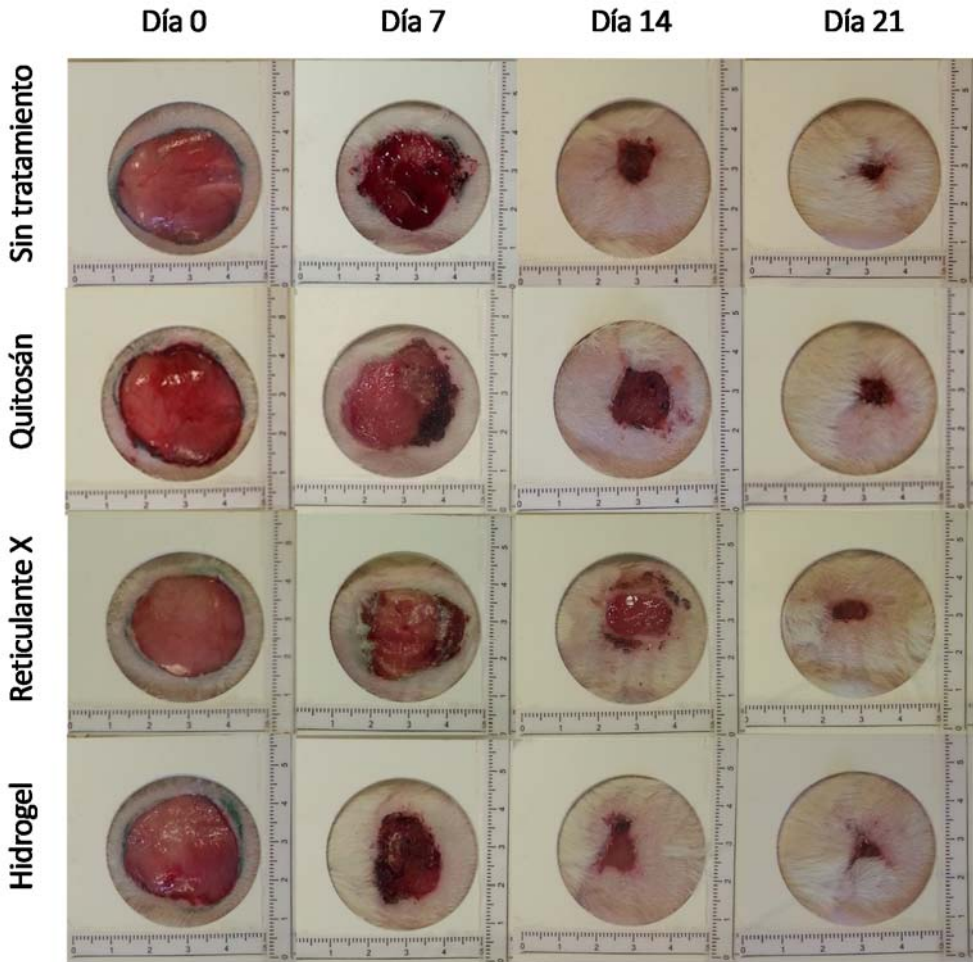


Figura 3.IV.15. Evolución de las heridas de espesor total en ausencia de tratamiento, tratadas con quitosán, con una solución de reticulante X y con el hidrogel MO-275. Imágenes tomadas el día de la escisión quirúrgica y a los 7, 14 y 21 días de evolución

Día	% cierre de la herida			
	Sin tratamiento	Quitósán	Reticulante X	Hidrogel
7	26.10 ± 10.68	13.19 ± 10.76	10.68 ± 6.05	39.79 ± 11.21
14	84.93 ± 5.05	80.84 ± 6.12	74.62 ± 2.01	82.34 ± 7.24
21	96.17 ± 2.19	92.87 ± 2.34	90.26 ± 8.37	91.97 ± 3.24

Tabla 3.IV.11. Porcentaje de curación de la herida a los 7, 14 y 21 días desde la escisión de la piel en las ratas sin tratamiento y las tratadas con quitósán, solución de reticulante X y el hidrogel MO-275

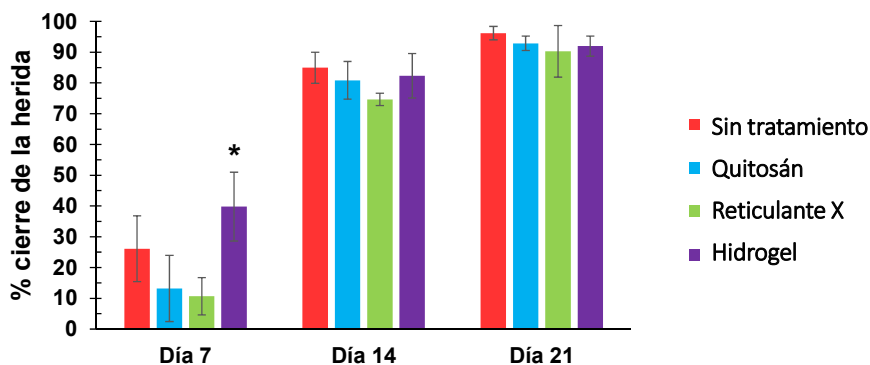


Figura 3.IV.16. Gráfica de evolución del cierre de la herida a los 7, 14 y 21 días para los animales sin tratamiento y los tratados con quitósán, solución de reticulante X y el hidrogel MO-275. (*) = diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo sin tratamiento

Sin embargo, el estudio microscópico de las muestras de piel a los 23 días (estado de la herida similar al de los 21 días) revela que la cicatrización es más eficaz en el grupo tratado con el hidrogel. En la figura 3.IV.17 se observa el aspecto de la piel sana, en la que se distingue la epidermis con los estratos germinativo, granuloso, espinoso y córneo, y la dermis. En la figura 3.IV.18, herida sin tratamiento, se distingue principalmente el tejido de granulación y una gran cantidad de células del infiltrado inflamatorio, también se observa neovascularización, aunque no se diferencia la dermis y la epidermis. Esta misma observación se aplica para las figuras 3.IV.19 y 3.IV.20 en las que se muestra el aspecto de la herida tratada con quitósán y con reticulante X, respectivamente. En la figura 3.IV.21 se muestra el aspecto de la piel tras el tratamiento con el hidrogel, en este caso se distingue la epidermis con los estratos germinativo, granuloso y

espinoso, y la dermis en la que se aprecia neovascularización; se observa además como la costra comienza a separarse del tejido.

El hidrogel ejerce varias acciones que ayudan a la regeneración de la herida, ya que crea un medio permanente húmedo que estimula la actividad celular en todas las etapas del proceso de cicatrización, además absorbe el exudado y las secreciones. El medio húmedo que crea el hidrogel permite la desbridación del tejido necrótico, ayuda a la regeneración tisular en el estadio de granulación y favorece la división y actividad celular.³⁶ Asimismo, la red polimérica sirve de matriz extracelular que facilita la reepitelización.³⁵

En conclusión, el hidrogel MO-275 aplicado sobre heridas de espesor total no produce ningún daño en los tejidos ni impide la curación, sino que favorece el proceso de cicatrización, por lo que puede emplearse como sistema tipo apósito para la aplicación de sustancias terapéuticas que favorezcan la cicatrización.

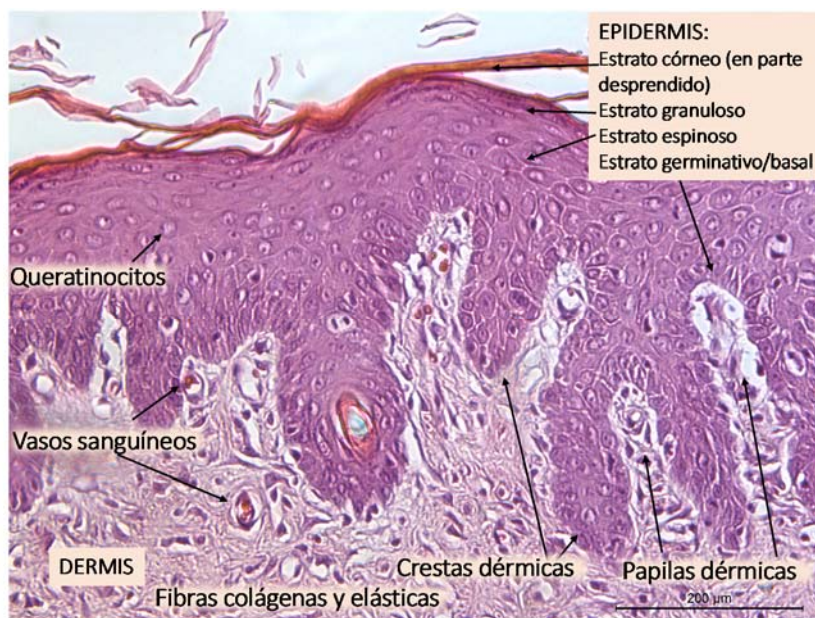


Figura 3.IV.17. Imagen de microscopía de la piel sana

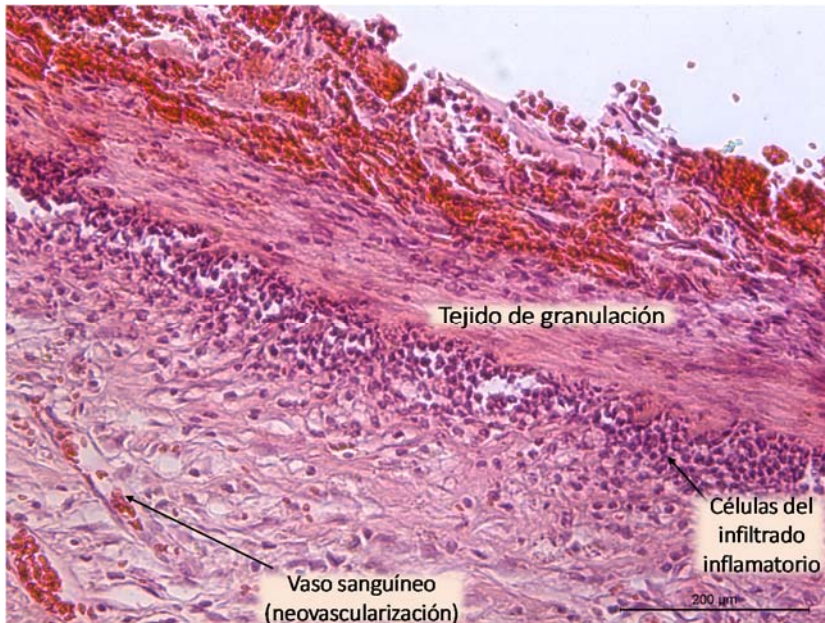


Figura 3.IV.18. Imagen de microscopía de la herida a los 23 días sin tratamiento

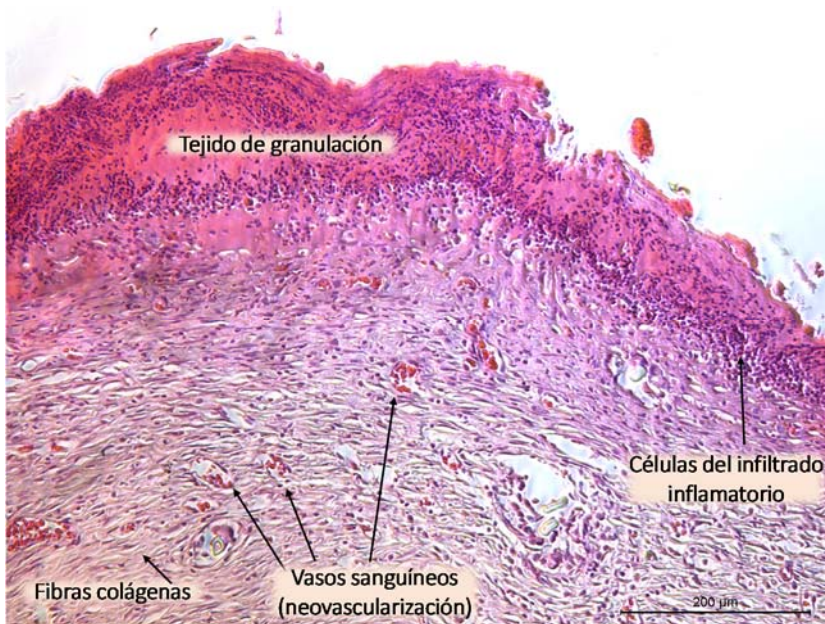


Figura 3.IV.19. Imagen de microscopía de la herida a los 23 días tratada con quitosán

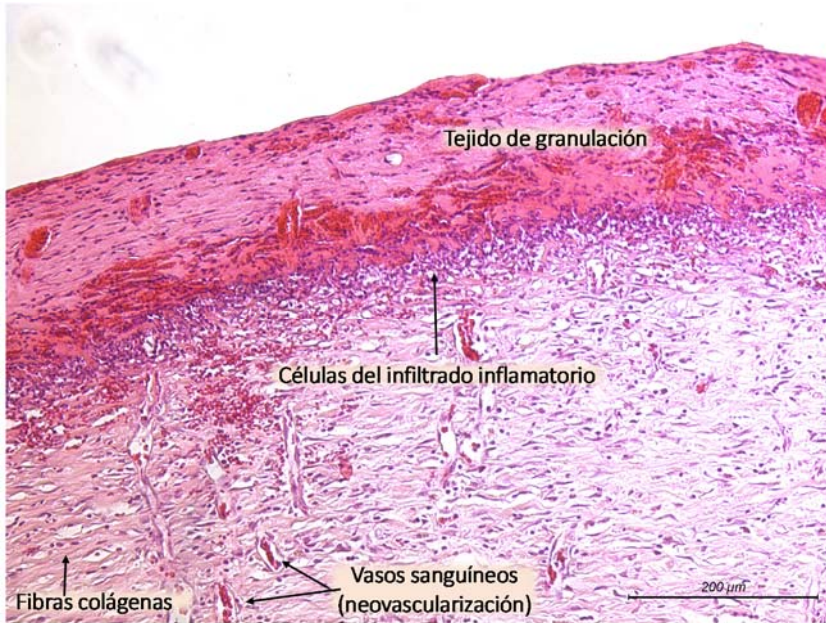


Figura 3.IV.20. Imagen de microscopía de la herida a los 23 días tratada con reticulante X

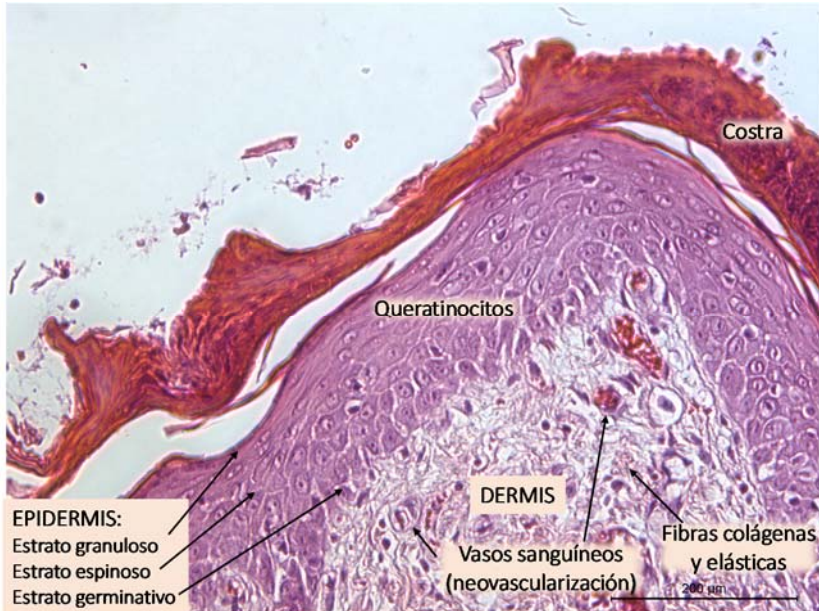


Figura 3.IV.21. Imágenes de microscopía de la herida a los 23 días tratada con MO-275

V. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

Conclusiones

En este trabajo se ha demostrado que la molécula “reticulante X”, soluble en agua, es un nuevo y prometedor agente entrecruzante para el quitosán, y potencialmente para otros polímeros catiónicos. La reacción entre esta molécula reticulante y el polímero se basa en la interacción iónica entre los grupos aniónicos del fosfoácido y los grupos amino catiónicos. Los estudios de caracterización han demostrado la interacción entre el quitosán y el reticulante X, la disminución de la estabilidad térmica debida al entrecruzamiento y la formación de una estructura de entramado polimérico. Se ha comprobado que a $\text{pH} \leq 4.5$ se desintegra en pocas horas debido, probablemente, a la pérdida de las cargas negativas del reticulante. Sin embargo, a valores de pH cercanos a la neutralidad, el hidrogel mantiene su integridad, siendo mayor su hinchamiento cuanto menor es el porcentaje de reticulación. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los

estudios de liberación, ya que la liberación del fármaco al medio es más rápida cuanto menor es el pH y menor es el porcentaje de entrecruzamiento. A pH 7.5 el hidrogel MP-275 libera el 90% del fármaco en 7 horas. Los perfiles de liberación siguen una cinética de orden uno.

Se ha demostrado también que el sistema propuesto no es tóxico en células Caco-2 y que su aplicación en la piel no produce irritación. Asimismo, se ha comprobado que las propiedades reológicas de extensibilidad de la formulación rehidratada son las adecuadas para una forma farmacéutica de administración cutánea y que su aplicación sobre la piel permite crear una película polimérica tipo parche con una buena adhesividad. Esta película polimérica permite la administración de sustancias activas a nivel tópico, limitando su acción a nivel sistémico.

La liofilización de la formulación permitiría la conservación del producto hasta su aplicación, manteniendo estable el hidrogel y el principio activo que contenga. Esta formulación liofilizada puede aplicarse en forma de apósito, sin rehidratar, sobre heridas de espesor total. Con este modo de uso se ha demostrado, a nivel microscópico, que el hidrogel mejora la cicatrización y regeneración de la piel herida, por lo que puede usarse como apósito para la curación de heridas, sólo o, preferiblemente, como sistema de aplicación de sustancias activas que favorezcan la cicatrización.

Conclusions

This work has shown that the molecule “crosslinker X”, soluble in water, is a promising new agent for chitosan crosslinking and, potentially, for other cationic polymers. The crosslinking reaction between this molecule and the polymer is based on ionic interaction between the anionic groups of the phosphoacid and cationic amino groups. Characterization studies have shown the interaction between chitosan and crosslinker X, producing a reduction of thermal stability due to crosslinking and the formation of a polymer framework. It has been found that at $\text{pH} \leq 4.5$ hydrogel disintegrates within a few hours, probably due to loss of the negative charges of the crosslinker molecule. However, at pH values near neutrality the hydrogel maintains its integrity. The lower the crosslinking percentage, the higher the swelling is. These results agree with those obtained in release studies

because the lower the pH and the lower the crosslinking percentage, the faster the drug release is. At pH 7.5 the hydrogel MP-275 has released 90% of the drug within 7 hours. The release profiles follow a first order kinetics.

It has been also shown that the proposed system is non-toxic in Caco-2 cells and its application does not produce skin irritation. In addition, it has been found that the extensibility properties of the rehydrated formulation are suitable for the cutaneous administration. Its application over the skin creates a polymeric film like a patch with good adhesiveness properties. This polymer film allows the application of active substances topically, limiting its systemic action.

The lyophilization of the formulation would allow product preservation until its application, keeping stable the hydrogel and the active substance contained therein. This lyophilised formulation can be applied as wound dressing, without previous rehydration, over full thickness wounds. With this mode of use it has been shown, at the microscopic level, that the hydrogel improves healing and regeneration of injured skin. Thus it can be used as wound dressing for wound healing, either alone or, preferably, as a drug application system for substances that promote healing.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur. J. Dermatol.* 2002; 12 (4): 390-399.
2. Arenas R. *Dermatología: Atlas, diagnóstico y tratamiento* 6ª ed. MCGRAW-HILL, 2015.
3. Serna J., Vitales M., López M.C., Molina A. Dermatología. *Farmacia Hospitalaria - Tomo II*: SEFH, 2002:841-875.
4. Marcotegui-Ros F. *Sistemas terapéuticos transdérmicos*, 1993.
5. Parches transdérmicos. *Real Farmacopea Española* 01/2008, 1011.
6. Allevato M.A. *Sistemas terapéuticos transdérmicos. Act Terap Dermatol* 2007; 30 (3): 154-165.
7. Maji P., Arijit G., Sougata J., Nirmal M. Preparation and Characterization of Maleic Anhydride Cross-Linked Chitosan-Polyvinyl Alcohol Hydrogel Matrix Transdermal Patch. *JPST* 2013; 2 (2): 62-67.

8. ITF-Labomed. Flector® Parche Dérmico 180mg Disponible en: <http://itfchile.cl/flector-parches-180mg/>. Fecha de consulta: 14/11/2016
9. AEMPS. Ficha técnica Qutenza Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000909/WC500040453.pdf. Fecha de consulta: 14/11/2016
10. AEMPS. Ficha técnica Versatis Disponible en: https://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/71848/FichaTecnica_71848.html.pdf. Fecha de consulta: 14/11/2016
11. Webb R.C., Bonifas A.P., Behnaz A., Zhang Y., Yu K.J., Cheng H., et al. Ultrathin conformal devices for precise and continuous thermal characterization of human skin. *Nat Mater* 2013; 12 (10): 938-944.
12. Kost J., Mitragotri S., Gabbay R.A., Pishko M., Langer R. Transdermal monitoring of glucose and other analytes using ultrasound. *Nat. Med.* 2000; 6 (3): 347-350.
13. Xu S., Zhang Y., Jia L., Mathewson K.E., Jang K.-I., Kim J., et al. Soft Microfluidic Assemblies of Sensors, Circuits, and Radios for the Skin. *Science* 2014; 344 (6179): 70-74.
14. Lee K.T., Muller D.A., Coffey J.W., Robinson K.J., McCarthy J.S., Kendall M.A., et al. Capture of the circulating Plasmodium falciparum biomarker HRP2 in a multiplexed format, via a wearable skin patch. *Anal. Chem.* 2014; 86 (20): 10474-10483.
15. Yu B., Kang S.Y., Akthakul A., Ramadurai N., Pilkenton M., Patel A., et al. An elastic second skin. *Nat Mater* 2016; 15 (8): 911-918.
16. Stabenau A., Winter G., Schmidt R. Pharmaceutical composition for topical use in form of xerogels or films and methods for production. 2005. Patente: WO 2005084650 A1.
17. Castro F.E.O.M.B., Azcoitia R.I., Palomares C.T., Herrero M.J., Alonso V.A.I., Del O.B.M. Composición antioxidante. 2011. Patente: WO2011157880 A1.
18. Reyes F., Rodriguez G., Aguilar M.R., Gonzalez Á., San J., Solis R.E., et al. Apósito para cicatrización de heridas comprometidas. 2014. Patente: WO 2014076336 A1.
19. Chenite A., Chaput C., Wang D., Combes C., Buschmann M.D., Hoemann C.D., et al. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials* 2000; 21 (21): 2155-2161.
20. Shu X.Z., Zhu K.J. Controlled drug release properties of ionically cross-linked chitosan beads: the influence of anion structure. *Int. J. Pharm.* 2002; 233 (1-2): 217-225.

21. Shu X.Z., Zhu K.J. The influence of multivalent phosphate structure on the properties of ionically cross-linked chitosan films for controlled drug release. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2002; 54 (2): 235-243.
22. Supper S., Anton N., Boisclair J., Seidel N., Riemenschmitter M., Curdy C., et al. Chitosan/glucose 1-phosphate as new stable in situ forming depot system for controlled drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2014; 88 (2): 361-373.
23. Nair L.S., Starnes T., Ko J.W., Laurencin C.T. Development of injectable thermogelling chitosan-inorganic phosphate solutions for biomedical applications. *Biomacromolecules* 2007; 8 (12): 3779-3785.
24. Peppas N.A., Sahlin J.J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *Int. J. Pharm.* 1989; 57 (2): 169-172.
25. Duncan B., Abbott S., Roberts R. Measurement Good Practice Guide No. 26: Adhesive Tack, 1999.
26. OECD. *Test No. 404: Acute Dermal Irritation/Corrosion*. OECD Publishing.
27. Schmook F.P., Meingassner J.G., Billich A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. *Int. J. Pharm.* 2001; 215 (1-2): 51-56.
28. Davies D.J., Ward R.J., Heylings J.R. Multi-species assessment of electrical resistance as a skin integrity marker for in vitro percutaneous absorption studies. *Toxicol In Vitro* 2004; 18 (3): 351-358.
29. Klode J., Schottler L., Stoffels I., Korber A., Schadendorf D., Dissemond J. Investigation of adhesion of modern wound dressings: a comparative analysis of 56 different wound dressings. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2011; 25 (8): 933-939.
30. OECD. New guidance document on an integrated approach on testing and assessment (IATA) for skin corrosion and irritation. Series on Testing and Assessment. No. 203, 2014.
31. Dai T., Tanaka M., Huang Y.-Y., Hamblin M.R. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert review of anti-infective therapy* 2011; 9 (7): 857-879.
32. Gopal A., Kant V., Gopalakrishnan A., Tandan S.K., Kumar D. Chitosan-based copper nanocomposite accelerates healing in excision wound model in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2014; 731: 8-19.
33. Costa F.L., Tiussi L.D., Nascimento M.S., Correa A.C., Yasojima E.Y., Pires C.A. Diclofenac topical gel in excisional wounds maintain heal quality and reduce phlogistic signals. *Acta Cir. Bras.* 2014; 29 (5): 328-333.

34. Prestes M.A., Ribas C.A., Ribas Filho J.M., Moreira L.B., Boldt A.B., Brustolin E.V., et al. Wound healing using ionic silver dressing and nanocrystalline silver dressing in rats. *Acta Cir. Bras.* 2012; 27 (11): 761-767.
35. Huang X., Zhang Y., Zhang X., Xu L., Chen X., Wei S. Influence of radiation crosslinked carboxymethyl-chitosan/gelatin hydrogel on cutaneous wound healing. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2013; 33 (8): 4816-4824.
36. Blanco M.D., Olmo R.M., Teijón J.M. Hydrogels. En: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology Third Edition*. Informa Healthcare, 2006:2021-2039.

Capítulo 4

NHs autoensamblados basados en
hialuronato modificado hidrofóbicamente

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años la nanotecnología se ha aplicado ampliamente en sistemas de liberación de fármacos ya que ofrece un método adecuado para la liberación de agentes terapéuticos controlada en el tiempo y en lugares específicos. Los sistemas de liberación a escala nanométrica tienen muchas ventajas, como se ha comentado en la “Introducción general”, especialmente para aumentar la solubilidad de fármacos hidrófobos, aumentar la acumulación de fármacos en tumores, mejorar la estabilidad de los agentes terapéuticos frente a la degradación química o enzimática y disminuir los efectos secundarios.¹

Existen multitud de sistemas de liberación a nanoescala entre los que se encuentran las nanopartículas lipídicas, inorgánicas, magnéticas y poliméricas; los nanohidrogeles (NHs) pertenecen a este último tipo. Los NHs son sistemas de liberación con múltiples ventajas debido a su gran capacidad de carga, alta estabilidad, consistencia blanda y suave que les permite una deformación reversible y su capacidad de respuesta frente a una amplia variedad de estímulos ambientales,

como fuerza iónica, pH y temperatura. Los NHs se han propuesto como sistemas de liberación de agentes antitumorales ya que presentan una circulación sistémica prolongada y se pueden acumular en masas tumorales. Una de las ventajas de éstos frente a los hidrogeles macroscópicos es que los NHs logran una liberación controlada más precisa debido a su mayor área superficial, aunque también son útiles en sistemas que requieren una liberación rápida o explosiva (efecto *burst*), ya que pueden internalizarse en las células y responder a señales intracelulares.²

La eficiencia de encapsulación de un sistema de liberación puede valorarse como porcentaje en peso del fármaco cargado por unidad de peso del sistema de liberación. Para la mayoría de sistemas, este porcentaje se sitúa entre un 5 y un 25%, por lo que se considera una alta capacidad de carga aquella con valores del 10 al 60%.³ En general, para los NHs la capacidad de carga es mayor que las observadas normalmente para otros nanovehículos (micelas poliméricas, liposomas, nanopartículas biodegradables, etc.). El principal motivo radica en que en el estado hinchado su composición es mayoritariamente acuosa, lo que proporciona mayor amplitud espacial para la incorporación de fármacos y macromoléculas.⁴

La formación de los NHs se puede llevar a cabo a partir de polímeros precursores (polímeros preformados) o por polimerización de monómeros. Se entiende como polímeros precursores aquellos que pueden formar NHs por autoensamblaje (entrecruzamiento físico) o aquellos que tienen un número de sitios reactivos tal que les permite ser usados directamente para entrecruzamientos químicos. También se puede modificar la estructura de los polímeros precursores para lograr una reticulación física o química. En la polimerización heterogénea de monómeros, el entrecruzamiento es químico y la formación de los NHs ocurre en dos pasos, generalmente simultáneos: polimerización y gelificación. Esta técnica es más eficiente que la de polímeros precursores.¹⁻⁴

Las reticulaciones químicas consisten en la formación de enlaces covalentes que constituyen un entramado polimérico insoluble. Existen multitud de mecanismos para el entrecruzamiento químico, como la cuaternización de grupos amino,⁵ reacciones tipo click,⁶ entrecruzamiento fotoinducido,⁷ reacciones redox por puentes disulfuro,⁸ etc.

Los entrecruzamientos físicos se pueden originar por interacciones electrostáticas y/o interacciones anfifílicas (Van der Waals, enlaces de hidrógeno e

interacciones hidrófobas).⁴ Los NHs formados por entrecruzamiento físico pueden encapsular distintos tipos de moléculas, especialmente fármacos hidrófobos y biomacromoléculas. Estas reacciones se suele producir en medio acuoso y en condiciones suaves; las condiciones ambientales, como pH, fuerza iónica y temperatura, influyen determinantemente en el tamaño de partícula.

Los polianfolitos (polímeros con grupos cargados positiva y negativamente) pueden autoensamblarse por interacciones electrostáticas. La conformación de estos polímeros en solución depende de la distribución de los monómeros cargados a lo largo de la estructura del polímero y de las condiciones ambientales.^{9, 10}

Los polímeros anfífilicos también forman NHs al autoensamblarse espontáneamente en ambiente acuoso para reducir al mínimo la energía interfacial. El sistema se orienta con las regiones hidrófilas hacia el medio polar exterior (generalmente medio acuoso) y los segmentos hidrófobos se agregan en el núcleo interno, dando como resultado un núcleo hidrófobo y una envoltura hidrófila. Generalmente, la envoltura hidrófila sirve como barrera protectora estérica frente a la acción de proteínas y puede modificarse para evitar el reconocimiento y opsonización por el sistema fagocítico mononuclear, lo que redundaría en mayor tiempo de circulación del sistema en el organismo. El núcleo hidrófobo permite cargar moléculas por interacciones hidrófobas o electrostáticas y determina la eficiencia de carga y la liberación de dichas moléculas.^{1, 11, 12}

Entre las técnicas usadas para la formación de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros preformados se encuentran las siguientes:¹³ emulsión evaporación del solvente,¹⁴ salting-out,¹⁵ nanoprecipitación,¹⁶ diálisis,¹⁷ tecnología de fluidos supercríticos (expansión rápida de soluciones supercríticas en un solvente líquido)¹⁸ y autoclavado.¹⁹ En el caso de la polimerización de monómeros, los métodos más utilizados son polimerización por emulsión convencional,²⁰ polimerización por emulsión sin tensioactivos,²¹ mini-emulsión,²² micro-emulsión²³ y polimerización interfacial.²⁴

La técnica de formación de NHs autoensamblados mediante el uso del autoclave ha sido patentada recientemente por De Rugeriis y col.²⁵ como un método simple y económico de preparar NHs estériles de dimensiones homogéneas. Mediante dicha técnica se pueden autoensamblar polisacáridos anfífilicos que, al ser sometidos a altas presiones y temperaturas, son capaces de orientar sus cadenas para formar

NHs con un núcleo hidrófobo y una envoltura hidrófila, pudiendo cargar distintos tipos de fármacos simultáneamente a su formación. Esta técnica supone ciertas ventajas respecto a las anteriormente mencionadas ya que es económica, rápida, simple, reproducible, no requiere solventes orgánicos ni tóxicos, ni altas velocidades de agitación y produce nanopartículas de dimensiones homogéneas. Asimismo, la esterilización de la formulación simultánea a su formación ofrece ventajas frente a los métodos convencionales de esterilización como la filtración, irradiación o el uso de gases, ya que evita los problemas derivados de la obstrucción de filtros, destrucción de la estructura por efectos mecánicos, degradación de agentes terapéuticos y de polímeros, eliminación de gases residuales, etc.

Como se ha comentado anteriormente, el uso de polisacáridos es especialmente interesante para las aplicaciones biomédicas por su biocompatibilidad, biodegradabilidad, abundancia en la naturaleza, bajo coste y estabilidad. La modificación de polisacáridos con moléculas hidrófobas es una técnica de gran interés para la obtención de NHs por autoensamblaje. El uso del colesterol como molécula hidrófoba ha sido ampliamente estudiado para modificar diversos polisacáridos, como el pululano,^{26, 27} goma gelano,¹⁹ manano²⁸ y ácido hialurónico (HA),²⁹⁻³² entre otros. También se han modificado estos polímeros con otras moléculas hidrófobas como el ácido cólico,^{33, 34} el ácido desoxicólico,^{33, 35, 36} grupos acetilo,³⁷ fármacos hidrófobos (como la prednisolona),³⁸ etc. Recientemente, Matricardi y col.³⁹ patentaron la modificación hidrofóbica de polisacáridos mediante riboflavina (vitamina B2) o derivados. La modificación del HA y el pululano (polisacáridos aniónico y neutro, respectivamente) con un derivado de esta molécula fluorescente, tetrabutirilriboflavina, permitió la obtención de polímeros anfífilicos que se autoensamblan para formar NHs citocompatibles, fluorescentes, con un bajo índice de polidispersión (PDI) y estables por un largo periodo de tiempo en agua y soluciones salinas.⁴⁰

Entre los polisacáridos, el HA presenta muchas ventajas en las aplicaciones biomédicas y, en concreto, en sistemas de liberación debido a sus propiedades físico-químicas, biodegradabilidad, biocompatibilidad, baja toxicidad y facilidad de modificación por su reactividad y solubilidad en agua y solventes orgánicos (usando ciertas sales de HA). Además, su capacidad para unirse a receptores CD44 permite alcanzar activamente ciertos tumores y/o introducirse en el interior de las células.

Esta propiedad representa una estrategia muy útil para la administración de fármacos que no son capaces de atravesar por sí solos la membrana celular.²⁹

Uno de los principales problemas del HA es su rápida eliminación de la circulación sistémica debido al reconocimiento de éste por los receptores de hialurónico de los órganos del sistema retículo-endotelial, como el hígado y el bazo, y su posterior degradación por hialuronidasas.^{41, 42} Una estrategia para reducir su captación, degradación y prolongar el tiempo de circulación es modificar químicamente el polímero o entrecruzar sus cadenas para formar NHs. Las restricciones aplicadas a las cadenas de HA individuales por su reticulación se cree que pueden alterar las propiedades farmacocinéticas de HA y prolongar el tiempo de circulación. De hecho, se ha demostrado que las nanopartículas de HA pueden acumularse eficientemente en tumores durante al menos 2 días, mientras que HA sin modificar se elimina rápidamente del cuerpo tras la inyección.⁴³ No obstante, la acumulación de las nanopartículas en el hígado continúa siendo uno de los principales problemas. Una técnica muy usada es la pegilación (unión de PEG a la superficie) que evita el reconocimiento del HA por el sistema retículo-endotelial⁴⁴ y disminuye la captación en hígado. Sin embargo, la pegilación puede afectar a la afinidad por los receptores CD44 reduciendo su captación por células tumorales, por lo que es necesario controlar el peso molecular del PEG y el grado de funcionalización para aumentar el tiempo de circulación y reducir la captación en hígado, sin afectar a la capacidad de internalización en células tumorales.

Los NHs pueden cargar distintos tipos de fármacos y macromoléculas pudiendo vehicular agentes terapéuticos en multitud de patologías. El piroxicam es un antiinflamatorio no esteroideo con efecto analgésico, antiinflamatorio y antipirético. Se usa principalmente en el tratamiento de la artritis reumatoide y la osteoartritis, aunque numerosos estudios en animales ponen de manifiesto la reducción de la incidencia y tamaño tumoral de tumores inducidos en colon,⁴⁵⁻⁴⁷ hígado,⁴⁸ vejiga urinaria,⁴⁹ lengua⁵⁰ y pulmón.⁵¹ El metabolismo de este fármaco se produce principalmente en el hígado, que genera metabolitos sin actividad; además, el piroxicam sufre recirculación enterohepática⁵² por lo que puede causar lesiones intestinales. Como otros fármacos antiinflamatorios, se une extensamente a la albúmina sérica humana; de hecho, el 99% del piroxicam circulante se encuentra unido a proteínas plasmáticas.^{53, 54} Una de las limitaciones de su uso como preventivo de cáncer son sus efectos tóxicos (gastrointestinales, presión arterial y

erupción cutánea), por lo que es necesario diseñar nuevos métodos de administración que mitiguen dichos efectos y mantengan su actividad quimiopreventiva;⁵⁵ por ejemplo, una alternativa podría ser liberar el fármaco directamente en el interior de las células.

En este trabajo se ha estudiado la formación de NHs autoensamblados a partir de hialuronato modificado hidrofóbicamente y se ha valorado su potencial como sistemas de administración de fármacos por vía intravenosa.

II. OBJETIVOS / OBJECTIVES

Objetivos

El objetivo de este trabajo de investigación es obtener nanohidrogeles autoensamblados a partir de hialuronato modificado hidrofóbicamente con riboflavina con características adecuadas para actuar como sistema de liberación de fármacos por vía intravenosa.

El trabajo realizado obedece a la siguiente secuencia:

- Estudiar el procedimiento de obtención NHs y realizar el marcaje fluorescente de los NHs y el polímero HA.
- Determinar la concentración de agregación crítica.
- Optimizar el método de cargado de piroxicam en los NHs.
- Evaluar la estabilidad a 4°C de los NHs liofilizados tras su resuspensión.

- Ajustar el pH y la osmolaridad de las formulaciones para la administración intravenosa.
- Determinar la biodistribución relativa por órganos de los NHs y el HA.
- Estudiar los perfiles farmacocinéticos del piroxicam administrado por vía intravenosa en solución y en el interior de los NHs.

Parte de este trabajo de investigación se ha desarrollado en el Departamento de Química y Tecnología del Fármaco de la Universidad La Sapienza, en Roma, donde se elaboraron los NHs: se estudió el método de cargado de fármaco y marcaje fluorescente, se evaluó su estabilidad y se optimizaron el pH y la osmolaridad de los preparados. Los posteriores estudios *in vivo* para determinar la biodistribución de los NHs y la farmacocinética del piroxicam se llevaron a cabo en España.

Objectives

The objective of this research work is to obtain self-assembled nanohydrogels based on hyaluronan hydrophobically modified with riboflavin with suitable characteristics to act as intravenous drug delivery system.

The work carried out follows this sequence:

- To study the process for obtaining NHs and to perform the fluorescent labeling of HA and NHs.
- To determine the critical aggregation concentration.
- To optimize the method of piroxicam loading into NHs.
- To evaluate the stability at 4°C of lyophilized NHs after resuspension.
- To adjust the pH and osmolarity of the formulations for intravenous administration.
- To determine the relative biodistribution in organs of HA and NHs.
- To study the pharmacokinetic profiles of piroxicam administered intravenously in solution and within the NHs.

Part of this research work was developed at the Department of Chemistry and Pharmaceutical Technology, Sapienza University of Rome. There, NHs were elaborated, the method of drug loading and fluorescent labeling was studied, NHs

stability was evaluated and pH and osmolarity of the preparations were optimized. Further *in vivo* studies to determine the biodistribution of NHs and the pharmacokinetics of piroxicam were carried out in Spain.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

A continuación se detallan los materiales y reactivos empleados en este trabajo: piroxicam, *N*-metil-pirrolidona (NMP), dextrosa monohidrato y rodamina B isotiocianato se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Agua destilada y bidestilada, NaCl, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, tubos de diálisis (12.000 a 14.000 Da), 2'3'4'5'-tetrabutiril-3-(6-bromohexil)riboflavina, glicerol, sal de hialuronato de tetrabutilamonio (HA-TBA, PM=200 KDa) (Fidia Advanced Biopolymers, Abano Terme (PD), Italia), diazepam (Valium; Roche, España), ketamina (Ketolar; Parke-Davis, España), atropina (sulfato de atropina; Braun, España), heparina (Heparina Leo 5%, BYK ELMU, España), tubos de silicona de grado médico (Silastic, Dow Corning Co.; diámetro interno 0.5 mm, diámetro exterior 0.94 mm).

2. Síntesis del derivado hialuronato-riboflavina

Como paso previo a la derivatización del HA con riboflavina (HA-Rfv) se realizó la síntesis de 2'3'4'5'-tetrabutiril-3-(6-bromohexil)riboflavina (Br-Rfv) a partir de 2'3'4'5'-tetrabutirilriboflavina y 1,6-dibromohexano, según el procedimiento descrito por Di Meo y col.⁴⁰

La reacción de derivatización del HA con Br-Rfv se realizó mediante la disolución de 100 mg de sal de hialuronato de tetrabutilamonio (HA-TBA) en 10 ml de NMP, seguido de la adición de 39.7 mg de Rfv-Br solubilizado previamente en 1 ml de NMP, con el fin de obtener un grado de derivatización de 30% mol/mol (mol de riboflavina por mol de unidades repetitivas de HA). La reacción se dejó bajo agitación magnética vigorosa durante 48 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Pasado este tiempo, la mezcla se diluyó con agua, se transfirió a un tubo de diálisis (12.000 a 14.000 Da) y se sometió a diálisis en agua destilada hasta obtener una conductividad inferior a 1.5 μ S. Finalmente, la solución final se congeló en nitrógeno líquido y se liofilizó. El rendimiento fue aproximadamente del 90%.

3. Formación de los NHs

Para la formación de los NHs, se preparó una dispersión de polímero (HA-Rfv) en agua destilada mediante agitación magnética a temperatura ambiente durante una noche. La suspensión resultante se trató en autoclave a 121°C y 1.10 bar durante 20 minutos (Autoclave Juno Liarre, 230 VAC, 50/60 Hz, 12 A, 2000 W), formándose así los NHs. Se estudiaron las dimensiones de las partículas y su PDI mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS).

4. Marcaje del polímero y los NHs con rodamina

Para la realización de los ensayos de biodistribución *in vivo* fue necesaria la obtención de muestras de NHs y HA marcadas con una molécula fluorescente; el marcador empleado fue rodamina isotiocianato.

Para el marcaje del polímero (HA-rho), se disolvieron 160 mg de HA-TBA en 64 ml de DMSO y se añadieron 1.2 ml de solución de rodamina isotiocianato previamente disuelta en DMSO (9 mg/ml). La reacción se dejó bajo agitación magnética vigorosa durante 5 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Pasado este tiempo, se transfirió a un tubo de diálisis (12.000 a 14.000 Da) y se sometió a

diálisis en agua destilada durante 3 días. Finalmente, la solución final se congeló en nitrógeno líquido y se liofilizó.

Para la obtención de los NHs marcados (NHs-rho), en primer lugar se prepararon 160 mg de NHs de HA-Rfv en 107 ml (1.5 mg/ml), según la técnica descrita. Tras comprobar las dimensiones de las nanopartículas, se añadieron 1.3 ml de solución de rodamina isotiocianato previamente disuelta en DMSO (9 mg/ml). La reacción se dejó bajo agitación magnética vigorosa durante 5 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Pasado este tiempo, se transfirió a un tubo de diálisis (12.000 a 14.000 Da) y se sometió a diálisis en agua destilada durante 2 días. Finalmente, se adicionó el crioprotector y los NHs se liofilizaron (este procedimiento se describe con mayor detalle en el apartado 8 “Conservación de los NHs: liofilización”). La comprobación del marcaje se realizó por microscopía de fluorescencia.

5. Caracterizaciones

5.1. Dispersión dinámica de la luz

La técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS, *Dynamic Light Scattering*) permite determinar el rango del tamaño de partículas que se encuentran en suspensión. Mediante esta técnica, usando el aparato Submicron ParticleSizer Autodilute Model 370 (Nicomp), se estudió la intensidad de dispersión de la luz y las dimensiones de las partículas de las muestras.

El instrumento da información sobre el tipo de distribución de las dimensiones de las partículas: distribución gaussiana (una población) o nicomp (varias poblaciones o una población que no se ajusta a un modelo normal), las dimensiones medias, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Con estos valores es posible calcular el índice de polidispersión (PDI) según la ecuación 4.III.1:

$$PDI = CV^2 = \left(\frac{DE}{D}\right)^2 \quad (4.III.1)$$

siendo CV el coeficiente de variación, DE la desviación estándar y D las dimensiones medias de los NHs.

Valores de PDI cercanos a 0 implican que se trata de un sistema monodisperso, cuanto mayor sea el valor de PDI indica que la muestra tiene mayor dispersión de

tamaños de partícula. Puede considerarse una amplia polidispersión cuando $PDI > 0.4$, aunque no existe un límite definido.⁵⁶

5.2. Microscopía de fluorescencia

El marcaje de los NHs se comprobó visualmente analizando las muestras resuspendidas en agua mediante un microscopio confocal de barrido láser (Inverted Microscope Eclipse Ti-E, Nikon Instruments, Japón) con un objetivo de 60x de inmersión en aceite.

6. Determinación de la concentración de agregación crítica

La concentración de agregación crítica (CAC) se puede definir como la concentración mínima de polímero a partir de la cual se forman NHs por agregación de las cadenas poliméricas.

Se prepararon una serie de dispersiones de polímero con un rango de concentraciones de 0.01 a 2 mg/ml, se sometieron a agitación magnética durante una noche a temperatura ambiente y se trataron en autoclave (121°C, 1.10 bar, 20 minutos). Las muestras resultantes se estudiaron mediante DLS para determinar los valores de intensidad de dispersión y las dimensiones de los NHs formados.

Mediante una hoja de cálculo de Excel se representaron estos valores. Los valores de intensidad de dispersión se dividieron en dos partes bien definidas debido al cambio de pendiente que presentaban, para cada una de las cuales se calculó la ecuación de la recta de la línea de tendencia. El valor de la intersección entre ambas rectas representa el valor de la CAC.

7. Optimización del cargado del fármaco en los NHs

Para optimizar el método de cargado del piroxicam en los NHs se evaluaron distintos parámetros en función de la concentración del polímero y la cantidad de fármaco añadida.

7.1. Procedimiento

El procedimiento de cargado del fármaco en el interior de los NHs es simultáneo a la formación de los mismos. Para optimizar el método de cargado se prepararon formulaciones (A-D) de distinta concentración de polímero y cantidad de fármaco.

Para ello, se prepararon dispersiones de polímero HA-Rfv en 3 ml de agua destilada a 1 y 1.5 mg/ml y se dejaron agitando una noche a temperatura ambiente. Paralelamente, se prepararon varios viales con distinto volumen de una solución stock de piroxicam en acetona (2 mg/ml), se dejaron evaporar durante una noche para permitir la formación de una película de fármaco en la parte inferior del recipiente. Las concentraciones de polímero y la cantidad de fármaco añadido inicialmente en relación al peso de polímero seco se resumen en la tabla 4.III.1.

Test	C. polímero (mg/ml)	Piroxicam : Polímero (mg : mg)
A	1	1 : 1.5
B	1	1 : 2
C	1.5	1 : 3
D	1.5	1 : 2.25

Tabla 4.III.1. Variables estudiadas en la optimización del cargado del fármaco: concentración de polímero y cantidad de fármaco añadido en relación al peso de polímero

Una vez obtenida la película de piroxicam y la dispersión completa del polímero en agua, éste último se añadió al vial que contenía el fármaco y se dejó en agitación, una hora aproximadamente, hasta que el fármaco se despegó de las paredes del vial y se incorporó a la dispersión de polímero. A continuación, las muestras se sometieron a un ciclo de autoclavado (121°C, 1.10 bar, 20 minutos) para permitir la formación de NHs y la carga de fármaco hidrófobo en su interior. Tras la finalización del autoclavado, las muestras se dejaron enfriar, se transfirieron a tubos de centrífuga y se centrifugaron a 3000 rpm y 20°C durante 10 minutos para precipitar el fármaco que no se hubiera incorporado en el interior de los NHs (ultracentrífuga Sorvall WX ULTRA 80 Thermo).

El sobrenadante, que contiene los NHs cargados con fármaco, se analizó mediante DLS para determinar las dimensiones de las partículas. El piroxicam precipitado por centrifugación y el remanente en el vial de autoclavado se resuspendió en un volumen conocido de etanol puro y se cuantificó mediante HPLC. La diferencia entre el fármaco inicial y el fármaco no cargado permitió obtener el porcentaje de fármaco cargado en el sistema, ecuación 4.III.2.

$$\% \text{ cargado} = \frac{m_c}{m_0} \cdot 100 \quad (4.III.2)$$

donde m_c es la cantidad de fármaco cargado y m_0 es la cantidad de fármaco añadido inicialmente.

La eficiencia de encapsulación (% EE) se determinó mediante la ecuación 4.III.3:

$$\% EE = \frac{m_c}{m_p} \cdot 100 \quad (4.III.3)$$

donde m_c es la cantidad de fármaco cargado y m_p el peso del polímero seco.

7.2. Cuantificación en cromatografía líquida de alta resolución

La cuantificación del piroxicam cargado en los NHs se realizó por HPLC con detección por ultravioleta. Se utilizó un Sistema Varian, modelo 210, equipado con un detector Varian ProStar 325 UV-Vis y una columna Knauer C18, 250 x 4.6 mm (Eurospher II. 100-5 C18). Se trabajó con un método isocrático a velocidad de flujo 1 ml/min. La fase móvil fue una mezcla en proporción volumétrica 50:50 de solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0.1% y acetonitrilo; el volumen de inyección fue 20 μ l. La detección se realizó con una longitud de onda de 356 nm. En estas condiciones el tiempo de retención del compuesto ensayado fue de 7 minutos.

La recta de calibrado utilizada para la interpolación se preparó con un rango de concentraciones de 15.63 μ g/ml a 0.25 mg/ml en etanol ($r^2= 0.9994$).

8. Conservación de los NHs: liofilización

La conservación de los NHs se realizó mediante liofilización. Para ello, se adicionó a la suspensión de NHs un volumen determinado de solución de dextrosa al 20% (p/v) en agua para obtener una concentración del 1% (p/v) de crioprotector. La muestra se dejó en la agitación magnética lenta durante una noche a 4°C. A continuación, se comprobaron las dimensiones de los NHs mediante DLS, se congelaron en nitrógeno líquido y se liofilizaron.

El producto liofilizado se resuspendió en un volumen de agua adecuado para conseguir la concentración de NHs inicial, utilizando el vórtex. Las suspensiones se analizaron mediante DLS para comprobar las dimensiones y el PDI. Este análisis se

realizó periódicamente durante una semana para estudiar la estabilidad de las muestras conservadas a 4°C.

9. Ajuste de osmolaridad y pH

Para permitir su administración intravenosa, la osmolaridad y el pH de las formulaciones se ajustaron a 290 ± 10 mOsm/l y a $\text{pH } 7.40 \pm 0.05$. Para corregir la osmolaridad de los NHs resuspendidos en agua tras la liofilización, se realizaron pruebas con dos compuestos: NaCl y glicerol. La osmolaridad de las preparaciones se midió mediante un osmómetro Knauer K-7400. La corrección del pH se consiguió añadiendo el volumen necesario de tampón fosfato 0.1 M a pH 7.4, cuya composición se muestra a continuación:

NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O.....	0.30 mg
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O.....	2.17 mg
H ₂ O destilada.....	c.s.p. 100 ml

Para comprobar si la adición de los compuestos modifica las dimensiones de los NHs, las muestras se valoraron mediante DLS a la media hora de dicha adición. Asimismo, se estudió la estabilidad en glicerol y tampón fosfato de los NHs conservados a 4°C midiendo periódicamente sus dimensiones mediante DLS durante una semana.

10. Ensayo de biodistribución

En este ensayo se estudió la biodistribución del HA y de los NHs de HA-Rfv en ratas mediante la evaluación de la emisión de fluorescencia de la rodamina en varios órganos vitales tras su administración intravenosa.

Se preparó una solución de polímero marcado con rodamina (HA-rho) 3 mg/ml en agua y una suspensión de NHs marcados con rodamina (NHs-rho) con una concentración equivalente a 4.5 mg/ml de NHs en agua. La osmolaridad y el pH de ambas preparaciones se ajustaron a los valores adecuados para administración intravenosa (290 mOsm/l, pH 7.4) mediante la adición de glicerol y tampón fosfato.

El experimento se realizó según el protocolo aprobado por el Comité de Ética (UMH-DI-MBS-02-15). Los animales empleados fueron ratas Wistar macho de 290-320 gramos de peso. Los animales se dividieron en 9 grupos (n = 4) en función de la

formulación administrada y el momento del sacrificio; esta distribución muestral se describe en la tabla 4.III.2. El noveno grupo corresponde a animales sin tratamiento cuyos órganos se estudiaron como línea base de fluorescencia (control).

Formulación	Tiempo de sacrificio (h)
HA-rho	5
	10
	24
	48
NHs-rho	5
	10
	24
	48
control	-

Tabla 4.III.2. Distribución muestral en función de las formulaciones evaluadas y tiempos de sacrificio

Para facilitar la administración, las ratas se inmovilizaron mediante un dispositivo limitador de movimiento (restrainer) y se administró 1 ml de la formulación ensayada mediante inyección intravenosa en la vena lateral de la cola; a continuación, se devolvieron a sus jaulas con comida y agua *ad libitum*. A los tiempos prefijados de sacrificio, los animales se sacrificaron mediante inhalación de CO₂ e inmediatamente después se abrió la cavidad torácica y la parte superior de la abdominal para proceder a la exanguinación. En primer lugar, se tomó una muestra de sangre del corazón; a continuación, se introdujo en el ventrículo izquierdo una aguja conectada a una bolsa de suero salino situada en alto y se realizó un corte en la orejuela de la aurícula derecha, permitiendo el drenaje de todos los órganos y la exanguinación. Una vez finalizado dicho proceso, se extrajeron los siguientes órganos: bazo, cerebro, corazón, hígado, pulmones y riñones. La sangre se centrifugó a 8000 rpm 10 minutos y se tomó el sobrenadante (plasma); los órganos se pesaron y se homogeneizaron. Las muestras se congelaron a -20°C para su posterior análisis.

Para el análisis, el plasma y los homogeneizados de órganos se descongelaron, se colocaron 0.5 g de las muestras en placas de pocillos y se tomaron imágenes de fluorescencia mediante el instrumento InVivo FX Pro (Carestream). La rodamina se

detectó con una longitud de onda de excitación de 530 nm y de emisión de 600 nm, ajustando los parámetros del software a 40 seg., 120 FOV, 5 mm de plano focal. Para eliminar la señal base de fluorescencia de los órganos y plasma, se estudió también la fluorescencia del control (ratas sin tratar). La intensidad de la señal se analizó mediante el software ImageJ®. Para cada muestra, la fluorescencia registrada se corrigió en función de la línea base de fluorescencia de cada órgano o plasma de las ratas control y multiplicando por el peso de cada órgano o sangre total. Los resultados de distribución en hígado y plasma se evaluaron mediante la prueba estadística t-student para muestras independientes con un intervalo de confianza del 95%.

11. Ensayo de farmacocinética

Mediante este ensayo se evaluó la farmacocinética del piroxicam administrado en solución y en el interior de NHs. El experimento se realizó según el protocolo aprobado por el Comité de Ética (UMH-DI-MBS-02-15).

11.1. Protocolo del ensayo

Los animales empleados fueron ratas Wistar macho de 2-3 meses de edad y 300 ± 10 g de peso que se dividieron en dos grupos (n = 8) en función de la formulación administrada. El primer grupo recibió 1.25 ml de una solución de piroxicam 0.29 mg/ml en una mezcla de PBS y propilenglicol, 50:50. El segundo grupo recibió 1.25 ml de una suspensión de NHs cargados con piroxicam (2.9 mg/ml de NHs, equivalente a 0.29 mg/ml de piroxicam). Se ajustó la osmolaridad y el pH de la suspensión de NHs añadiendo glicerol y tampón de fosfato (290 mOsm/l, pH 7.4).

Antes del inicio de los experimentos, se prepararon las cánulas cortando tubos de silicona de grado médico en fragmentos de 12 cm de largo con un extremo en bisel y fijando un hilo de sutura a 3.5 cm de dicho extremo.

Para realizar la canulación de la vena yugular los animales se anestesiaron utilizando una mezcla de diazepam (1.67 mg/kg), ketamina (50 mg/kg) y atropina (1 mg/kg). Una vez anestesiados, los animales se colocaron en decúbito supino, se realizó una incisión en un lateral del cuello y el tejido circundante se desgarró (para evitar el sangrado derivado del corte del tejido) hasta llegar a la vena yugular. Dicha vena se aisló y se realizó un corte en bisel de 1 mm para permitir la introducción de

la cánula. Cuidadosamente se introdujo 3.4 cm de la cánula en la vena yugular en dirección hacia el corazón; el extremo libre de la cánula se dirigió por vía subcutánea hasta la base dorsal del cuello por donde se exteriorizó con la ayuda de un exteriorizador. Tras la comprobación del funcionamiento de la cánula, se llenó con suero salino heparinizado (20 UI/ml) y se cerró con un tapón de polietileno. La parte interior de la cánula implantada se fijó cosiéndola al músculo adyacente a la yugular; finalmente, la herida quirúrgica se suturó.

Los animales se devolvieron a sus jaulas para su recuperación post-quirúrgica, con comida y agua *ad libitum*. A las 24 horas, se retiraron los tapones de las cánulas y éstas se conectaron a un tubo de silicona de unos 15 cm de largo a través de un puente metálico, para facilitar la administración y el muestreo sin estresar al animal. A continuación, se administraron las formulaciones anteriormente mencionadas (tiempo 0) y durante 30 horas se realizó la toma de muestras a los tiempos prefijados mediante jeringas heparinizadas. El volumen extraído se repuso con suero salino heparinizado (10 UI/ml); las muestras de sangre se recogieron en tubos eppendorf heparinizados y se centrifugaron 10 minutos a 8000 rpm para separar el plasma. A continuación, se añadió metanol frío a las muestras, en proporción 2:1 (metanol:plasma), se agitaron durante 15 minutos para precipitar las proteínas plasmáticas y facilitar la extracción del piroxicam de los NHs y se centrifugaron 15 minutos a 15000 rpm. Finalmente, las muestras se congelaron a -20°C hasta su posterior cuantificación por cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas (LC-MS).

11.2. Cuantificación en cromatografía líquida - espectrometría de masas

La cuantificación del piroxicam en las muestras del ensayo de farmacocinética se realizó en un espectrómetro de masas Acquity TQD (Waters) equipado con una fuente de ionización electrospray Z-spray. La columna usada para la separación del piroxicam fue una Acquity UPLC BEH C18 (2.1 x 50 mm, 1.7 µm) (Waters, Milford, MA, USA). La fase móvil utilizada fue ácido fórmico al 0.1% en agua desionizada como solvente A y acetonitrilo como solvente B, con flujo 0.4 ml/min. El volumen de inyección fue 5 µl; el gradiente de elución se detalla en la tabla 4.III.3.

Tiempo (min)	A% (Ácido fórmico 0.1%)	B% (ACN)
0	95	5
0.5	95	5
1.2	5	95
3.5	5	95
3.6	95	5
8	95	5

Tabla 4.III.3. Gradiente de elución para el análisis de piroxicam mediante LC-MS

Parámetros del electrospray: voltaje capilar: 3.5 KV, skimmer: 5 V, lente RF: 0.3 V, temperatura de la fuente: 120°C, temperatura de desolvatación: 350°C. Parámetros MS1: resolución LM (low mass): 13, resolución HM (high mass): 13, energía ion: 1. Parámetros MS2: resolución LM: 13, resolución HM: 13, energía ión: 1, multiplicador: 650 V. El espectro se adquirió en modo monitoreo de reacciones múltiples (MRM) con ionización positiva con un tiempo intercanal de 0.07 s.

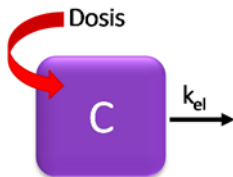
Precursor (m/z) (M+H)	Hijo (m/z)	Voltaje de cono (V)	Energía de colisión (eV)
332.58	95.02	40	15
332.58	121.11	40	15

Tabla 4.III.4. Parámetros para la determinación del piroxicam por LC-MS

11.3. Tratamiento matemático de los datos

Los valores de concentración plasmática frente al tiempo obtenidos a partir de la administración del fármaco en solución se ajustaron a los modelos farmacocinéticos monocompartimental y bicompartimental para determinar cuál explica mejor los perfiles obtenidos. Las ecuaciones para el análisis farmacocinético son las siguientes (ecuaciones 4.III.4 y 4.III.5):

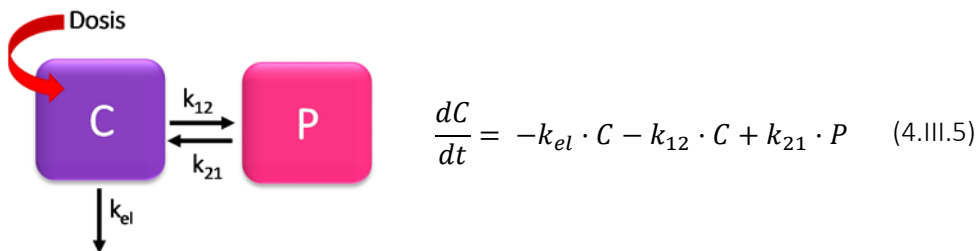
- Modelo monocompartimental:



$$\frac{dC}{dt} = -k_{el} \cdot C \quad (4.III.4)$$

donde C es la concentración del fármaco y k_{el} es la constante de eliminación.

- Modelo bicompartimental:



donde C es la concentración remanente de fármaco en el compartimento central, P es la concentración remanente en el compartimento periférico, k_{el} es la constante de eliminación, k_{12} y k_{21} son las constantes de distribución entre el compartimento central y el periférico.

Para seleccionar el modelo que mejor se ajusta a los datos, se compararon las sumas de cuadrados residuales (SSR), los coeficientes de correlación (r) y el Criterio de Información de Akaike (AIC). Una vez seleccionado el modelo, se calcularon los parámetros farmacocinéticos del piroxicam administrado en solución y administrado en el interior de los NHs para determinar los cambios en dichos parámetros atribuibles a la formulación. Mediante la prueba estadística t-student para muestras independientes se estudió la diferencia entre los parámetros obtenidos para ambas formulaciones.

Los valores de área bajo la curva (AUC) de ambas formulaciones se calcularon por métodos no compartimentales.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Síntesis del derivado HA-Rfv y formación de los NHs

Mediante la reacción del HA-TBA con el derivado Br-Rfv se une covalentemente un fragmento hidrófobo al polímero, obteniendo un polímero anfifílico capaz de autoensamblarse bajo ciertas condiciones formando NHs. Para la síntesis se ha usado el derivado Br-Rfv debido a la baja solubilidad de la riboflavina;⁴⁰ asimismo, se ha usado la sal HA-TBA debido a que ésta es soluble en solventes orgánicos, a diferencia del HA. El derivado Br-Rfv reacciona con los grupos carboxilo del polímero formando un enlace éster; el esquema de la reacción se muestra en la figura 4.IV.1.

El tratamiento en autoclave de la suspensión polimérica permite formar NHs espontáneamente por autoensamblaje debido a que las condiciones de alta presión y temperatura promueven las interacciones entre los grupos hidrofóbicos de las cadenas de polímero (interacciones intra e intermoleculares).

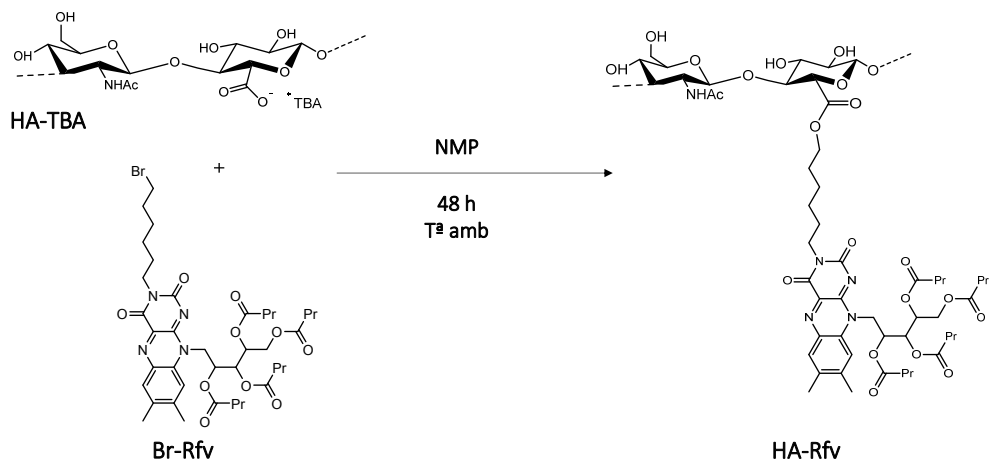


Figura 4.IV.1. Esquema de la reacción de síntesis de HA-Rfv

2. Marcaje fluorescente del polímero y los NHs

Para los ensayos de biodistribución en animales ha sido necesario marcar los NHs y el HA con una molécula fluorescente que permitiera su posterior cuantificación. La reacción entre el grupo funcional isotiocianato de la rodamina y el hidroxilo primario del hialuronato forma un enlace tiocarbamato,⁵⁷ según se muestra en las figuras 4.IV.2 y 4.IV.3.

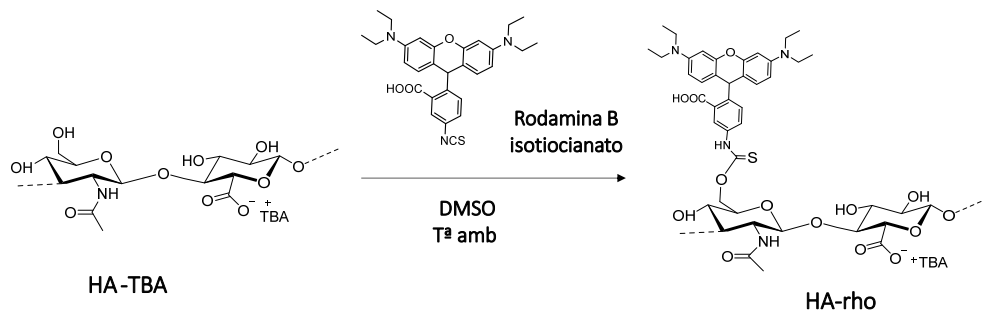


Figura 4.IV.2. Esquema de reacción del HA-TBA con la rodamina

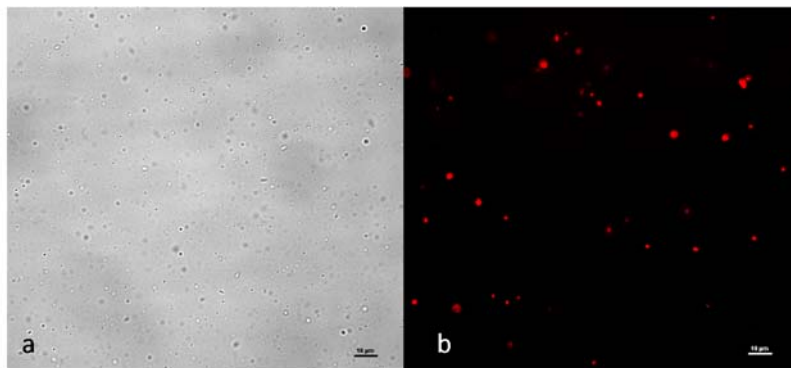


Figura 4.IV.5. Imagen de microscopía a) óptica y b) de fluorescencia de los NHs marcados con rodamina

Estas figuras indican que los NHs han incorporado la molécula fluorescente, lo que permitirá su seguimiento en el organismo vivo.

3. Determinación de la concentración de agregación crítica

El concepto de CAC de un polímero, análogo al de concentración micelar crítica en las micelas, expresa el valor de concentración mínima de polímero a partir del cual se forman los NHs. Los resultados de DLS de las distintas dispersiones poliméricas sometidas a autoclave se muestran en la tabla 4.IV.1.

C (mg/ml)	Dimensiones (nm)	Intensidad (Kcps)
0.01	281	50
0.03	296	75
0.05	287	80
0.1	220	100
0.25	208	720
0.5	204	1180
1	206	2440
2	171	3260

Tabla 4.IV.1. Dimensiones y valores de intensidad de dispersión de la luz de las nanopartículas en función de la concentración de polímero HA-Rfv

Como se observa en la figura 4.IV.6, a partir de 0.25 mg/ml la intensidad de dispersión aumenta exponencialmente, lo que demuestra que los NHs empiezan a formarse en torno a esa concentración mínima. Además, se evidencia que las dimensiones de estos NHs se mantienen prácticamente estables, unos 200 nm,

independientemente de la concentración de polímero a partir de ese valor de concentración. El valor de CAC, calculado como la concentración de HA-Rfv situada en el punto de intersección entre las dos regiones linearizadas, es de 234 $\mu\text{g/ml}$.

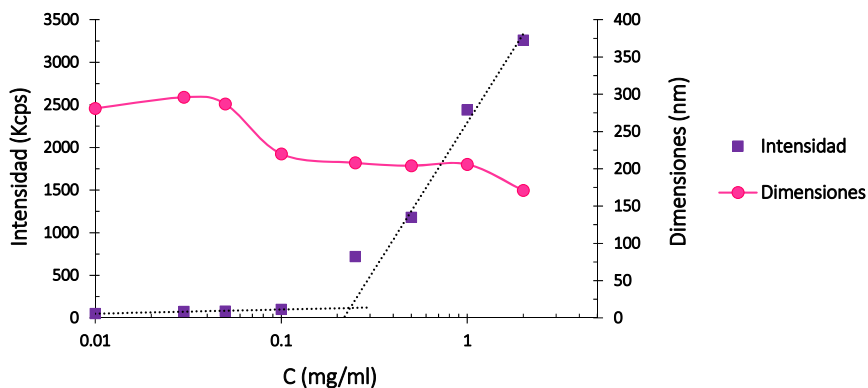


Figura 4.IV.6. Intensidad de dispersión de la luz y dimensiones de las nanopartículas en función de la concentración de polímero HA-Rfv

4. Optimización del cargado del fármaco

Para optimizar el método de cargado del piroxicam en los NHs se han evaluado distintos parámetros en función de la concentración del polímero (1-1.5 mg/ml) y la cantidad de fármaco añadido antes del proceso de autoclavado (de 1:1.5 a 1:3), expresado como relación entre la cantidad de piroxicam añadido y el peso del polímero seco; los resultados se muestran en la tabla 4.IV.2.

Test	C. polímero (mg/ml)	Piroxicam : Polímero (mg : mg)	C. piroxicam cargado (mg/ml)	% piroxicam cargado	% EE (mg piroxicam/mg polímero)
A	1	1 : 1.5	0.32 ± 0.09	48.40 ± 13.00	32.27 ± 8.67
B	1	1 : 2	0.22 ± 0.05	44.39 ± 10.34	22.19 ± 5.50
C	1.5	1 : 3	0.14 ± 0.03	28.02 ± 7.45	9.34 ± 2.24
D	1.5	1 : 2.25	0.48 ± 0.03	72.30 ± 4.28	32.13 ± 1.90
D*	1.5	1 : 2.25	0.32 ± 0.04	48.64 ± 5.82	21.73 ± 2.66

Tabla 4.IV.2. Concentración de fármaco cargado en la suspensión, porcentaje de fármaco cargado (respecto del fármaco añadido) y eficiencia de encapsulación, en función de la concentración inicial de polímero y la cantidad de piroxicam añadido

La concentración de fármaco encapsulado presente en las muestras, así como el porcentaje de fármaco cargado frente al total de fármaco añadido pone de manifiesto que la formulación que consigue mayor concentración de fármaco en la muestra y mayor aprovechamiento del fármaco añadido es la formulación D. La eficiencia de encapsulación (cantidad de fármaco encapsulado por peso de polímero seco) es similar en la formulación A y D. Es por ello que se ha escogido la formulación D para continuar los estudios. Es preciso aclarar que las formulaciones A-D corresponden al primer lote de HA-Rfv estudiado; para estudios posteriores ha sido necesario sintetizar un nuevo lote de polímero HA-Rfv. Las pruebas de este nuevo lote con la formulación elegida, D*, proporcionaron concentraciones de fármaco, porcentajes de carga y eficiencia de encapsulación inferiores a los del primer lote. Esto es debido posiblemente a un grado de derivatización diferente del polímero, aunque es necesario realizar más estudios para determinar cómo influye el grado de derivatización del polímero en el porcentaje de carga de fármacos.

En la tabla 4.IV.3 y figura 4.IV.7 se muestran los valores de tamaño y PDI de cada una de las formulaciones descritas. Se observa que las dimensiones de los NHs se mantienen en un rango entre 197 y 230 nm en todos los casos y su índice de polidispersión es menor a 0.25, demostrando así la homogeneidad en la población de partículas entre las distintas formulaciones y la homogeneidad en la propia muestra.

Test	Dimensiones (nm)	PDI
A	197.04 ± 6.49	0.13 ± 0.04
B	230.00 ± 7.66	0.19 ± 0.03
C	215.60 ± 7.13	0.18 ± 0.03
D	206.53 ± 8.50	0.17 ± 0.00
D*	215.07 ± 6.92	0.22 ± 0.02

Tabla 4.IV.3. Valores de las dimensiones y PDI de los NHs en las distintas formulaciones

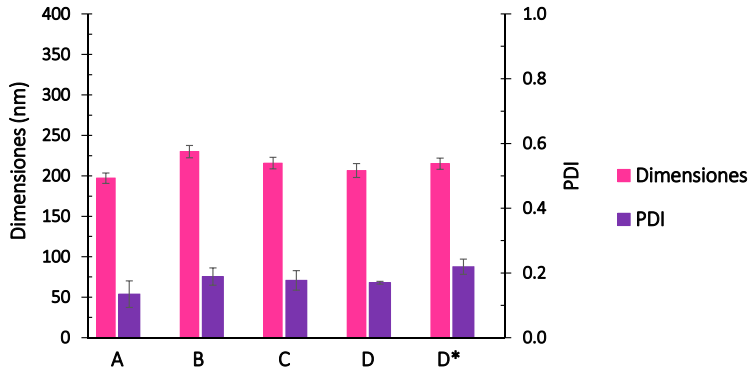


Figura 4.IV.7. Dimensiones y PDI de los NHs en las distintas formulaciones

5. Estabilidad frente a la liofilización

La liofilización de los NHs es necesaria para su conservación, ya que en suspensión acuosa están sujetos a inestabilidad físico-química por agregación, hidrólisis del material polimérico o liberación del fármaco cargado.

La eliminación del agua por liofilización somete los NHs a distintas tensiones, ya que durante la congelación se obtiene una separación de fases debida a la formación de una solución congelada y una solución crioconcentrada donde se encuentran los NHs y otros compuestos usados en la formulación. Esta concentración elevada de NHs puede inducir la agregación y, en algunos casos, la fusión irreversible de éstos; además, la cristalización del hielo puede provocar estrés mecánico en el sistema. Por estos motivos, se añade un crioprotector antes de la liofilización; la función de dicho crioprotector es la de inmovilizar los NHs formando una matriz compacta alrededor de éstos, la cual previene su agregación y la rotura por fuerzas mecánicas inducidas por la formación de cristales de hielo. El crioprotector usado en este caso ha sido dextrosa a una concentración final del 1% (p/v).

En la tabla 4.IV.4 y figura 4.IV.8 se muestran las dimensiones de los NHs antes de añadir el crioprotector, a las 15 horas de la adición del mismo y tras la resuspensión en agua posterior a la liofilización.

	Dimensiones (nm)	PDI
Sin dextrosa	193.66 ± 27.36	0.22 ± 0.04
Con dextrosa	214.95 ± 33.85	0.28 ± 0.06
Resuspensión (agua)	206.17 ± 12.87	0.24 ± 0.06

Tabla 4.IV.4. Dimensiones y PDI de los NHs tras su formación (sin dextrosa), a las 15 horas de añadir la dextrosa (C_{final} 1 % p/v) y tras la resuspensión en agua de los NHs liofilizados

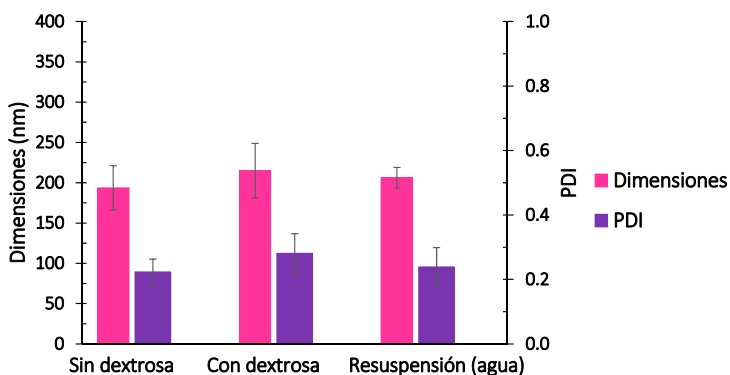


Figura 4.IV.8. Dimensiones y PDI de los NHs tras su formación (sin dextrosa), a las 15 horas de añadir la dextrosa (C_{final} 1 % p/v) y tras la resuspensión en agua de los NHs liofilizados

Se puede observar que no hubo ningún cambio significativo en el tamaño ni en el PDI, por lo que se concluye que liofilización en estas condiciones es un método adecuado de conservación de los NHs. Además, los NHs liofilizados y resuspendidos en agua han demostrado ser estables durante una semana mantenidos a 4°C (tabla 4.IV.5 y figura 4.IV.9).

Tiempo (días)	Dimensiones (nm)	PDI
0	206.17 ± 12.87	0.24 ± 0.06
1	206.58 ± 18.02	0.23 ± 0.08
2	205.67 ± 19.35	0.24 ± 0.06
3	206.73 ± 21.60	0.24 ± 0.06
4	198.88 ± 20.32	0.24 ± 0.06
5	212.30 ± 24.97	0.26 ± 0.03
6	206.95 ± 19.16	0.27 ± 0.03
7	200.01 ± 20.35	0.26 ± 0.03

Tabla 4.IV.5. Dimensiones y PDI de los NHs resuspendidos en agua mantenidos durante una semana a 4°C

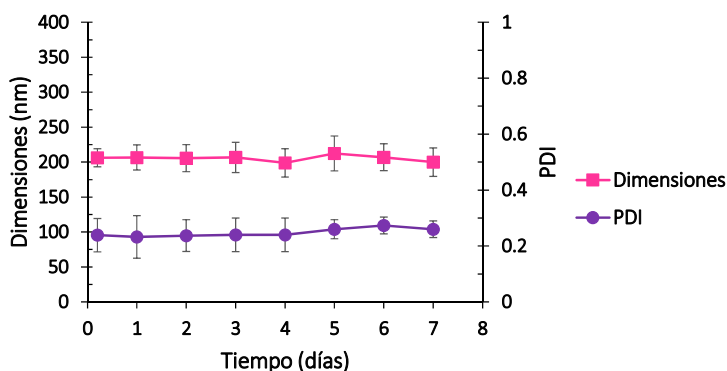


Figura 4.IV.9. Estabilidad de los NHs resuspendidos en agua mantenidos a 4°C

6. Adecuación de los NHs para su administración intravenosa

Para obtener unas condiciones adecuadas de osmolaridad y pH en las formulaciones para ser administradas por vía intravenosa, se ha estudiado el ajuste de dichos parámetros con NaCl y glicerol (ajuste de osmolaridad) y tampón fosfato a pH 7.4 (ajuste de pH) adicionados a los NHs resuspendidos en agua tras la liofilización.

Los valores óptimos de osmolaridad (290 ± 10 mOsm/l) se han logrado añadiendo una solución concentrada de NaCl para obtener una concentración final de 0.9% (p/v) o una solución concentrada de glicerol hasta alcanzar una concentración final de 2.28% (p/v).

La corrección del pH ($\text{pH } 7.40 \pm 0.05$) se ha conseguido añadiendo el volumen necesario de tampón fosfato 0.1 M a pH 7.4 para alcanzar una concentración 0.01 M en la muestra final.

La tabla 4.IV.6 y figura 4.IV.10 muestran las dimensiones y los valores de PDI promedio de los NHs media hora después de la adición de los compuestos. Se observa que tras la adición de NaCl existen en las distintas muestras tamaños de partícula diferentes y mayores a los habituales, probablemente por la agregación de los NHs. Este efecto puede ser debido a la neutralización parcial de las cargas negativas de los grupos carboxilo por los cationes Na^+ de forma que se reducen las repulsiones entre las cadenas de polímero y tienden a agregarse; por este motivo se eligió el glicerol para corregir la osmolaridad de las dispersiones.

	Dimensiones (nm)	PDI
Agua	203.74 ± 19.66	0.23 ± 0.06
NaCl (0.9%)	577.73 ± 489.19	0.28 ± 0.08
Glicerol (2.28%)	217.25 ± 20.61	0.22 ± 0.06
Fosfato pH 7.4 (0.01 M)	218.88 ± 8.79	0.22 ± 0.04

Tabla 4.IV.6. Dimensiones y PDI de los NHs tras 0.5 h de la resuspensión en agua o la adición de NaCl, glicerol 2.28% o fosfato pH 7.4 0.01 M

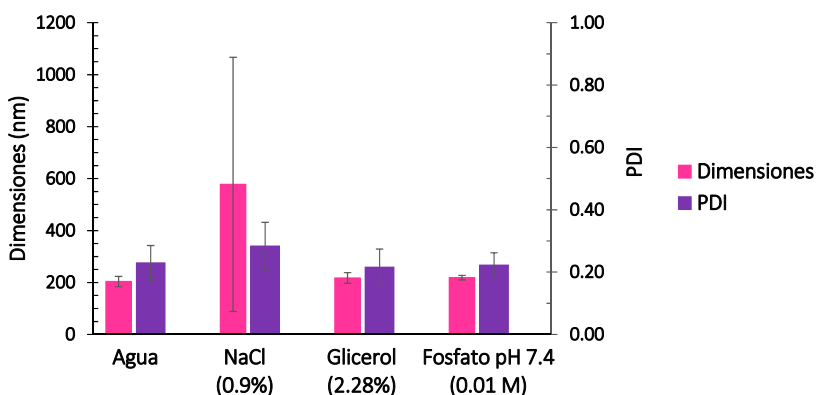


Figura 4.IV.10. Dimensiones y PDI de los NHs tras 0.5 h de la resuspensión en agua o la adición de NaCl, glicerol 2.28% o fosfato pH 7.4 0.01 M

Tras el ajuste de la osmolaridad con glicerol al 2.28% y el pH con tampón fosfato 0.01 M, las suspensiones de NHs han demostrado ser estables durante una semana conservadas a 4°C, como se muestra en la tabla 4.IV.7 y figura 4.IV.11.

Glicerol 2.28%			Glicerol 2.28% + Tampón fosfato 0.01 M		
Tiempo (días)	Dimensiones (nm)	PDI	Tiempo (días)	Dimensiones (nm)	PDI
0	217.39 ± 13.16	0.21 ± 0.04	0	218.30 ± 6.65	0.18 ± 0.02
1	219.28 ± 15.23	0.20 ± 0.06	1	226.20 ± 9.90	0.19 ± 0.03
2	223.61 ± 13.59	0.21 ± 0.06	2	231.55 ± 2.47	0.18 ± 0.03
3	219.20 ± 8.29	0.18 ± 0.03	3	232.14 ± 5.94	0.17 ± 0.03
4	211.48 ± 7.73	0.17 ± 0.04	4	227.92 ± 7.50	0.17 ± 0.02
5	228.45 ± 16.05	0.25 ± 0.03	7	230.80 ± 0.71	0.19 ± 0.03
6	228.97 ± 10.08	0.24 ± 0.04			
7	229.03 ± 15.81	0.24 ± 0.06			

Tabla 4.IV.7. Dimensiones y PDI de los NHs resuspendidos en agua con glicerol al 2.28% o glicerol al 2.28% y tampón fosfato pH 7.4 0.01 M, conservados a 4°C

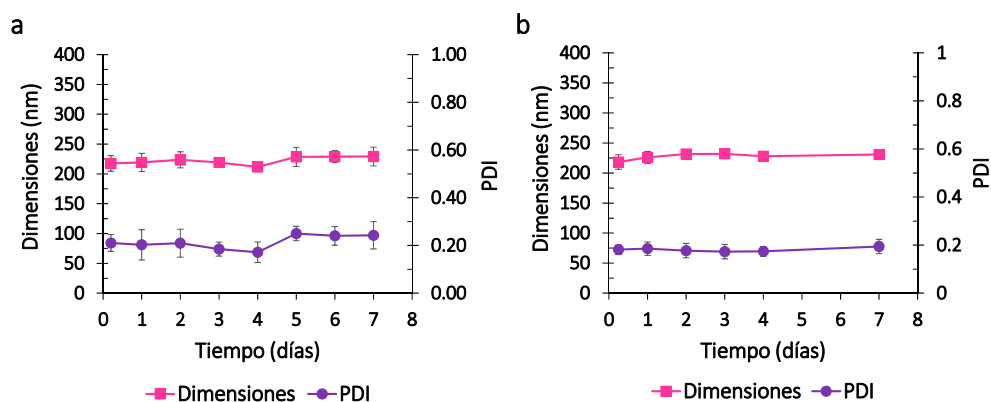


Figura 4.IV.11. Estabilidad a 4°C de los NHs en a) glicerol 2.28%, b) glicerol 2.28% más tampón fosfato pH 7.4 0.01 M

7. Biodistribución de los NHs

El porcentaje de acumulación de los NHs y del HA en órganos se ha evaluado mediante la determinación de la fluorescencia emitida por el plasma y los órganos vitales estudiados a distintos tiempos tras su administración intravenosa.

Los resultados, recogidos en las tablas 4.IV.8 y 4.IV.9 y representados en la figura 4.IV.12, se expresan como promedio del porcentaje de la fluorescencia total registrada para cada rata. La señal de fluorescencia es casi nula (menor al 2%) en los pulmones, bazo, corazón y cerebro a cualquier tiempo, lo que indica que ni el polímero ni los NHs se acumulan en estos órganos. Como era de esperar, el hígado

es el órgano principal de la biodistribución tanto del polímero como de los NHs y constituye el 98.2% y 85.5% de la fluorescencia registrada a las 48 horas para el HA y los NHs, respectivamente. En cuanto a los riñones, se observa que los NHs se eliminan por excreción urinaria entre las 24-48 horas después de la administración (5.7-9.1% de la señal); sin embargo, la señal de fluorescencia en riñón en las ratas que recibieron el polímero marcado es prácticamente nula en todos los tiempos. Por último, es interesante destacar que los NHs se mantienen mayor periodo de tiempo circulantes en sangre, ya que a las 24 horas la señal de fluorescencia es de un 41.3% y a las 48 horas de un 3.25%, en contraste con el polímero HA que registra valores de intensidad menores al 1% en ambos tiempos.

	Tiempo (h)			
	5	10	24	48
Bazo	0.25 ± 0.07	6·10 ⁻³ ± 1·10 ⁻³	0.49 ± 0.69	0.23 ± 0.05
Cerebro	1.44 ± 0.56	1.53 ± 0.24	2·10 ⁻³ ± 1·10 ⁻⁴	1.22 ± 0.23
Corazón	1.58 ± 0.80	0.10 ± 5·10 ⁻³	1.14 ± 0.26	0.33 ± 0.15
Hígado	30.44 ± 7.86	61.27 ± 11.07	96.49 ± 2.71	98.23 ± 0.78
Pulmones	1.13 ± 0.06	2.94 ± 0.83	1.89 ± 2.28	0.02 ± 1·10 ⁻³
Riñones	2.51 ± 0.73	1·10 ⁻³ ± 1·10 ⁻⁴	1·10 ⁻³ ± 1·10 ⁻⁴	1·10 ⁻³ ± 2·10 ⁻⁴
Plasma	62.64 ± 10.75	34.15 ± 8.53	0.78 ± 0.48	0.01 ± 1·10 ⁻³

Tabla 4.IV.8. Porcentaje de acumulación del HA en función del tiempo y el órgano/plasma evaluado

	Tiempo (h)			
	5	10	24	48
Bazo	1·10 ⁻³ ± 1·10 ⁻⁴	3·10 ⁻³ ± 1·10 ⁻³	0.07 ± 0.10	1·10 ⁻⁴ ± 1·10 ⁻⁵
Cerebro	1·10 ⁻³ ± 1·10 ⁻⁴	5·10 ⁻³ ± 1·10 ⁻³	9·10 ⁻³ ± 1·10 ⁻³	0.66 ± 0.98
Corazón	0.97 ± 0.16	0.24 ± 0.09	1.18 ± 0.04	0.57 ± 0.13
Hígado	33.15 ± 9.84	51.31 ± 8.84	51.03 ± 10.25	85.54 ± 2.58
Pulmones	0.77 ± 0.07	0.69 ± 0.24	0.64 ± 0.12	0.87 ± 0.34
Riñones	1·10 ⁻⁴ ± 1·10 ⁻⁵	5·10 ⁻³ ± 1·10 ⁻³	5.74 ± 4.40	9.12 ± 7.21
Plasma	65.11 ± 12.12	45.53 ± 10.69	41.34 ± 9.64	3.25 ± 1.93

Tabla 4.IV.9. Porcentaje de acumulación de los NHs en función del tiempo y el órgano/plasma evaluado

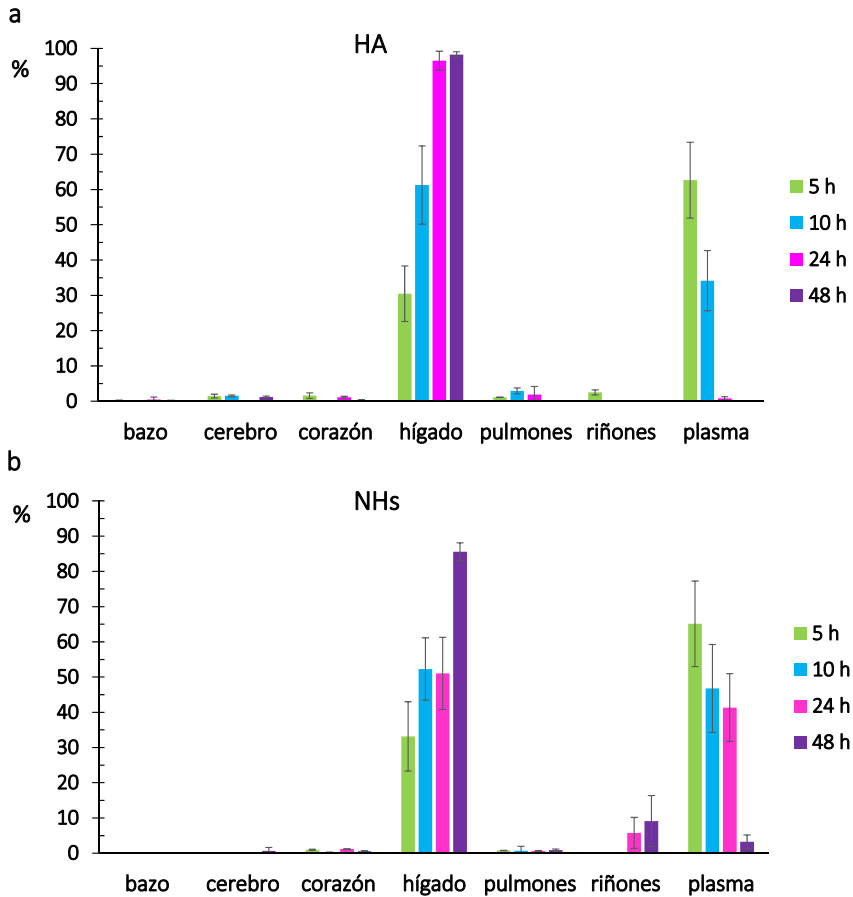


Figura 4.IV.12. Porcentaje de acumulación a) del HA y b) de los NHs a las 5, 10, 24 y 48 horas de la administración intravenosa en plasma y órganos analizados

La figura 4.IV.13 muestra la evolución de la acumulación del polímero (figura 4.IV.13 a) y de los NHs (figura 4.IV.13 b) en plasma, hígado y riñones. A tiempo cero se asume que la formulación recién administrada se encuentra totalmente en plasma y va distribuyéndose, principalmente a hígado, conforme avanza el tiempo. La figura 4.IV.14 muestra la comparativa de la evolución de la desaparición en sangre y la acumulación en hígado de ambas formulaciones. La diferencia entre el porcentaje de distribución de NHs y polímero en hígado y plasma es estadísticamente significativa a las 24 y 48 horas tras la administración; el tiempo de retención de los NHs en plasma es significativamente mayor que el del polímero.

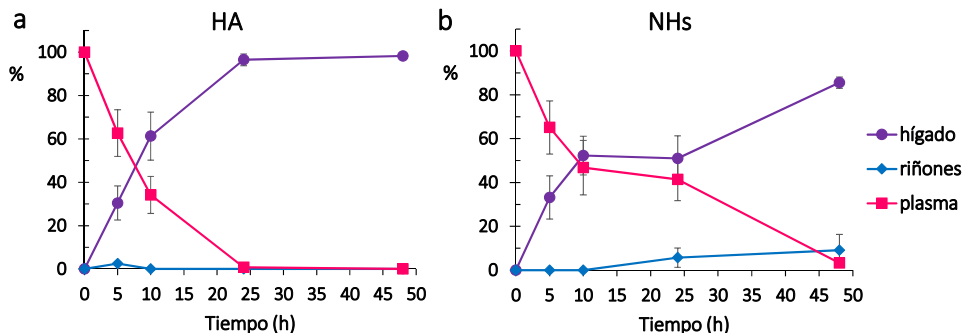


Figura 4.IV.13. Evolución de la acumulación relativa en hígado, plasma y riñones a) del polímero HA y b) de los NHs

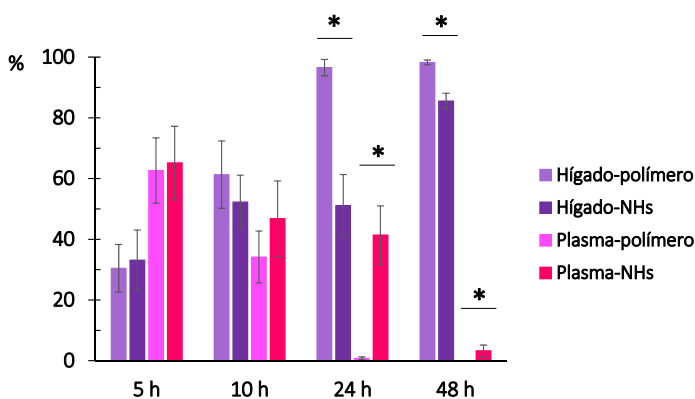


Figura 4.IV.14. Comparativa de la evolución del porcentaje de acumulación del polímero y los NHs en hígado y plasma. (*) = diferencias estadísticamente significativas

Los resultados obtenidos coinciden con los previamente publicados; el sistema retículo-endotelial retira el HA rápidamente de la circulación sanguínea, es metabolizado ampliamente en las células endoteliales hepáticas y sus metabolitos son reutilizados en el cuerpo. La captación por los riñones es baja, y es menor cuanto mayor es el PM del polímero.⁴¹ En el caso de los NHs de HA, también se acumulan principalmente en el hígado; la acumulación en otros órganos del sistema retículo-endotelial (riñones, bazo) es variable.^{43, 58} Finalmente, en otros órganos, como pulmones, cerebro y corazón, la biodistribución de los NHs es mínima.⁵⁸

En base a los datos obtenidos se concluye que la principal ventaja de la formación de los NHs es que presentan un tiempo de circulación en sangre

significativamente mayor al del polímero de partida, ya que el porcentaje de polímero es menor al 1% a las 24 frente al 41.3 % de los NHs a este tiempo.

8. Influencia de los NHs en la farmacocinética del piroxicam

En este ensayo se ha evaluado la diferencia entre los perfiles plasmáticos de fármaco administrado en solución y en el interior de los NHs. Los resultados de concentración plasmática frente al tiempo se muestran en la tabla 4.IV.10 y figura 4.IV.15.

Tiempo (h)	C piroxicam ($\mu\text{g/ml}$)	
	Solución	NHs
0.08	0.84 ± 0.07	0.96 ± 0.42
0.17	0.76 ± 0.13	0.87 ± 0.10
0.25	0.79 ± 0.14	0.85 ± 0.10
0.50	0.75 ± 0.10	0.84 ± 0.07
1	0.65 ± 0.03	0.80 ± 0.10
2	0.49 ± 0.06	0.64 ± 0.10
4	0.37 ± 0.11	0.48 ± 0.09
6	0.20 ± 0.03	0.41 ± 0.06
8	0.11 ± 0.05	0.31 ± 0.06
10	0.10 ± 0.08	0.25 ± 0.05
12	0.05 ± 0.06	0.18 ± 0.02
24	BLQ	0.02 ± 0.02
30	BLQ	BLQ

Tabla 4.IV.10. Concentraciones plasmáticas del piroxicam administrado en solución y mediante NHs. (BLQ = inferior al límite de cuantificación)

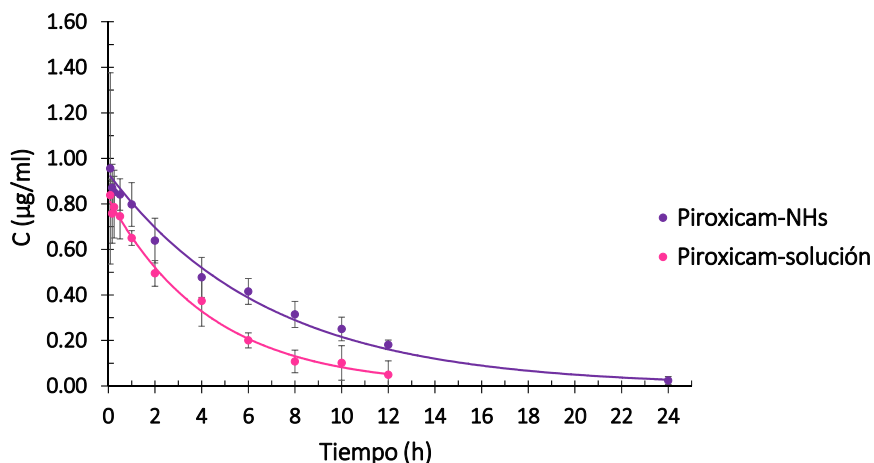


Figura 4.IV.15. Concentraciones plasmáticas de piroxicam frente al tiempo en función de la formulación administrada

La selección del modelo farmacocinético que mejor describe los datos obtenidos tras la administración del fármaco en solución se ha realizado en base a menor valor de SSR y de AIC. Los valores de SSR, r y AIC se muestran en la tabla 4.IV.11. El modelo seleccionado es el monocompartimental ya que no existen diferencias en el coeficiente de correlación de ambos modelos, y los valores de SSR y AIC son menores para dicho modelo.

	MC	BC
SSR	$1.47 \cdot 10^{-3}$	$1.54 \cdot 10^{-3}$
r	0.995	0.995
AIC	-67.26	-63.84

Tabla 4.IV.11. Parámetros estadísticos para los modelos monocompartimental (MC) y bicompartimental (BC)

Una vez seleccionado el modelo monocompartimental, se han calculado los parámetros farmacocinéticos para ambas formulaciones, cuyos resultados se muestran en la tabla 4.IV.12.

	Piroxicam en solución	Piroxicam en NHs	Ratio (NHs/solución)	t-student	Estadística
k_{el} (h^{-1})	0.22 ± 0.03	0.17 ± 0.03	0.78	0.034	S
V_d (l)	0.44 ± 0.04	0.39 ± 0.03	0.88	0.040	S
AUC ($\mu g \cdot h/ml$)	3.81 ± 0.76	5.45 ± 0.46	1.43	0.003	S
Cl (l/h)	0.10 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.68	0.009	S
$t_{1/2}$ (h)	3.21 ± 0.44	4.09 ± 0.59	1.28	0.028	S

Tabla 4.IV.12. Parámetros farmacocinéticos del piroxicam administrado en solución y mediante NHs. S = existen diferencias estadísticamente significativas

Como se observa en la tabla 4.IV.12, existen diferencias estadísticamente significativas entre ambas formulaciones para todos los parámetros estudiados ($p < 0.05$).

Los resultados ponen de manifiesto la utilidad de los NHs como vehículos para la administración de fármacos por vía intravenosa, permitiendo modificar los parámetros farmacocinéticos del principio activo administrado. La diferencia más significativa en los parámetros farmacocinéticos cuando el fármaco es administrado en el interior de los NHs se produce en el aclaramiento (Cl), para el que se observa una reducción del 30% respecto al fármaco en solución. Esta reducción en el aclaramiento permite mantener altas concentraciones de fármaco durante un periodo de tiempo más prolongado, lo que implica una exposición mayor al fármaco. Se puede observar también que el AUC del fármaco administrado mediante NHs es un 43% mayor que el del fármaco en solución.

Los resultados obtenidos con piroxicam concuerdan con los análisis de biodistribución de los NHs realizados previamente, que mostraban mayor permanencia de los NHs en sangre frente al HA. Por tanto, puede considerarse que estos sistemas se perfilan como una buena alternativa para la administración de fármacos en situaciones en las que se desee prolongar su permanencia en el organismo, como es el caso de fármacos con una semivida biológica corta.

V. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

Conclusiones

En este trabajo se ha estudiado la formación de NHs a partir un polímero anfifílico obtenido por modificación hidrófoba del HA con un derivado de la riboflavina. Dicho polímero es capaz de autoensamblarse y formar espontáneamente NHs cuando es sometido a un proceso en autoclave a 121°C y 1.1 bar durante 20 minutos. La concentración de polímero mínima a la que se produce dicho fenómeno (CAC) es de 234 µg/ml. Los NHs que se obtienen mediante dicha metodología poseen unas dimensiones entre 190 y 230 nm y un índice de polidispersión inferior a 0.3. Mediante el ciclo de esterilización en autoclave es posible cargar fármacos en su interior simultáneamente a la formación de los NHs. Se ha demostrado que la liofilización, con la adición previa de dextrosa al 1% p/v, es un método adecuado para la conservación de los NHs que no modifica sus dimensiones. El ajuste de la osmolaridad y el pH de las formulaciones a valores

plasmáticos, esto es, 290 ± 10 mOsm/l y pH 7.40 ± 0.05 , se ha realizado mediante la adición de glicerol al 2.28% y tampón fosfato 0.01 M pH 7.4. En estas condiciones, la suspensión de NHs se ha mantenido estable a 4°C al menos durante una semana.

Se ha demostrado que los NHs permiten prolongar significativamente el tiempo de retención del polímero en sangre, ya que a las 24 horas de la administración intravenosa más del 40% de los NHs se encuentran aún en sangre, frente a menos del 1% del HA. Asimismo, los NHs permiten modificar los parámetros farmacocinéticos del principio activo administrado, reduciendo un 30% el aclaramiento y aumentando un 43% el AUC, respecto al fármaco administrado en solución. Estos sistemas se perfilan como una buena alternativa para la administración de fármacos en situaciones en las que se desee prolongar su permanencia en el organismo, como es el caso de fármacos con una semivida biológica corta.

Conclusions

In this work the formation of NHs from an amphiphilic polymer obtained by hydrophobic modification of HA with a riboflavin derivative has been studied. Said polymer is able to self-assemble and form spontaneously NHs when is subjected to an autoclaving process (121°C , 1.1 bar, 20 minutes). The minimum polymer concentration at which this phenomenon occurs (CAC) is $234 \mu\text{g/ml}$. NHs obtained by this methodology have dimensions between 190 and 230 nm and a polydispersity index lower than 0.3. By sterilization in autoclave it is possible to form NHs and load drugs within them at the same time. It has been shown that freeze-drying, after the addition of dextrose 1% w/v, is a suitable method for the conservation of NHs without changing their dimensions. The adjustment of the formulations osmolarity and pH to plasma levels, that is, 290 ± 10 mOsm/l and pH 7.40 ± 0.05 , was made by adding 2.28% glycerol and phosphate buffer 0.01 M pH 7.4. In these conditions, NHs suspension at 4°C remained stable at least for a week.

It has been demonstrated that NHs allow to prolong significantly the retention time of the polymer in blood, since after 24 hours of intravenous administration more than 40% of the NHs are still in blood, compared to less than 1% of HA. NHs also allow to modify the pharmacokinetic parameters of the active ingredient administered, reducing 30% the clearance and increasing 43% the AUC, compared to the drug administered in solution. These systems are a good alternative to drug

administration in situations where it is desired to prolong their stay in the body, as is in the case of short biological half-life drugs.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Zhang H., Zhai Y., Wang J., Zhai G. New progress and prospects: The application of nanogel in drug delivery. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2016; 60: 560-568.
2. Escalona Rayo O., Quintanar Guerrero D. Nanogeles poliméricos: una nueva alternativa para la administración de fármacos. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* 2014; 45: 17-38.
3. Chacko R.T., Ventura J., Zhuang J., Thayumanavan S. Polymer nanogels: A versatile nanoscopic drug delivery platform. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2012; 64 (9): 836-851.
4. Kabanov A.V., Vinogradov S.V. Nanogels as pharmaceutical carriers: finite networks of infinite capabilities. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2009; 48 (30): 5418-5429.
5. Tamura A., Oishi M., Nagasaki Y. Efficient siRNA delivery based on PEGylated and partially quaternized polyamine nanogels: enhanced gene silencing activity by the cooperative effect of tertiary and quaternary amino groups in the core. *J. Control Release* 2010; 146 (3): 378-387.

6. Cao X.T., Showkat A.M., Lim K.T. Synthesis of nanogels of poly(ϵ -caprolactone)-b-poly(glycidyl methacrylate) by click chemistry in direct preparation. *Eur. Polym. J.* 2015; 68: 267-277.
7. Jin Q., Liu G., Ji J. Preparation of reversibly photo-cross-linked nanogels from pH-responsive block copolymers and use as nanoreactors for the synthesis of gold nanoparticles. *Eur. Polym. J.* 2010; 46 (11): 2120-2128.
8. Morimoto N., Qiu X.-P., Winnik F.M., Akiyoshi K. Dual Stimuli-Responsive Nanogels by Self-Assembly of Polysaccharides Lightly Grafted with Thiol-Terminated Poly(N-isopropylacrylamide) Chains. *Macromolecules* 2008; 41 (16): 5985-5987.
9. Hamidi M., Azadi A., Rafiei P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2008; 60 (15): 1638-1649.
10. Dobrynin A.V., Colby R.H., Rubinstein M. Polyampholytes. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* 2004; 42 (19): 3513-3538.
11. Carme Coll Ferrer M., Sobolewski P., Composto R.J., Eckmann D.M. Cellular Uptake and Intracellular Cargo Release From Dextran Based Nanogel Drug Carriers. *J Nanotechnol Eng Med* 2013; 4 (1): 110021-110028.
12. Sasaki Y., Akiyoshi K. Nanogel engineering for new nanobiomaterials: from chaperoning engineering to biomedical applications. *Chem. Rec.* 2010; 10 (6): 366-376.
13. Rao J.P., Geckeler K.E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Prog. Polym. Sci.* 2011; 36 (7): 887-913.
14. Vinogradov S.V., Zeman A.D., Batrakova E.V., Kabanov A.V. Polyplex Nanogel formulations for drug delivery of cytotoxic nucleoside analogs. *J. Control Release* 2005; 107 (1): 143-157.
15. De Jaeghere F., Allémann E., Leroux J.-C., Stevels W., Feijen J., Doelker E., et al. Formulation and Lyoprotection of Poly(Lactic Acid-Co-Ethylene Oxide) Nanoparticles: Influence on Physical Stability and In Vitro Cell Uptake. *Pharm. Res.* 1999; 16 (6): 859-866.
16. Giubudagian M., Asadian-Birjand M., Steinhilber D., Achazi K., Molina M., Calderon M. Fabrication of thermoresponsive nanogels by thermoprecipitation and in situ encapsulation of bioactives. *Polym. Chem.* 2014; 5 (24): 6909-6913.
17. Na K., Lee E.S., Bae Y.H. Self-Organized Nanogels Responding to Tumor Extracellular pH: pH-Dependent Drug Release and in Vitro Cytotoxicity against MCF-7 Cells. *Bioconjug. Chem.* 2007; 18 (5): 1568-1574.

18. Meziani M.J., Pathak P., Hurezeanu R., Thies M.C., Enick R.M., Sun Y.-P. Supercritical-Fluid Processing Technique for Nanoscale Polymer Particles. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004; 43 (6): 704-707.
19. Montanari E., De Rugeris M.C., Di Meo C., Censi R., Coviello T., Alhaique F., et al. One-step formation and sterilization of gellan and hyaluronan nanohydrogels using autoclave. *J Mater Sci Mater Med* 2015; 26 (1): 014-5362.
20. Yoon S.-J., Chun H., Lee M.-S., Kim N. Preparation of poly(N-vinylcarbazole) (PVK) nanoparticles by emulsion polymerization and PVK hollow particles. *Synth. Met.* 2009; 159 (5–6): 518-522.
21. Liu G., Liu P. Synthesis of monodispersed crosslinked nanoparticles decorated with surface carboxyl groups via soapless emulsion polymerization. *Colloids Surf., A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2010; 354 (1–3): 377-381.
22. Klinger D., Aschenbrenner E.M., Weiss C.K., Landfester K. Enzymatically degradable nanogels by inverse miniemulsion copolymerization of acrylamide with dextran methacrylates as crosslinkers. *Polym. Chem.* 2012; 3 (1): 204-216.
23. McAllister K., Sazani P., Adam M., Cho M.J., Rubinstein M., Samulski R.J., et al. Polymeric Nanogels Produced via Inverse Microemulsion Polymerization as Potential Gene and Antisense Delivery Agents. *J. Am. Chem. Soc.* 2002; 124 (51): 15198-15207.
24. Krauel K., Davies N.M., Hook S., Rades T. Using different structure types of microemulsions for the preparation of poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles by interfacial polymerization. *J. Controlled Release* 2005; 106 (1–2): 76-87.
25. De Rugeris M.C., Montanari E., Di Meo C., Matricardi P. Method for preparing nanohydrogel. 2014. Patente: WO/2014/199318
26. Akiyoshi K., Deguchi S., Tajima H., Nishikawa T., Sunamoto J. Microscopic Structure and Thermoresponsiveness of a Hydrogel Nanoparticle by Self-Assembly of a Hydrophobized Polysaccharide. *Macromolecules* 1997; 30 (4): 857-861.
27. Akiyoshi K., Deguchi S., Moriguchi N., Yamaguchi S., Sunamoto J. Self-aggregates of hydrophobized polysaccharides in water. Formation and characteristics of nanoparticles. *Macromolecules* 1993; 26 (12): 3062-3068.
28. Akiyama E., Morimoto N., Kujawa P., Ozawa Y., Winnik F.M., Akiyoshi K. Self-assembled nanogels of cholesteryl-modified polysaccharides: effect of the polysaccharide structure on their association characteristics in the dilute and semidilute regimes. *Biomacromolecules* 2007; 8 (8): 2366-2373.
29. Montanari E., D'Arrigo G., Di Meo C., Virga A., Coviello T., Passariello C., et al. Chasing bacteria within the cells using levofloxacin-loaded hyaluronic acid nanohydrogels. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2014; 87 (3): 518-523.

30. Montanari E., Capece S., Di Meo C., Meringolo M., Coviello T., Agostinelli E., et al. Hyaluronic acid nanohydrogels as a useful tool for BSAO immobilization in the treatment of melanoma cancer cells. *Macromol Biosci* 2013; 13 (9): 1185-1194.
31. Wei X., Senanayake T.H., Warren G., Vinogradov S.V. Hyaluronic acid-based nanogel-drug conjugates with enhanced anticancer activity designed for the targeting of CD44-positive and drug-resistant tumors. *Bioconjug. Chem.* 2013; 24 (4): 658-668.
32. Nakai T., Hirakura T., Sakurai Y., Shimoboji T., Ishigai M., Akiyoshi K. Injectable hydrogel for sustained protein release by salt-induced association of hyaluronic acid nanogel. *Macromol Biosci* 2012; 12 (4): 475-483.
33. Nichifor M., Lopes A., Carpov A., Melo E. Aggregation in Water of Dextran Hydrophobically Modified with Bile Acids. *Macromolecules* 1999; 32 (21): 7078-7085.
34. Choi K.Y., Chung H., Min K.H., Yoon H.Y., Kim K., Park J.H., et al. Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles for active tumor targeting. *Biomaterials* 2010; 31 (1): 106-114.
35. Na K., Park K.M., Jo E.A., Lee K.S. Self-organized pullulan/deoxycholic acid nanogels: Physicochemical characterization and anti-cancer drug-releasing behavior. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2006; 11 (3): 262-267.
36. Lee K.Y., Jo W.H., Kwon I.C., Kim Y.-H., Jeong S.Y. Structural Determination and Interior Polarity of Self-Aggregates Prepared from Deoxycholic Acid-Modified Chitosan in Water. *Macromolecules* 1998; 31 (2): 378-383.
37. Park W., Kim K.S., Bae B.C., Kim Y.H., Na K. Cancer cell specific targeting of nanogels from acetylated hyaluronic acid with low molecular weight. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2010; 40 (4): 367-375.
38. D'Arrigo G., Di Meo C., Gaucci E., Chichiarelli S., Coviello T., Capitani D., et al. Self-assembled gellan-based nanohydrogels as a tool for prednisolone delivery. *Soft Matter* 2012; 8 (45): 11557-11564.
39. Matricardi P., Di Meo C., Villani C. Novel polymer platform to prepare nanohydrogel. 2015. Patente: WO/2015/071873.
40. Di Meo C., Montanari E., Manzi L., Villani C., Coviello T., Matricardi P. Highly versatile nanohydrogel platform based on riboflavin-polysaccharide derivatives useful in the development of intrinsically fluorescent and cytocompatible drug carriers. *Carbohydr. Polym.* 2015; 115: 502-509.
41. Svanovsky E., Velebny V., Laznickova A., Laznicek M. The effect of molecular weight on the biodistribution of hyaluronic acid radiolabeled with ¹¹¹In after

intravenous administration to rats. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 2008; 33 (3): 149-157.

42. Harris E.N., Kyosseva S.V., Weigel J.A., Weigel P.H. Expression, processing, and glycosaminoglycan binding activity of the recombinant human 315-kDa hyaluronic acid receptor for endocytosis (HARE). *J. Biol. Chem.* 2007; 282 (5): 2785-2797.

43. Rosso F., Quagliariello V., Tortora C., Di Lazzaro A., Barbarisi A., Iaffaioli R.V. Cross-linked hyaluronic acid sub-micron particles: in vitro and in vivo biodistribution study in cancer xenograft model. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2013; 24 (6): 1473-1481.

44. Choi K.Y., Min K.H., Yoon H.Y., Kim K., Park J.H., Kwon I.C., et al. PEGylation of hyaluronic acid nanoparticles improves tumor targetability in vivo. *Biomaterials* 2011; 32 (7): 1880-1889.

45. Reddy B.S., Maruyama H., Kelloff G. Dose-related inhibition of colon carcinogenesis by dietary piroxicam, a nonsteroidal antiinflammatory drug, during different stages of rat colon tumor development. *Cancer Res.* 1987; 47 (20): 5340-5346.

46. Pollard M., Luckert P.H. Effect of piroxicam on primary intestinal tumors induced in rats by N-methylnitrosourea. *Cancer Lett.* 1984; 25 (2): 117-121.

47. Pereira M.A., Barnes L.H., Steele V.E., Kelloff G.V., Lubet R.A. Piroxicam-induced regression of azoxymethane-induced aberrant crypt foci and prevention of colon cancer in rats. *Carcinogenesis* 1996; 17 (2): 373-376.

48. Tanaka T., Kojima T., Okumura A., Sugie S., Mori H. Inhibitory effect of the non-steroidal anti-inflammatory drugs, indomethacin and piroxicam on 2-acetylaminofluorene-induced hepatocarcinogenesis in male ACIN rats. *Cancer Lett.* 1993; 68 (2): 111-118.

49. Moon R.C., Kelloff G.J., Detrisac C.J., Steele V.E., Thomas C.F., Sigman C.C. Chemoprevention of OH-BBN-induced bladder cancer in mice by piroxicam. *Carcinogenesis* 1993; 14 (7): 1487-1489.

50. Tanaka T., Nishikawa A., Mori Y., Morishita Y., Mori H. Inhibitory effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs, piroxicam and indomethacin on 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinogenesis in male ACI/N rats. *Cancer Lett.* 1989; 48 (3): 177-182.

51. Jalbert G., Castonguay A. Effects of NSAIDs on NNK-induced pulmonary and gastric tumorigenesis in A/J mice. *Cancer Lett.* 1992; 66 (1): 21-28.

52. Benveniste C., Striberni R., Dayer P. Indirect assessment of the enterohepatic recirculation of piroxicam and tenoxicam. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1990; 38 (6): 547-549.

53. Richardson C.J., Blocka K.L.N., Ross S.G., Verbeeck R.K. Piroxicam and 5'-hydroxyproxicam kinetics following multiple dose administration of piroxicam. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1987; 32 (1): 89-91.
54. Calin A. Therapeutic focus. Piroxicam. *Br. J. Clin. Pract.* 1988; 42 (4): 161-164.
55. Adami H.O., Alexandrov V.A., Baron J.A., Benamouzig R., Burn J., Castonguay A., et al. Piroxicam. En: *IARC Handbooks of Cancer Prevention. Non-Steroidal Anti-inflammatory Drugs*. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization, 1997:127-149.
56. Nobbmann U. Polydispersity – what does it mean for DLS and chromatography? Disponible en: <http://www.materials-talks.com/blog/2014/10/23/polydispersity-what-does-it-mean-for-dls-and-chromatography/>. Fecha de consulta: 31/08/2016
57. Kuo J.W. *Practical Aspects of Hyaluronan Based Medical Products*, 2006.
58. Wei X., Senanayake T.H., Bohling A., Vinogradov S.V. Targeted nanogel conjugate for improved stability and cellular permeability of curcumin: synthesis, pharmacokinetics, and tumor growth inhibition. *Mol. Pharm.* 2014; 11 (9): 3112-3122.

Conclusiones generales
General conclusions

Conclusiones generales

1. La camptotecina se clasifica, según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico, como un fármaco clase IV a dosis elevadas, mientras que a dosis bajas puede considerarse un fármaco de la clase II.
2. La reacción entre los grupos amino del quitosán y los grupos hidroximetilo del tetraquis(hidroximetil)fosfonio permite obtener hidrogeles entrecruzados covalentemente.
 - 2.1. Su hinchamiento es dependiente de pH y se describe con una cinética de orden dos. Estos hidrogeles poseen baja toxicidad, son biocompatibles y mucoadhesivos, lo que permite aumentar el tiempo de permanencia en el tracto gastrointestinal.
 - 2.2. La liberación de la camptotecina a partir de los hidrogeles se produce por difusión a través de la matriz hinchada y los poros del sistema, y se prolonga durante 48 horas.
 - 2.3. Estos hidrogeles pueden considerarse adecuados para administrar camptotecina por vía oral, ya que cabe esperar que proporcionen bajas concentraciones de fármaco en el lugar de absorción, lo que evitará la saturación de los transportadores y reducirá su toxicidad en lumen intestinal.
3. La interacción iónica entre los grupos catiónicos del quitosán y los grupos aniónicos del reticulante X permite obtener hidrogeles mediante reticulación física.
 - 3.1. La liberación del fármaco cargado en la matriz del hidrogel se caracteriza con una cinética de orden uno, la velocidad de liberación del principio activo es menor cuanto mayor es el porcentaje de reticulación y mayor es el pH del medio.
 - 3.2. El hidrogel y sus componentes carecen de toxicidad y no provocan irritación en la piel.
 - 3.3. La formulación de hidrogel rehidratado tiene una extensibilidad adecuada para la aplicación tópica y permite formar una película

- polimérica que al secarse queda adherida a la piel con una fuerza de adhesión adecuada.
- 3.4. Este hidrogel puede aplicarse rehidratado sobre la piel donde ha demostrado actuar como vehículo para la aplicación tópica de sustancias con mínima absorción sistémica.
 - 3.5. El hidrogel también puede aplicarse liofilizado como apósito para la curación de heridas, sólo o como sistema de administración de principios activos que favorezcan la cicatrización.
4. La modificación del hialuronato con riboflavina permite crear un polímero anfifílico capaz de autoensamblarse y formar nanohidrogeles de dimensiones homogéneas (~200 nm) cuando se somete a un proceso de autoclavado.
- 4.1. El estudio de biodistribución demuestra que la formulación de nanohidrogeles permite prolongar el tiempo de retención del polímero en sangre hasta 48 horas, frente al hialuronato sin modificar que a las 24 horas ya se ha eliminado de sangre casi por completo.
 - 4.2. Estos nanohidrogeles son útiles como vehículos para la administración de fármacos por vía intravenosa ya que aumentan la permanencia del principio activo en sangre, lo que permite reducir la frecuencia de dosificación.

General conclusions

1. According to the Biopharmaceutical Classification System, camptothecin can be classified as a class IV drug at high doses and a class II drug at low doses.
2. The reaction between the amino groups of chitosan and the hydroxymethyl groups of the tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium allows to obtain covalent crosslinked hydrogels.
 - 2.1. The swelling studies show a pH sensitive behavior described by a second order kinetic. Hydrogels have low toxicity and are biocompatible and mucoadhesive, allowing to increase the residence time in the gastrointestinal tract.
 - 2.2. Camptothecin release from hydrogels occurs by diffusion through the swollen matrix and pores, and is prolonged for 48 hours.
 - 2.3. These hydrogels can be considered adequate to allow oral camptothecin administration as they are expected to provide low drug concentrations at the absorption site. This would avoid carrier saturation and would reduce its toxicity at the intestinal lumen.
3. The ionic interaction between the cationic groups of chitosan and the anionic groups of crosslinker X allows to obtain hydrogels by physical crosslinking.
 - 3.1. Drug release from the hydrogel matrix follows a first order kinetic. The higher the degree of crosslinking and the higher the pH of the media, the lower the drug release rate is.
 - 3.2. The hydrogel and its components are non-toxic and do not cause skin irritation.
 - 3.3. Rehydrated hydrogel formulation has suitable extensibility for topical application. Once hydrogel dries on skin, it forms a film which adheres to it with a proper adhesion strength.
 - 3.4. The rehydrated hydrogel can be applied on the skin acting as a vehicle for topical administration of substances with minimal systemic absorption.

- 3.5. The lyophilised hydrogel can be applied as wound dressing without drugs or as drug delivery system for the administration of active ingredients that promote healing.
4. The modification of hyaluronan with riboflavin creates a self-assembling amphiphilic polymer capable of forming nanohydrogels with homogeneous size (~ 200 nm) when are subjected to an autoclaving process.
 - 4.1. The biodistribution study demonstrates that nanohydrogels allow extending the retention time of the polymer in blood up to 48 hours, compared to unmodified hyaluronan which is almost completely eliminated from blood in 24 hours.
 - 4.2. These nanohydrogels are useful as intravenous drug delivery vehicles since they increase the permanence of the active ingredient in blood, thus allowing to reduce dosing frequency.