



Facultad de Farmacia

Departamento de Farmacia y Tecnología
Farmacéutica

Programa de doctorado en Medicina
Clínica y Salud Pública



***Elaboración y estudio de micropartículas
de ciprofloxacino de liberación
prolongada a nivel del colon.***

Tesis Doctoral

Begoña Muñoz Ortega

Granada, Septiembre 2015

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autora: Begoña Muñoz Ortega
ISBN: 978-84-9163-598-7
URI: <http://hdl.handle.net/10481/48550>

Dña. M^a Teresa Marín Boscá, Profesora Titular del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Granada

CERTIFICA

Que el trabajo de investigación que se presenta en esta memoria, titulado

Elaboración y estudio de micropartículas de ciprofloxacino de liberación prolongada a nivel del colon.

ha sido realizado en el departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica bajo mi dirección, por la licenciada Dña. Begoña Muñoz Ortega y constituye su Tesis Doctoral.

Con esta fecha autorizo su presentación ante la Comisión Académica del Programa de Doctorado en Medicina Clínica y Salud Pública

Granada, a 28 de Septiembre de 2015

Directora de la Tesis

Doctoranda

Fdo: M^a Teresa Marín Boscá

Fdo: Begoña Muñoz Ortega

El doctorando D^a Begoña Muñoz Ortega y la directora de la tesis D^{ña}. M^a Teresa Marín Boscá:

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 28 Septiembre de 2015.

Director/es de la Tesis

Doctorando

Fdo.: M^a Teresa Marín Boscá

Fdo.: Begoña Muñoz Ortega

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	1
ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL	3
1. Factores genéticos.....	4
2. Factores ambientales	7
3. Factores inmunológicos.....	9
4. Microbiota.....	15
TRATAMIENTO FARMACOLOGICO DE LA ENFERMEDAD	19
1. Antiinflamatorios.....	19
2. Glucocorticoides.....	20
3. Inmunomoduladores.....	20
4. Agentes Biológicos	21
5. Probióticos.....	22
6. Quitosano	22
7. Antibióticos	23
FORMAS FARMACÉUTICAS UTILIZADAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA EII.....	26
1. Vía parenteral.....	26
2. Vía rectal.....	26
3. Vía oral	27
SISTEMAS MICRO-NANOPARTICULARES PARA TRANSPORTAR AL FÁRMACO.....	38
❖ Coacervación:.....	39
❖ Extracción/evaporación disolvente:.....	40
❖ Secado por nebulización.....	41
❖ Recubrimiento en lecho fluido:.....	43
❖ Gelificación ionica:	43
OBJETIVOS Y.....	47
PLAN DE TRABAJO	51
OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	53
MATERIALES Y MÉTODOS	59
MATERIALES.....	59
MÉTODOS	59
1. Preparación de las micropartículas.....	59
1.1. <i>Micropartículas de quitosano.</i>	59
1.2. <i>Micropartículas de Eudragit</i>	60
2. Pruebas físicas.....	62
3. Preparación de comprimidos	63
4. Ensayo de disolución	65
5. Análisis espectrofotométrico de las muestras.....	66
5.1. Determinación de la longitud de onda de máxima absorción.....	66
5.2. Validación del método analítico.	66
6. Estudio cinético de los resultados de disolución	71
6.1. <i>Modelos matemáticos</i>	71
6.2. <i>Parámetros modelo independientes.</i>	75

7. Estudios estadísticos.....	76
8. Estudios de absorción “in vivo” y permeabilidad “ex vivo”	77
8.1. Absorción “in vivo”	77
8.2. Permeabilidad “ex vivo”	77
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	81
1. Micropartículas de quitosano.....	81
1.1. Caracterización física de las micropartículas de quitosano	81
1.2. Análisis estadístico de las micropartículas de quitosano.....	82
1.3. Estudio térmico.....	86
1.4. Ensayo disolución	91
2. Micropartículas de Eudragit®	93
2.1. Caracterización física de las micropartículas de Eudragit®	93
2.2. Ensayo de disolución	97
2.3. Análisis estadístico de las micropartículas de Eudragit®	100
2.4. Discusión ensayos preliminares.....	103
3. Micropartículas finales	104
3.1. Estudio térmico.....	104
3.2. Morfología y tamaño (ESEM).....	107
3.3. Ensayos de disolución.....	109
3.4. Estudio cinético.	110
4. Estudios de absorción “in vivo” y permeabilidad “ex vivo”	113
4.1. Absorción “in vivo”	113
4.2. Permeabilidad “ex vivo”	114
5. Estudio de los comprimidos	115
5.1. Selección de los comprimidos constituyentes del núcleo.	115
5.2. Selección de los comprimidos recubiertos.....	118
5.3. Estudios finales.	119
CONCLUSIONES	121
ANEXO	125
ANEXO I: Curvas de distribución de los tamaños de partículas de las muestras de quitosano.	127
ANEXO II: Curvas de distribución de los tamaños de partículas de muestras de Eudragits®.	131
ANEXO III: TG micropartículas de quitosano.....	137
ANEXO IV: TG micropartículas finales de Eudragit®	142
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145

Resumen

La presente tesis doctoral tiene como objetivo principal el diseño de una forma farmacéutica, que permita la administración oral de ciprofloxacino, de manera que este antibiótico llegue lo más inalterado al colon y se vaya liberando localmente de forma gradual. Nuestro interés reside en mantener la concentración eficaz durante el mayor tiempo posible, evitando los efectos adversos relacionados con la escasa liberación selectiva del fármaco que presentan las formas farmacéuticas convencionales.

Para ello se preparan dos tipos de micropartículas. Unas se sintetizan con quitosano, elaboradas mediante secado por nebulización a proporciones fármaco:polímero 8:1, 2:1 y 1:2. Otras se elaboran con distintos Eudragits[®] (Eudragit[®] RS, Eudragit[®] RL y una mezcla a partes iguales de ambos) y se sintetizan por secado por nebulización y evaporación del disolvente a tres proporciones fármaco:polímero distintas (2:1, 1:1, 1:2).

Se estudian las características físicas de los polímeros quitosano, Eudragit[®] RL PO y Eudragit[®] RS PO y de las formulaciones utilizadas para la obtención de micropartículas, mediante DSC y TG para determinar la posible interacción entre los componentes de las mismas.

Se realiza una caracterización física de las micropartículas, en cuanto a su granulometría, carga (%) y rendimiento del proceso de encapsulación, además de someterlas a un estudio de disolución “in vitro” para seleccionar las que proporcionan un perfil de liberación del fármaco más acorde a nuestro objetivo y su posterior estudio in vivo.

Se lleva a cabo un estudio “in vivo” y “ex vivo” de la cesión del fármaco desde las micropartículas comprobando que necesitan de un recubrimiento capaz de protegerlas del ambiente degradativo del estómago y de la absorción intestinal.

Finalmente, se diseñan y elaboran unos comprimidos que se recubren con HPMC y pectina, capaces de conseguir que las micropartículas seleccionadas accedan al colon sin ser alteradas, y liberen al antibiótico durante un tiempo prolongado. Estos comprimidos pueden ser útiles para el tratamiento de enfermedades tales como la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa (EII).

INTRODUCCION

ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII o IBD “inflammatory bowel disease”, en inglés) define a un grupo de enfermedades distintas que comparten como característica el producir inflamación crónica del tracto gastrointestinal. Se caracteriza por una respuesta a microorganismos intestinales en un huésped genéticamente susceptible. Los síntomas clínicos incluyen pérdida de peso, diarrea acompañada de sangre y dolor abdominal. La progresión de la enfermedad suele ir acompañada de un aumento de los granulomas y activación de los monocitos, que producen cantidades significativas de eicosanoides y citocinas. Estos síntomas a menudo parecen ser un resultado directo del propio proceso, y con frecuencia varían, dependiendo de la ubicación de la inflamación. Las zonas afectadas típicamente revelan inflamación transmural caracterizada por hiperplasia linfoide, edema submucoso, lesiones ulcerosas y fibrosis. En la figura 1 podemos ver las características de las zonas afectadas. La enfermedad se caracteriza por ataques imprevisibles de inflamación (recaída) seguidos de periodos de remisión clínica. En consecuencia, el tratamiento se dirige, principalmente, a reducir la inflamación durante la recaída y alcanzar esta remisión de los síntomas clínicos y, secundariamente, a prolongar esta fase lo máximo posible (1).



Figura 1: Características de las zonas afectadas.

La incidencia y prevalencia de la EII ha aumentado en las últimas décadas. En Estados Unidos se estima que afecta a 1.4 millones de personas, mientras que en Europa la cifra aumenta a 2.2 millones de personas (2). En España, la prevalencia de la EII oscila entre 200 y 250 casos por 100.000 habitantes, siendo la colitis ulcerosa 2 veces más frecuente que la enfermedad de Crohn (3).

La EII engloba tres tipos de patologías, enfermedad de Crohn (EC), colitis ulcerosa (CU) y colitis indeterminada (CI), de las cuales las más estudiadas y en las que nos vamos a centrar son la EC y la CU.

La CU comienza en el recto y generalmente se extiende proximalmente de forma continua a través del intestino, colon y recto. La distribución de la enfermedad se clasifica por el grado de implicación colónica, desde proctitis a colitis del lado izquierdo o colitis extensa (pancolitis) (4).

En cambio, la EC afecta a cualquier segmento del tracto gastrointestinal (desde la boca hasta el ano y más frecuentemente al íleo terminal o a la región perianal) y

ocurre de manera discontinua. Con frecuencia se presenta con dolor abdominal, fiebre y signos clínicos de obstrucción intestinal o diarrea con sangre, moco o ambos y además presenta complicaciones tales como estructuras, absesos y fistulas perianales (5). Las diferencias en cuanto a la localización se pueden observar en la figura 2. Además la CU puede distinguirse histológicamente de la EC por la presencia de inflamación localizada en la capa superficial de la mucosa y epitelio de revestimiento (6).

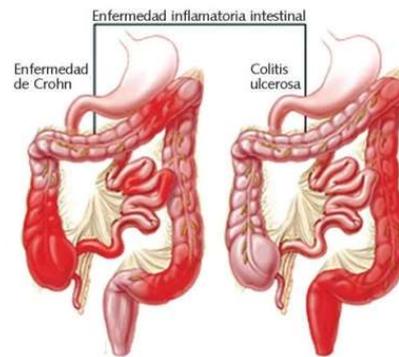


Figura 2: Localización de la inflamación en EC y CU en el colon (7).

La etiología de la enfermedad inflamatoria intestinal es desconocida, pero parece ser el resultado de una combinación de factores genéticos, ambientales e inmunológicos, y además juega un papel importantísimo la microbiota intestinal, que origina una respuesta inmunitaria descontrolada dentro del lumen intestinal, causante de la inflamación (figura 3).

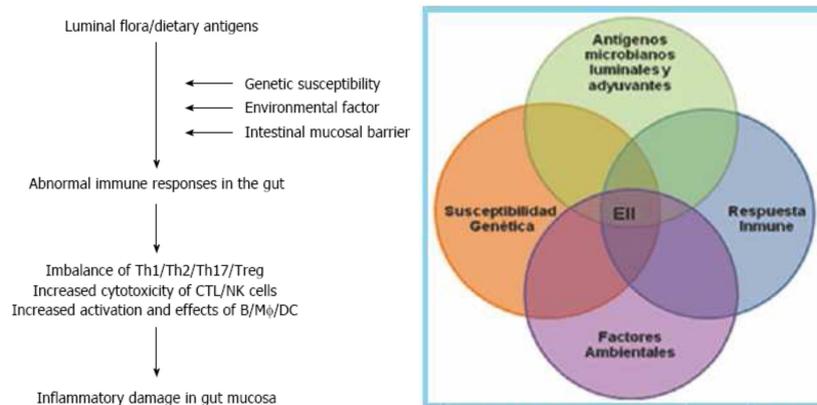


Figura 3: Patogénesis de la enfermedad inflamatoria intestinal.

1. Factores genéticos

La EII se desarrolla en individuos genéticamente susceptibles, por lo que es importante el estudio de los genes y loci genéticos implicados. Hay varias vías cruciales para la homeostasis intestinal, incluyendo la función barrera, la restitución epitelial, la defensa microbiana, la regulación de la respuesta inmune innata, la generación de especies reactivas del oxígeno, la autofagia, la regulación de la inmunidad adaptativa, el estrés del retículo endoplásmico y las vías metabólicas asociadas con la homeostasis

celular. Los primeros estudios revelaron la existencia de alelos tanto protectores como que predisponen al huésped. Sin embargo, cuando se estudiaron conjuntamente varios factores de riesgo, se aclararon las distintas vías biológicas importantes en la enfermedad.

Más del 50% de los loci de susceptibilidad de la enfermedad inflamatoria intestinal también se han asociado con otras enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Estos genes superpuestos pueden tener efectos contrastados en diferentes enfermedades. En consecuencia parece que la clave para comprender la biología de la enfermedad puede residir en la comprensión de la función de estos genes compartidos. Las variantes genéticas asociadas con la EII pueden variar en frecuencia dependiendo de la etnia, incrementando la posibilidad de que algunas de estas variantes pueden haber surgido en el contexto de presiones históricas selectivas como bien explican Khor et al. y Milhailov en sus respectivos trabajos (8,9).

Se han ido identificando algunas regiones cromosómicas compartidas, en las que se sospecha que puedan estar localizados genes cuya mutación propiciaría el desarrollo del proceso. Estas regiones se han denominado con las siglas IBD (inflammatory bowel disease) y un sufijo numérico correlativo, de acuerdo con el orden cronológico de descubrimiento. Así, se han localizado las regiones IBD1 (cromosoma 16q); IBD2 (cromosoma 12q); IBD3 (cromosoma 6p); IBD4 (cromosoma 14q); IBD5 (cromosoma 5q); IBD6 (cromosoma 19p) e IBD7 (cromosoma 1p). Es interesante señalar que aunque estos hallazgos son importantes, hay que reconocer que en cada una de estas regiones IBD pueden situarse centenares de genes candidatos a desarrollar una función patogénica (3).

En la región IBD1 se ha identificado el primer gen relacionado con la susceptibilidad de presentar EC. Se trata del llamado gen NOD2 (nucleotide oligomerization domain 2) actualmente rebautizado como CARD 15 (caspase recruitment domain 15). En condiciones normales, este gen codifica la síntesis de una proteína que actúa como receptora citosólica de peptidoglucanos bacterianos a través de su componente MDP (zona biológica activa), en células del sistema inmunitario innato (macrófagos y células dendríticas). Cuando se presenta una mutación de este gen, el riesgo de tener una EC es de 2 a 3 veces lo normal; pero este riesgo sube de 20 a 40 veces cuando se presentan 2 mutaciones.

Sin embargo, son necesarias otras anomalías genéticas y, sobre todo, el efecto de factores ambientales, para poner en marcha el proceso inflamatorio de la EC, ya que estudios epidemiológicos confirman que se está ante un acontecimiento mutacional con poca penetrancia (prevalencia menor al 10%).

En el año 2004, se descubrió que 2 variantes funcionales de los genes OCTN (organic cation transporter) 1 y 2, se asocian a un aumento en la susceptibilidad de tener una EC en individuos que presentan mutaciones en dichos genes, que afectan a la transcripción y función de las proteínas transportadoras de cationes orgánicos. En el

mismo año 2004, se identificó un tercer gen, el DLG5 que en condiciones normales codifica la síntesis de una proteína que asegura el andamiaje celular y que parece ayudar a mantener la integridad epitelial. Se han encontrado variaciones mutacionales de este gen en el 10% de los pacientes afectados de EC.

Igualmente, la proteína codificada por el gen MDR1 (multi drug resistance gene 1) actúa con frecuencia como un transportador que rige el flujo transmembranario de fármacos en las células, cuya mutación parece comportarse como un factor de susceptibilidad de la CU.

En la región IBD3 están situados los genes que codifican la síntesis de los HLA (antígenos de histocompatibilidad) de clase II y los de la superfamilia TNF (factor de necrosis tumoral) cuya mutación no parece muy consistente con el desarrollo de EII.

El gen NOD1/CARD4, codifica la síntesis de una proteína que se comporta normalmente como un receptor citosólico con función parecida a la del receptor NOD2. También su mutación se asocia a un incremento de susceptibilidad de presentar tanto EC como CU.

La identificación de loci de riesgo específicos para la CU, como el hepatocito factor nuclear-4 α , CDH1 y laminin- β 1, enfatiza el papel de una función barrera defectuosa en la patogénesis de la enfermedad. Una mutación en la proteína E-cadherina es el primer documento genético que correlaciona el cáncer colorrectal y la colitis ulcerosa como explican Ordás et al. en su trabajo publicado en *The Lancet* (4).

En los últimos 3 o 4 años, el conocimiento creciente del genoma humano (Human Genome Project), junto con la puesta a punto de una tecnología de genotipaje de “alto rendimiento”, está permitiendo realizar investigaciones genéticas a gran escala. Así, se están descubriendo con gran rapidez qué polimorfismos o variantes genéticas se asocian a un cierto riesgo de presentar enfermedades de etiología compleja (poligénica y ambiental), como el asma, la diabetes, el cáncer, la cardiopatía isquémica y, por supuesto, la EII. Se está haciendo referencia a los programas de investigación conocidos como GWAS (Genome-wide association studies), que posiblemente conducirán a dibujar la “arquitectura genética” de procesos tan complejos como la EII. De hecho, con estos programas, además de confirmar el papel de susceptibilidad de algunos polimorfismos genéticos identificados en la era previa (genes NOD2/CARD15, DLG5, etc.), se han descubierto otras nuevas asociaciones. Con ellos también se han identificado 99 loci de susceptibilidad de genes no superpuestos (figura 4) (8). Por el momento, se han asociado 47 loci con la colitis ulcerosa, incluyendo 20 que se entrelazan con la EC, como las interleucinas, IL 23 e IL 10. Para la EC se han identificado 71 loci.

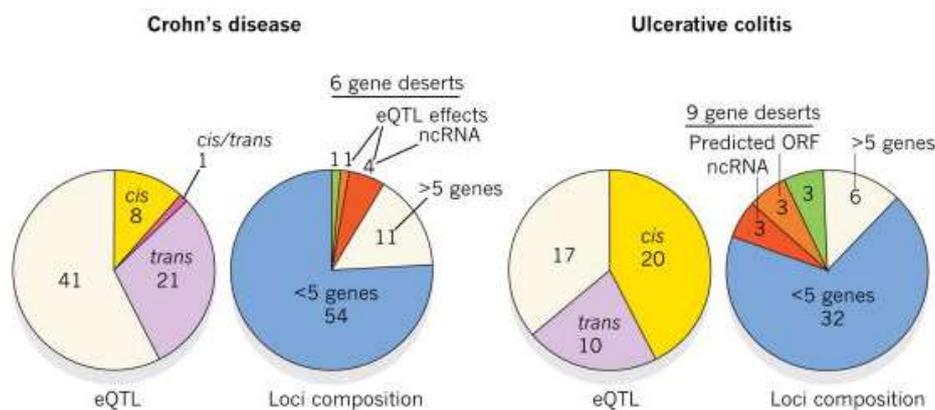


Figura 4: Loci de susceptibilidad (8).

Entre estos nuevos genes descubiertos con la tecnología GWAS implicados en la EC, se encuentran: el gen TNF-SF15, el gen IL-23R, los genes implicados en la autofagia y así hasta más de 30 genes.

Por último es destacable que con la tecnología GWAS se están empezando a localizar algunos polimorfos que podrían actuar como inductores selectivos de la CU en el cromosoma 1p36 (en los genes OTUD3 y PLA2G2E) y del cromosoma 12q15 (genes de las IL- 22, IL-26 y del IFN-g) (3).

2. Factores ambientales

Los factores ambientales juegan un papel muy importante en el desarrollo de la EII como demuestra la gran variabilidad hallada según la localización geográfica. Existe un gradiente de norte a sur, encontrándose los valores más elevados de incidencia y prevalencia en América del Norte y Europa del Norte, mientras que los más bajos se encuentran en América del Sur, sudeste de Asia, África (excepto Sudáfrica) y Australia. La mayor incidencia y prevalencia podría deberse a que en esas zonas existe una mayor atención sanitaria, de más fácil acceso y mayor calidad, además de diferentes grados de industrialización, saneamiento e higiene (teoría de la higiene). Por el contrario, las zonas con índices más bajos se corresponden con los países en desarrollo.

Respaldando esta teoría, existen varios estudios en Norteamérica y Europa en los que se observa un mayor número de casos de EII en zonas urbanas en comparación con las zonas rurales. Kappelman et al. (10) realizan un estudio en el que comparan la prevalencia de CD y UC en una población estadounidense asegurados para comparar las características socioeconómicas y de edad. Han et al. (11) también realizan un estudio casos-contróles de los factores de riesgo existentes en la población de Nueva Zelanda tales como tabaquismo, uso de antibióticos, toma de anticonceptivos orales, dar el pecho y los hábitos en una vida saludable. Y también, aunque las diferencias pudieran deberse al origen genético de los individuos de cada país, diversos estudios han encontrado una mayor incidencia de EII en inmigrantes procedentes de regiones caracterizadas por índices más bajos de incidencia y prevalencia.

Además de esta variabilidad geográfica, contribuye igualmente el estilo de vida tal y como explican Neuman y Nanau (2) en su trabajo sobre el papel de la dieta, la microbiota y el estilo de vida en el desarrollo de la EII (12,13). La tradicional baja incidencia de la EII y otros desordenes inflamatorios crónicos en los países en desarrollo, que ahora está en aumento, podría estar relacionada con los cambios socioeconómicos, que además afectan a la higiene. Por ejemplo, la industrialización ha afectado considerablemente a la vida de las personas, con un enfoque en sus carreras y educación superior, eventos más adversos en la vida, menos mujeres amamantando, familias más pequeñas con menos condiciones de hacinamiento en la vivienda, mejor higiene doméstica y saneamiento, la disponibilidad y calidad del agua potable y caliente, la adopción de un estilo de vida sedentaria, la exposición a la contaminación del aire, consumo de una dieta occidental cargada con alimentos de conveniencia (a menudo contiene cantidades excesivas de azúcar y grasas poliinsaturadas); que contribuyen a un mayor riesgo de desarrollar EII, particularmente la EC. Un saneamiento excesivo podría limitar la exposición a los antígenos del medio ambiente y deterioran la maduración funcional del sistema inmune de la mucosa y la inducción de tolerancia inmunológica, cuyo resultado final es una inadecuada respuesta inmune cuando se exponen nuevamente a estos antígenos más adelante en la vida. La lactancia materna confiere inmunidad mientras todavía se está desarrollando el sistema inmune intestinal del niño (3 meses como mínimo) (4,5,14).

Ciertos acontecimientos adversos de la vida, como el estrés crónico y la depresión, parecen aumentar la probabilidad de recaída en pacientes con enfermedad en fase de remisión. En estos casos parece que se da una implicación directa entre el sistema nervioso y el inmunitario.

Parece ser que el tabaco agrava el curso de la EC, ya que promueve la formación de fístulas y estenosis, aumenta la tasa de exacerbaciones y la necesidad de corticosteroides y acelera la necesidad de cirugía después de una remisión quirúrgica inducida. Los efectos perjudiciales de la nicotina en la EC parecen estar relacionados con una mayor afluencia de neutrófilos en la mucosa intestinal. Dejar de fumar por tanto parece ser una intervención terapéutica eficaz en EC. Ocurre todo lo contrario en la CU, donde el tabaco parece jugar un papel protector que parece deberse al aumento de la producción de moco, a la disminución de la producción de citoquinas proinflamatorias y óxido nítrico y a la mejora de la función de la barrera intestinal (12,15).

Los datos de tabaquismo pasivo son contradictorios, con algunos informes que demuestran una reducción del riesgo de la CU cuando se expone al humo en la infancia y otros resultados que tal exposición aumenta el riesgo de tener CU y EC.

Por otra parte, la EII es más frecuente después de infecciones gastrointestinales, ya que se tiene una microbiota distinta. A menudo se tienen más especies adhesivas que pueden provocar el inicio del proceso inflamatorio crónico en individuos que por supuesto tienen una predisposición genética (para la CU se duplica el riesgo de

desarrollarla). Estudios en animales han hecho suponer que la EC podría estar causada por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* debido al parecido de la ileitis granulomatosa de la EC con la enfermedad de Johne que es causada por esta bacteria. El *M. avium paratuberculosis* se detecta en tejidos y sangre de pacientes con EII; las personas afectadas generalmente tienen mayores concentraciones de bacterias en la mucosa que personas sanas y además aumenta progresivamente con la severidad de la enfermedad en el colon.

Así mismo, un estudio epidemiológico realizado por Koutroubakis et al. sugiere que la apendicectomía podría ser protectora contra la CU, ya que se redujeron significativamente los riesgos de colectomía o la necesidad de la terapia inmunosupresora en pacientes intervenidos antes del diagnóstico. Sin embargo ocurre lo contrario en la EC, ya que esta técnica parece estar asociada con un riesgo creciente de desarrollar estenosis. Estos resultados tan contrastantes podrían deberse al uso de los microbios por el sistema inmune de la mucosa, a la hipótesis de la higiene y a la imposibilidad de desarrollar tolerancia inmunológica después de una apendicectomía (16,17).

En cuanto a la incidencia de la terapia farmacológica, existe una asociación más o menos importante entre la EII y el uso de anticonceptivos o de antiinflamatorios no esteroideos (11,13,18).

3. Factores inmunológicos

Muchos de los genes de susceptibilidad de la EII identificados recientemente (figura 5), están asociados con una ruptura de la regulación inmune en la patogénesis de la EII: la función de la barrera epitelial, las respuestas inmunitarias (ej. Inmunidad innata, ruta IL-23/Th 17) y respuestas celulares (ej. Autofagia, estrés del retículo endoplasmático). En un trabajo relativamente reciente de Hisamatsu et al. se explica la ruptura de la homeostasis que origina la EII (19).

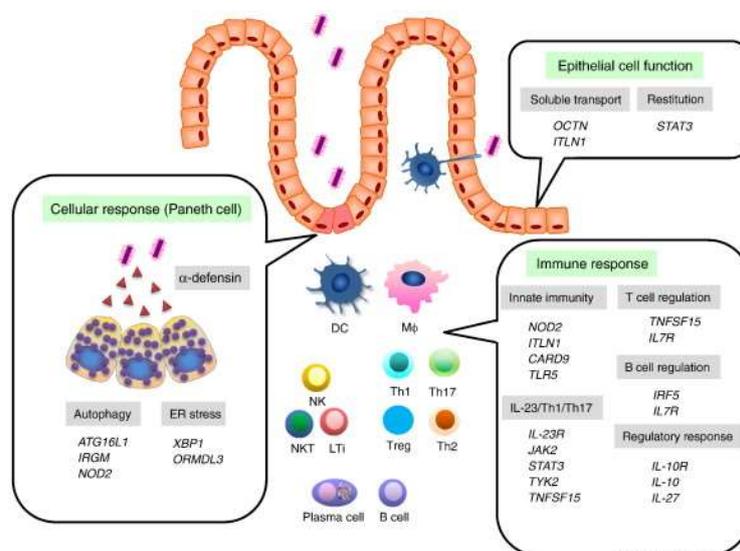


Figura 5: Genes susceptibles en la inmunopatogénesis de EII (19).

En condiciones normales, esta respuesta inmunológica protege contra antígenos presentes en la luz intestinal, pero también induce mecanismos de tolerancia que mantienen la homeostasis inmune en el intestino.

La mucosa intestinal está en equilibrio funcional con el lumen intestinal, que está dominado por un espectro de especies microbianas y sus productos. Este equilibrio funcional es fundamental para preservar la fisiología normal de la mucosa (figura 6), ya que su alteración contribuye a la fisiopatología de muchos trastornos gastrointestinales, incluyendo la EII. Además de la absorción de nutrientes, las células epiteliales intestinales realizan funciones de barrera, así como funciones de transducción de señales, con capacidad para detectar componentes del contenido luminal a través de receptores de superficie y segregar productos reguladores que pueden originar una respuesta apropiada en la lámina propia subyacente (8).

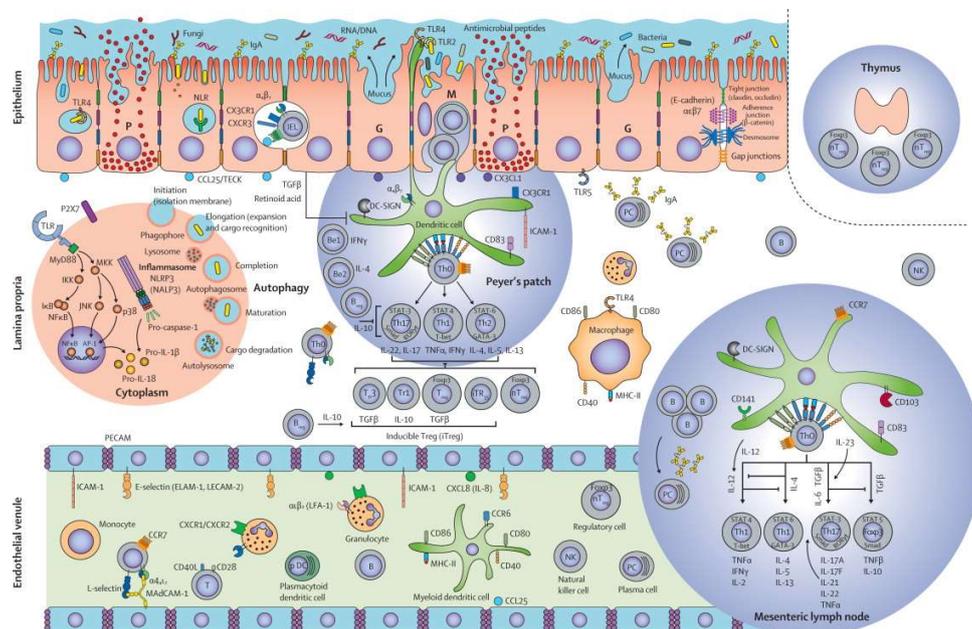


Figura 6: Sistema inmune del intestino delgado sano (5).

Está claro que la respuesta inmune es el principal factor biológico en la inducción y mantenimiento de la inflamación intestinal en la EII. El sistema inmune es el responsable final del daño tisular, a través de la acción de múltiples líneas celulares y mediadores solubles (20). Podemos distinguir varias respuestas del sistema inmune: innata, adaptativa y una respuesta celular.

El sistema inmune innato (figura 7) proporciona inmunidad en los primeros minutos a horas después de la infección. En cambio, la inmunidad adaptativa es mediada por linfocitos T y B que proliferan clonalmente en respuesta a un antígeno específico, esta respuesta requiere un par de días a través de la generación de linfocitos T y B de memoria.

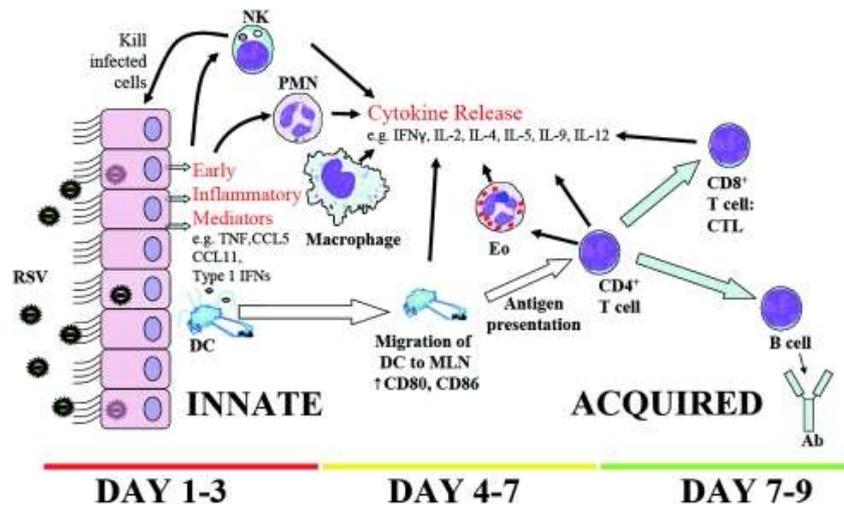


Figura 7: Respuestas inmunes innata y adaptativa a la exposición a un antígeno exógeno (21).

La *respuesta inmune innata* es inespecífica y no confiere inmunidad duradera (memoria), representando nuestra primera línea de defensa frente a los patógenos (figura 8). Se compone de células inmunes: macrófagos y células dendríticas, así como células epiteliales intestinales y miofibroblastos, que pueden reconocer secuencias de la pared bacteriana de la microbiota intestinal (“pattern recognize receptors”: receptores “toll-like”/proteínas NOD 2) y responder a características estructurales de algunos microorganismos. Esto permite la iniciación rápida y eficaz de respuestas inflamatorias contra la invasión microbiana. Además, las células dendríticas presentan antígenos a linfocitos T CD4⁺ que desencadenan la respuesta inmune adaptativa.

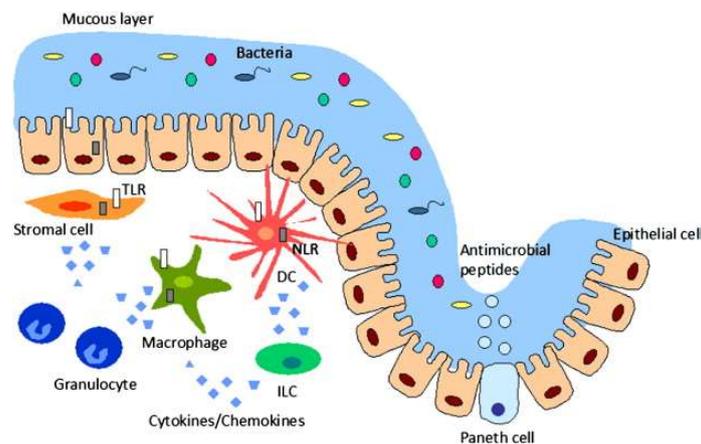


Figura 8: Respuesta innata en el intestino (22).

La primera barrera física que las bacterias intestinales y antígenos alimentarios se encuentran en el intestino, es la capa mucosa que cubre el epitelio intestinal, cuya zona más interna está en contacto con el epitelio intestinal, que forma la segunda línea de defensa y que está compuesto por enterocitos y células epiteliales especializadas, tales como las células caliciformes y células de Paneth, dispuestas muy unidas entre sí formando las llamadas uniones estrechas (“tight junctions”) que mantienen la integridad de la barrera epitelial.

En pacientes con EC y CU se observa una barrera epitelial defectuosa y un aumento prolongado en la permeabilidad intestinal, aunque no está claro si estas alteraciones representan la causa o la consecuencia de la inflamación crónica. Podemos ver un esquema de esta barrera defectuosa en CU y EC en las figuras 9 y 10, respectivamente.

En la CU disminuye la síntesis y se altera la sulfatación de mucina 2 (MUC2), una mucina colónica. Los daños a la barrera epitelial conducen al aumento de la permeabilidad, posiblemente debido a la defectuosa regulación de las uniones estrechas, captando un mayor número de antígenos luminales. Los macrófagos y células dendríticas cambian su estado funcional de tolerancia a un fenotipo activado, resultando en el aumento de la producción de citocinas proinflamatorias (4).

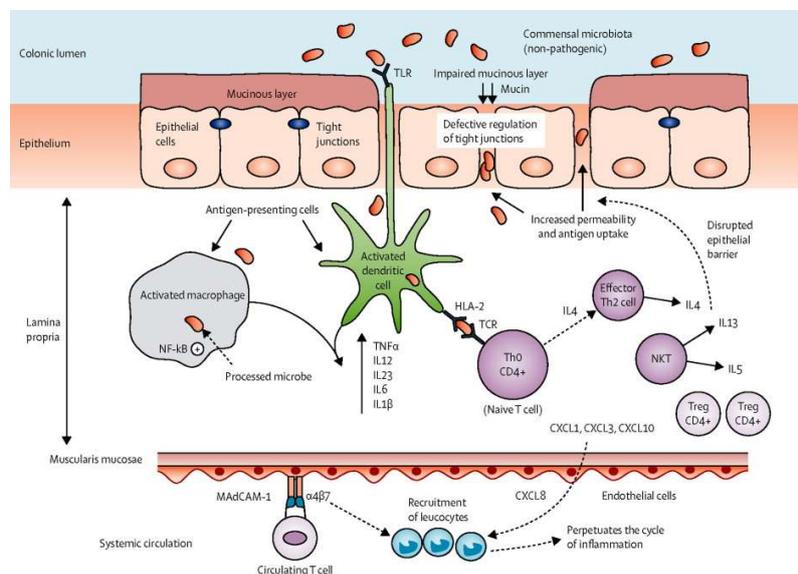


Figura 9: Sistema inmune en CU (4).

En la EC la cubierta de moco se vuelve insuficiente debido a una disminución de la expresión del gen MUC1 que se aprecia en el íleo terminal inflamado. Las uniones estrechas que normalmente se encontraban bloqueadas, se vuelven permeables, debido posiblemente a cambios en la expresión de proteínas de estas uniones, resultando en un aumento de la permeabilidad y el acceso de los antígenos luminales a la lámina propia. Estos defectos en la permeabilidad se encuentran en parientes de primer grado, clínicamente sanos, de pacientes con EC que tienen una mutación en NOD2 (5).

Además de formar una barrera física contra la invasión bacteriana, las células epiteliales pueden segregar agentes bactericidas como α -defensinas y β -defensinas (producidas por las células de Paneth y las células epiteliales respectivamente), que limitan la invasión bacteriana (22). En la CU se aprecia un aumento en la expresión de β -defensinas que no está claro si es inducido en respuesta a microorganismos, a las citoquinas inflamatorias o a ambos.

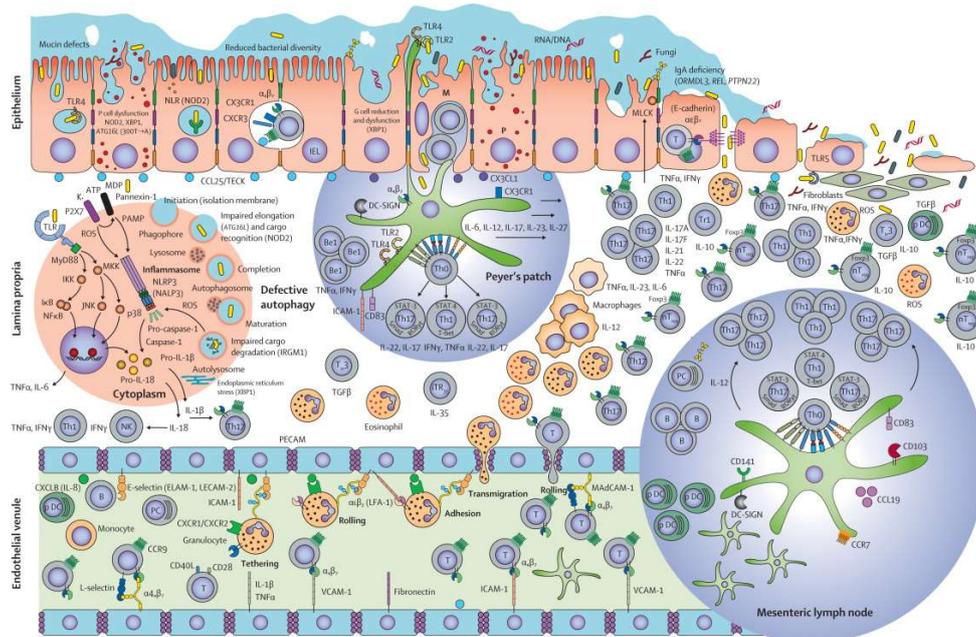


Figura 10: Sistema inmune intestinal en EC (5).

La respuesta inmune adaptativa (figura 11), al contrario que la innata, es muy específica, confiere inmunidad duradera y adaptabilidad ya que la especificidad por el antígeno es el resultado de una compleja maduración y desarrollo de las células inmunitarias. Los protagonistas de la respuesta inmune adaptativa son las células T o linfocitos T de memoria. Las células T CD4+ (Th0) pueden activarse y diferenciarse hacia linfocitos reguladores (Treg) o efectoras, “helper” (Th1, Th2 o Th17), que migran hacia la lámina propia, donde conducen a una inflamación por liberación excesiva de citocinas y quimiocinas que tienen múltiples efectos patógenos en la rama adaptativa e innata del sistema inmunitario (1).

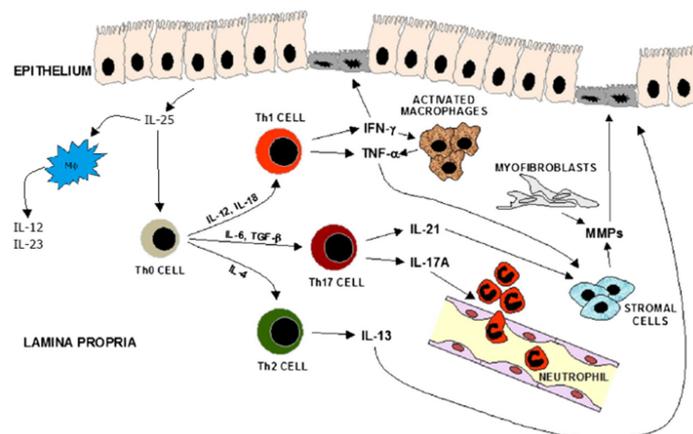


Figura 11: Respuesta adaptativa en el intestino.

Factores como el fenotipo de las células presentadoras de antígenos, las citocinas presentes en el medio, factores microbianos o alteraciones metabólicas, modulan la diferenciación hacia células Treg, que segregan interleucinas antiinflamatorias o hacia células T efectoras. La inflamación se puede explicar por un desequilibrio entre las células efectoras y las reguladoras; si hay un exceso de las primeras, se origina una

sobreproducción de citocinas proinflamatorias, mientras que un exceso de células reguladoras da lugar a un estado de tolerancia inmunológica y anergia.

Clásicamente, parece que en la EC hay una activación de linfocitos Th1 (dirigidas fundamentalmente por la exposición a IL-12, IL-18 o IL-23), mientras que en la CU se activan los Th2 (caracterizado por la producción de IL-4, IL-5 e IL-10). Sin embargo, en los últimos años se han descrito nuevos mecanismos fisiopatológicos que sugieren un complejo solapamiento entre ambas enfermedades, a través de la activación de linfocitos Th17.

Otras citocinas proinflamatorias importantes en la patogénesis de la EII son la IL-17, IL-12 e IL-23. IL-23 desempeña un papel crítico en el mantenimiento de la respuesta inmune, ya que controla la función de memoria de las células T (promueve que células T CD4+ de sangre periférica y de la lámina propia se diferencien en células Th17) y además influye en la proliferación y producción de IL-17 por las células Th17. A modo de ejemplo, en la figura 12 podemos ver de forma esquemática cómo la sobreexpresión de IL-23 en la mucosa intestinal disminuye la barrera defensiva en el intestino y perturba la regulación inmune local (IL-10 y Treg). IL-10 es una citocina importante en la inducción de la respuesta Th2 que desempeña un papel crucial en la inmunidad adaptativa mediante la inducción de anticuerpos específicos para eliminar las nuevas invasiones de bacterias y la absorción de productos bacterianos. IL-10 es también una de las citocinas reguladoras inmunes más eficaces que contribuye al mantenimiento de la homeostasis del organismo (4).

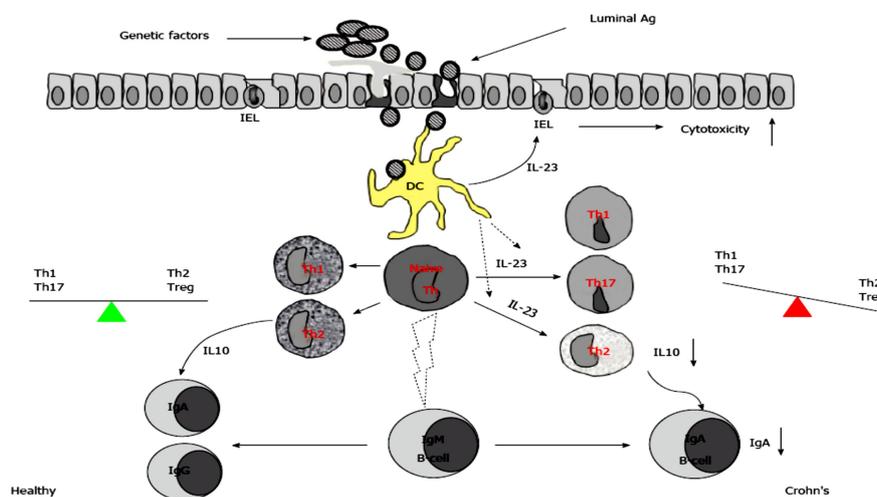


Figura 12: Sobreexpresión de IL-23 en mucosa inflamada de pacientes con EII.

La *respuesta celular* comprende varios mecanismos tales como: autofagia y el estrés del retículo endoplásmico (RE). La autofagia es un mecanismo para mantener la homeostasis celular y significa "comerse a sí mismo". Mientras que la apoptosis es un camino hacia la muerte celular, la autofagia participa en el reciclaje de orgánulos celulares para la supervivencia celular. La autofagia también se considera que es importante para la defensa del huésped frente a microorganismos intracelulares. El gen ATG16L1 está situado en el cromosoma 2q37.1 y codifica una proteína que interviene

en la resistencia contra microorganismos intracelulares, tales como bacterias y partículas virales. Se asocian estos genes de la autofagia con EC, ya que en esta enfermedad existe una función anormal de eliminación y una respuesta inmune innata a patógenos intracelulares. Otra posible contribución patógena de una mutación del ATG16L1 se asocia con la función de células de Paneth y su diferenciación. En una investigación llevada a cabo por Thachil et al., utilizando biopsias intestinales de pacientes pediátricos con EC, demostraron que se activa específicamente la autofagia en las células de Paneth, y que esta activación está vinculada a una disminución significativa del número de gránulos secretores; además ocurre independientemente de las variantes ATG16L1 o IRGM, que están asociadas con CD (23). La mutación de ATG16L1 puede provocar respuestas celulares anormales en la EC.

La respuesta de proteínas mal plegadas o desplegadas ha sido identificada como un camino crítico en el mantenimiento de la homeostasis celular. La síntesis de proteínas de *novo* ocurre en el retículo endoplásmico (ER) y posteriormente las proteínas plegadas son transportadas al aparato de Golgi. Sin embargo, en el caso de las proteínas mal plegadas o desplegadas son almacenadas en el ER. La acumulación excesiva de estas proteínas estructuralmente anormales causará estrés en el ER en células calciformes secretoras y células de Paneth y finalmente induce la muerte celular apoptótica y puede causar varias enfermedades degenerativas e inflamatorias, entre las que se encuentra la EC (19).

4. Microbiota

La microbiota intestinal tiene un papel fundamental en el desarrollo y posterior modulación de la respuesta inmune y en la metabolización de nutrientes. Múltiples estudios genéticos, inmunológicos y microbiológicos han destacado la importancia de la composición de la microbiota y la modificación de sus interacciones con el huésped en la patogénesis de la EII (24,25).

En los seres humanos, la composición de la microbiota en un mismo individuo es estable y diferente entre el estómago, partes superior e inferior del intestino delgado, colon transverso y recto. Por otra parte, la microbiota presente en las heces (microbiota fecal) también es distinta a la que hay en la mucosa o zona intraepitelial. Esto es importante tenerlo en cuenta ya que la microbiota residente tiene un papel fundamental en la modulación de la respuesta inmune del intestino, así como en la iniciación y la perpetuación de la EII (26,27).

La *microbiota intestinal normal (intraepitelial)* se compone de 10^{14} bacterias pertenecientes a cuatro principales *phyla* de bacterias: *Firmicutes* (principales grupos filogenéticos: *Clostridium coccoides* y *Clostridium leptum*), *Bacteroidetes* (Grupo *Bacteroides-Prevotella*), *Actinobacteria* y *Proteobacterias*. Es frecuente encontrar una composición específica para cada individuo, aunque algunas especies son particularmente habituales entre los adultos sanos, lo que induce a pensar que hay una base filogenética. A nivel funcional, existe un núcleo del microbioma intestinal con

genes bacterianos involucrados en funciones fisiológicas del hospedador compartidas por la mayoría de los individuos (28).

Las bacterias comensales, gracias a una larga coexistencia, consiguen mantener la homeostasis en la mucosa, mientras que las patógenas suelen romperla, apareciendo principalmente una invasión bacteriana que provoca un proceso inflamatorio agudo destructivo desencadenante de una respuesta inmune humoral (respuesta inmune mediada por linfocitos B o anticuerpos) (29).

Sin embargo, en la inflamación intestinal crónica, esta homeostasis parece interrumpirse, y la microbiota comensal actúa como un patógeno bacteriano sustituto (30). La composición normal de la microbiota sufre una modificación, llamada disbiosis, que se caracteriza por una total disminución de la biodiversidad, una baja estabilidad, una disminución de las bacterias del phylum *Firmicutes* (en particular de la *C. leptum* y grupos de *C.coccoides*), un número creciente de enterobacterias y por la presencia de bacterias inusuales. Algunas características de la disbiosis parecen ser específicas de cada tipo de EII (EC o CU), mientras que otras son compartidas por todas las formas y probablemente también por otras patologías inflamatorias gastrointestinales como la colitis aguda autolimitada (31).

La *microbiota fecal* de pacientes con EC y CU difiere también de la de sujetos sanos. Bibiloni constató el predominio de especies sin clasificar del filo *Bacteroidetes* en ambos tipos de EII (32).

Por otra parte, se ha comprobado una gran biodiversidad en la microbiota fecal de pacientes con EC, siendo significativamente mayor el número de enterobacterias en las heces de pacientes con EC que en individuos sanos.

Rath et al. revelaron un efecto importante, aunque complejo, de la microbiota fecal en la fase aguda así como en la crónica de la colitis experimental, lo que corrobora las hipótesis siguientes (33):

- (i) Las bacterias lumbales normales son necesarias para el desarrollo de la inflamación intestinal crónica mediada por una respuesta inmune.
- (ii) Las especies bacterianas entéricas comensales tienen capacidades proinflamatorias desiguales, siendo algún ser más agresivo que otros.
- (iii) Las distintas bacterias endógenas tienen diferentes funciones en el proceso inflamatorio. Algunas (incluyendo *Bacteroides spp.* y otras), preferentemente inician la inflamación, mientras que otras, de mayor espectro, perpetúan la enfermedad.
- (iv) Una reducción inicial de la carga bacteriana total con una combinación de antibióticos de amplio espectro altera la composición bacteriana con un efecto prolongado en la inflamación intestinal, aunque la concentración luminal total se recupera rápidamente.

En cuanto a la *microbiota asociada a la mucosa*, en la EII se encuentran bacterias con efecto inflamatorio y otras con un papel protector, aunque todavía se desconoce cómo realizan ese papel. Debido a que la EII es un trastorno de la inflamación de la mucosa, la microbiota asociada a la mucosa va a tener particular relevancia para el transcurso de la enfermedad.

Hay más bacterias facultativas en biopsias colónicas de pacientes con EC que en las de individuos controles sanos. En intestino delgado de pacientes con EC hay un aumento del subgrupo *Ruminococcus gnavus* y una disminución de los subgrupos *Clostridium leptum* y *Prevotella nigrescens*, lo cual sugiere que la enfermedad no es causada por patógenos invasivos relacionados específicamente con los sitios de las lesiones, aunque existe esta disbiosis. También se localizan un mayor número de bacterias aerobias y facultativas anaerobias asociadas a la mucosa en las muestras de biopsia de niños con EII, frente a las de los controles. Además, Ott confirmó una disminución general de algunas especies bacterianas o grupos pertenecientes a la flora intestinal normal anaerobia, en particular *Bacteroides vulgatus*, lo cual pone de manifiesto la importancia de dichas bacterias y, también identificaron diversos taxones específicos (34).

En general en la EII se produce una disminución significativa de especies *Bacteroides*, *Eubacterium* y *Lactobacillus*. Esto, junto con un aumento en *E. coli* y *Clostridium*, apoya la hipótesis del desequilibrio funcional, donde el balance del potencial patógeno frente al beneficioso de estas bacterias se rompe en favor del primero. Además, se ha demostrado estadísticamente que antes de que aparezca la inflamación en pacientes con EII, hay un mayor número de especies bacterianas que en individuos sanos, pero cuando aparece la inflamación tisular, disminuye. Esto hace pensar que existe una fase de reclutamiento en la cual las bacterias potencialmente patógenas colonizan los tejidos y una vez que la inflamación se establece, disminuye su diversidad, como efecto complementario al proceso inflamatorio. En consecuencia, el conocimiento de las especies microbianas presentes en el tejido antes de que comience la inflamación, podría informarnos de la patogénesis de la EII y se podría presumir que la alteración de la microflora bacteriana en la inflamación de la mucosa refleja un desequilibrio metabólico complejo del ecosistema microbiano con graves consecuencias para la barrera mucosa, en lugar de una defensa interrumpida sólo a microorganismos.

Por otra parte, los receptores de reconocimiento de patrón microbiano Toll-like (TLRs) juegan un papel muy importante en la defensa de huésped frente a infecciones microbianas. Estos receptores reconocen ligandos microbianos producidos por microorganismos patógenos y por bacterias comensales, siendo cruciales en el mantenimiento de la hemostasis epitelial intestinal. Parece que se evita la respuesta inflamatoria a bacterias comensales debido al secuestro de la microflora por el epitelio superficial. Rakooof–Nahonm et al. (35) muestran además, que la activación de los TLRs por la microflora comensal es crítica para la protección frente a una lesión intestinal y a la mortalidad asociada.

En la EII la biodiversidad de *Lactobacillus* se mantiene alta. En la CU las concentraciones de bacterias anaerobias facultativas aumentan considerablemente y también están presentes *Bifidobacterias* y *Peptostreptococcus*. En la EC el número de *Bifidobacterias* se reduce significativamente pero aumentan las concentraciones de *Bacteroides*, *Eubacterias* y *Peptostreptococcus*.

Además se ha estudiado el papel que ejercen otros tipos de bacterias tales como *E. Coli* (multiplicado en EII), cuyo mecanismo de actuación lo vemos representado en la figura 13. La característica de estas bacterias es su habilidad para adherirse y para invadir las células Caco2 del epitelio intestinal. Ese tipo de cepa con adherencia invasiva de *E. coli* (AIEC) es específica de la mucosa ileal en algunos pacientes con EC.

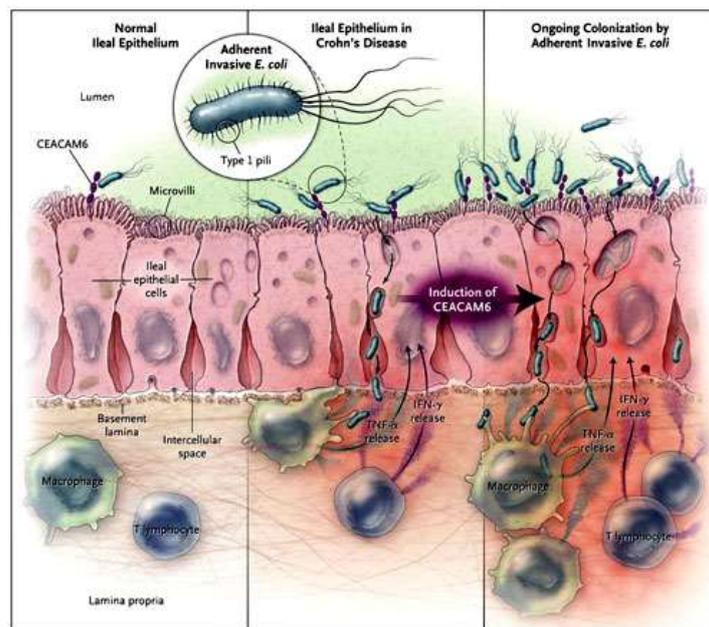


Figura 13: Mecanismo de actuación de *E. Coli*.

Otra bacteria importante es *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP), que durante mucho tiempo se ha sospechado que está implicado en la patogenia de EC. Varios ensayos han demostrado la eficacia de la terapia antimicobacteriana en EC. Un gran ensayo placebo frente controles, a doble ciego, aleatorizado, evalúa la eficacia de una terapia combinada de claritromicina, rifabutina y clofazimina en pacientes en remisión clínica tras ser retirado el corticoesteroide. La proporción de pacientes que recayeron en 1, 2, 3 años no fue significativamente diferente entre el grupo en régimen de antibióticos y el grupo placebo. La tendencia observada en 1 año (39% de recaídas en el grupo de antibióticos frente al 56% en el grupo placebo) se atribuye por los autores a los antibióticos de amplio espectro de actividad contra organismos luminales durante la inducción de la terapia (36,37).

Otras son las bacterias sulfato reductasas (SRB) pertenecientes al género *Desulfovibrio* fundamentalmente, que afectan al 95% de pacientes con CU activa y al 50% de los pacientes en remisión. El metabolismo de estas bacterias produce sulfuro de hidrógeno, altamente tóxico para las células epiteliales colónicas (36).

TRATAMIENTO FARMACOLOGICO DE LA ENFERMEDAD

Actualmente no hay ninguna cura conocida para la enfermedad inflamatoria intestinal y la investigación actual se centra en:

- Alcanzar el periodo de remisión de la enfermedad.
- Mantenimiento de la fase de remisión.
- Controlar los síntomas derivados de la patología, permitiendo así una mayor calidad de vida del paciente.

Podemos decir que nos encontramos ante una enfermedad incurable hoy en día, por lo que los pacientes van a depender toda la vida de la toma de un tratamiento farmacológico.

Existen diferentes tipos de tratamientos para la EII, entre los que podemos destacar antiinflamatorios (aminosalicilatos), glucocorticoides, inmunomoduladores, agentes biológicos (Infliximab), probióticos y antibióticos (38).

1. Antiinflamatorios

Constituyen la terapia de primera línea en la remisión de la CU, actuando por una variedad de mecanismos sobre la liberación de mediadores lipídicos, citocinas y especies reactivas del oxígeno en las células epiteliales. Sin embargo, su papel en la remisión en la EC es controvertido y además se necesita utilizar dosis más altas que las utilizadas normalmente en CU.

Entre los antiinflamatorios más utilizados se encuentra la sulfasalazina, que por acción de las bacterias azo-reductasas presentes en el colon, liberan la molécula activa, mesalamina (ácido 5-aminosalicílico, 5-ASA) y una molécula inactiva, sulfapiridina. Ésta última es absorbida y metabolizada por acetilación o hidroxilación hepática seguida por glucuronización. A pesar de ser una molécula inactiva, tiene efectos secundarios a altas dosis que incluyen dolor de cabeza, náuseas, dispepsia, erupciones cutáneas y fatiga. También inhibe la absorción intestinal de folato, por lo que el folato se ha de administrar como suplemento. Aunque la sulfasalazina y sus metabolitos tienen la capacidad de atravesar la placenta, no han mostrado riesgo fetal (39).

Para evitar los efectos secundarios de la sulfapiridina y mejorar la eficacia terapéutica, se desarrolló olsalazina (Dipentium®). Se trata de dos moléculas de mesalamina unidas por un enlace azo. Más tarde, se desarrolló la balsalazida (Coalazol®, Giazol®) en la cual se utiliza una molécula inerte, 4-aminobenzoyl-β-alanina, unida a la molécula activa.

Con el fin de controlar la liberación de mesalamina en el colon y reducir los efectos secundarios, se han diseñado varias formulaciones con liberación pH

dependiente (Asacol[®], Asacol[®]HD, Apriso[®], Lialda[®], Delzicol[®]) y otras de liberación prolongada a base de recubrimiento con etilcelulosa (Pentasa[®]).

2. Glucocorticoides

Muchos estudios han demostrado la eficacia de la terapia esteroide para inducir la remisión de la EC. Esta terapia se valora según el balance de riesgo-beneficio (efectos secundarios que origina este tipo de terapia frente a los beneficios), por lo que van a utilizarse el menor tiempo posible a fin de reducir los efectos secundarios.

Se han utilizado corticosteroides sistémicos tales como la prednisona, prednisolona y 6-metilprednisolona. Sin embargo, los efectos secundarios (riesgo de infección, disminución de la densidad ósea, Cushing, hiperlipidemia e hiperglucemia, cambios en la piel, cambios psicológicos y trastornos del sueño, miopías, cataratas...) limitan su uso como agentes de primera línea. Se consideran como grado B en la inducción en la EC de leve a moderada tras el fallo de los de primera línea (fármacos derivados de 5-ASA y budesonida). Sin embargo, en la enfermedad de moderada a severa con síntomas sistémicos, es típico comenzar con un esteroide sistémico como prednisona hasta ver una respuesta, y continuar con una dosis de mantenimiento inferior de forma crónica.

La budesonida es un esteroide de acción local que representa una alternativa a los agentes sistémicos. Sufre un extenso metabolismo de primer paso hepático, reduciendo el riesgo de efectos secundarios. Un metanálisis ha demostrado que la administración de budesonida y derivados de 5-ASA inducen la remisión frente a la administración de un placebo. Además, datos recientes sugieren que la budesonida puede ser casi tan eficaz como los esteroides sistémicos para conseguir la remisión en la EC de leve a moderada durante un periodo de 3 a 6 meses (38).

Cabe destacar que un numeroso grupo de pacientes que responden inicialmente a la terapia esteroide experimentan una recaída al cesar el tratamiento. Normalmente responden y consiguen nuevamente la inducción al administrar otro ciclo y son capaces de permanecer en remisión con terapia esteroide a largo plazo. Estos pacientes están etiquetados como “esteroide-dependiente” y aquellos que no responden, se denominan “resistentes a esteroides”. En estos últimos, los inmunomoduladores son útiles para evitar la activación, pudiendo reducir la dosis necesaria de esteroide. Tengamos en cuenta que la recomendación para prevenir efectos secundarios, es minimizar el uso de esteroides a toda costa y evitarlos completamente si es posible (38).

3. Inmunomoduladores

Estos fármacos, desarrollados inicialmente como agentes anticancerígenos se utilizan en el tratamiento de la EII en los pacientes que no responden a los esteroides y los aminosalicilatos o en aquellos en los que aparecen las recaídas cuando se retiran los esteroides. Aunque tienen efectos secundarios significativos, son más seguros y mejor

tolerados que los corticosteroides a largo plazo. No obstante, antes del inicio de la terapia, se deben discutir con el paciente los efectos secundarios y otras alternativas, especialmente el aspecto del riesgo costo-beneficio.

Entre ellos encontramos Azatiopirina y 6-mercaptopurina que son fármacos citotóxicos útiles en el tratamiento de la EC pero su papel en la CU está menos claro. La azatiopirina se convierte en 6-mercaptopurina por un metabolismo de enzimas hepáticas, que además se metabolizan en nucleótido de 6-tioguanina. Estos metabolitos inhiben la biosíntesis de purinas y a su vez la proliferación de células T. Los efectos secundarios más comunes incluyen dolor de cabeza, mialgia, náuseas y diarrea. La leucemia también se ha desarrollado repentinamente en algunos pacientes.

El metotrexato se utiliza como fármaco antirreumático en el tratamiento de la artritis reumatoide y es eficaz en la inducción de la remisión o para prevenir una recaída la EC, particularmente en aquellos que son refractarios o intolerantes a azatiopirina o 6-mercaptopurina. Muestra su actividad antiinflamatoria inhibiendo la reductasa del dehidrofolato que a su vez bloquea la síntesis de ADN y finalmente lleva a la muerte celular. Entre los efectos secundarios se incluyen náuseas, vómitos, diarrea, estomatitis, leucopenia o neumonitis, que generalmente se deben a una sobredosis.

Además, en pacientes refractarios a la terapia corticoesteroides, se utilizan ciclosporina (impide la formación de linfocitos citotóxicos) y tacrolimus, similar pero con mayor biodisponibilidad que la ciclosporina por vía oral (39).

4. Agentes Biológicos

En los últimos 15 años se ha desarrollado una nueva terapia con agentes biológicos.

Infliximab (Remicamide[®]) es el agente biológico más ampliamente investigado disponible para el tratamiento de la EC y la CU. Se trata de un anticuerpo monoclonal quimérico anti-TNF inhibidor del subconjunto IgG1 derivado de un modelo murino, administrado por vía intravenosa. Infliximab es el agente biológico más ampliamente investigado disponible para el tratamiento de la EC y la CU. Puede ser utilizado como monoterapia o en combinación con otros agentes. Se han encontrado estudios con resultados prometedores de un uso concomitante de antibióticos e infliximab. También han surgido nuevas estrategias de combinación de anti-TNF y drenaje quirúrgico. La fuerza de los datos disponibles sugiere que infliximab debe ser el tratamiento primario para pacientes que sufren enfermedad fistulizante.

El tratamiento con infliximab es generalmente bien tolerado aunque se presentan efectos secundarios como dolor de cabeza, náuseas, reacciones de hipersensibilidad aguda y tardía durante la infusión intravenosa y otros más graves (tuberculosis de reactivación, la histoplasmosis, linfoma y trastornos desmielinizantes del sistema nervioso central).

Entre otros anti-TNFs con una eficacia prometedora se encuentra adalimumab (Humira[®]) que es un anticuerpo monoclonal del isotipo del IgG1 contra TNF- α que se administra por vía subcutánea. Debido a la inyección subcutánea, las reacciones locales son un efecto secundario común de la terapia. Certolizumab pegol (Cimia[®]) que se distingue de sus predecesores en que es pegilado y no contiene la porción Fc (fracción constante del anticuerpo). Estas modificaciones pueden disminuir la inmunorespuesta del huésped al fármaco y reducir la activación del complemento, convirtiéndolo en una buena opción para los pacientes con niveles elevados de proteína C reactiva (CRP). Natalizumab (Tysabri[®]), otro anticuerpo monoclonal que trabaja uniendo la molécula adhesina selectiva, integrina- α -4e inhibiendo la quimiotaxis de leucocitos hacia el intestino. Se administra por vía intravenosa (38).

Los pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva no deben ser tratados con terapia anti-TNF, ya que hay asociada una mayor tasa de mortalidad.

5. Probióticos

La flora intestinal normal y el sistema inmune de la mucosa se encuentran próximos en el espacio intestinal. Una respuesta anormal del anfitrión para la flora intestinal normal conduce a la inflamación intestinal crónica. Las bacterias probióticas pueden modular tanto la flora intestinal como la respuesta inmune de la mucosa y son una terapia eficaz para mantener la remisión en EII. La introducción de probióticos puede equilibrar la microbiota entérica aberrante en pacientes con EII y reforzar las distintas líneas de defensa intestinal por inhibición del crecimiento de patógenos microbianos y aumento de las uniones estrechas del epitelio intestinal y de la permeabilidad; modulan la respuesta inmune del epitelio intestinal y de las células inmunes de la mucosa, segregando productos antimicrobianos, que destruyen a los antígenos patógenos lumbales (36,37).

Los antibióticos y los probióticos parecen jugar un papel beneficioso en el tratamiento y prevención de la pouchitis (inflamación aguda de la bolsa construida quirúrgicamente en reemplazo del recto), que puede causar diarrea y otros problemas. Recientemente, se han intentado acercamientos terapéuticos a modificar la microbiota intestinal mediante el uso de prebióticos y probióticos.

6. Quitosano

El quitosano es un polímero natural que se obtiene a partir de la quitina, uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza que forma parte de la estructura de soporte de numerosos organismos vivos, tales como artrópodos (crustáceos e insectos), moluscos y hongos.

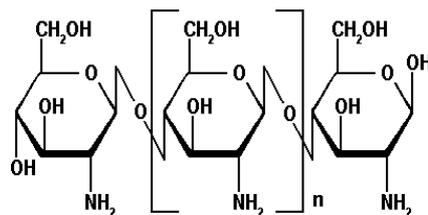


Figura 14: Estructura química del quitosano.

Es un polisacárido catiónico (Figura 14) con múltiples aplicaciones en Medicina y Farmacia debido a sus excelentes cualidades biológicas: biocompatibilidad, biodegradabilidad, mucoadherencia, atoxicidad y además tiene propiedades antimicrobianas, antivirales e inmunoadyuvantes (40).

Algunos estudios sobre el quitosano ponen de manifiesto que posee propiedades de inhibición del crecimiento de varios hongos y microbacterias, especialmente Fito-patógenos. El quitosano tiene una mayor actividad que la quitina porque los grupos aminados, cargados positivamente en el quitosano inhiben el crecimiento de hongos o microbacterias formando complejos polielectrolíticos con grupos carboxilo presentes en sus paredes celulares (41,42).

También se ha investigado el potencial terapéutico de oligosacáridos de quitosano (COS) en el tratamiento de la EII. Los COS son oligómeros de d-glucosamina, que presentan actividades antiinflamatorias tanto in vitro como in vivo debido a que inhiben la activación de NF-kB y evitan la apoptosis inducida por el estrés oxidativo de la AIEC y TNF- α , siendo eficaces en la prevención de la colitis experimental in vivo (43)

7. Antibióticos

El papel que desempeñan las bacterias en la etiología de la EC proporciona una razón evidente para el uso de antibióticos en el tratamiento primario de la enfermedad, por lo que hay numerosos estudios al respecto (44–47).

La posible implicación del *Micobacterium paratuberculosis* en la génesis de la EC y el uso exitoso de algunas combinaciones de antituberculosos, hizo sospechar que otra clase de antibióticos de amplio espectro también lo sería. De hecho, hay datos que sugieren que los antibióticos también pueden ser eficaces en la terapia de la enfermedad activa en el lumen del intestino y/o de la zona perianal, así como ayudar en la prevención de patologías postoperatorias recurrentes. El mecanismo de acción en estos contextos clínicos está aún por aclarar, pero es probable que actúen de manera convencional con acción antimicrobiana reduciendo la proporción de bacterias perjudiciales o limitar la invasión bacteriana y/o productos de secreción bacteriana.

Por otra parte, algunos de los antibióticos utilizados en EC pueden también ejercer efectos inmunomoduladores directos y se ha comprobado un efecto sinérgico de inmunosupresores y antibióticos, aunque no hay datos concluyentes (48)

Durante mucho tiempo el interés por los antibióticos se centró en el metronidazol, activo sólo frente microorganismos anaerobios. Al no obtener buenos resultados en el tratamiento de la EC activa, la atención se dirigió hacia otro antibiótico mejor tolerado con un amplio espectro antibacteriano, ciprofloxacino.

Tabla 1: Actividad de ciprofloxacino frente a distintos microorganismos.

Es efectivo contra
<i>Enterobacteriaceae, Vibrio, Haemophilus influenzae, Haemophilus ducreyi, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Moraxellacatarrhalis, Brucella, Campylobacter, Mycobacterium intracellulare, Legionella sp, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus anthracis.</i>
Presenta baja actividad frente a
<i>Streptococcus pneumoniae, Chlamydia trachomatis, Chlamydia pneumoniae.</i>
Ninguna actividad contra
<i>Bacteroides, Burkholderia cepacia, Enterococcus faecium, Ureaplasma urealyticum, Streptococcus pyogenes</i>

El ciprofloxacino ha ganado más terreno en el tratamiento de la EC que compromete el colon y el íleo. Se trata de un antibiótico de amplio espectro bacteriano (tabla 1), perteneciente al grupo de las fluoroquinolonas con efectos bactericidas. Este antibiótico impide la replicación del ADN bacteriano al unirse con una enzima llamada ADN girasa (una topoisomerasa tipo II), que queda bloqueada. La función de esta enzima es deshacer el superenrollamiento de la doble cadena de ADN, permitiendo que otras enzimas puedan proceder a la replicación propiamente dicha (figura 15). Así, la bacteria queda incapacitada para dividirse y finalmente muere sin proliferar.

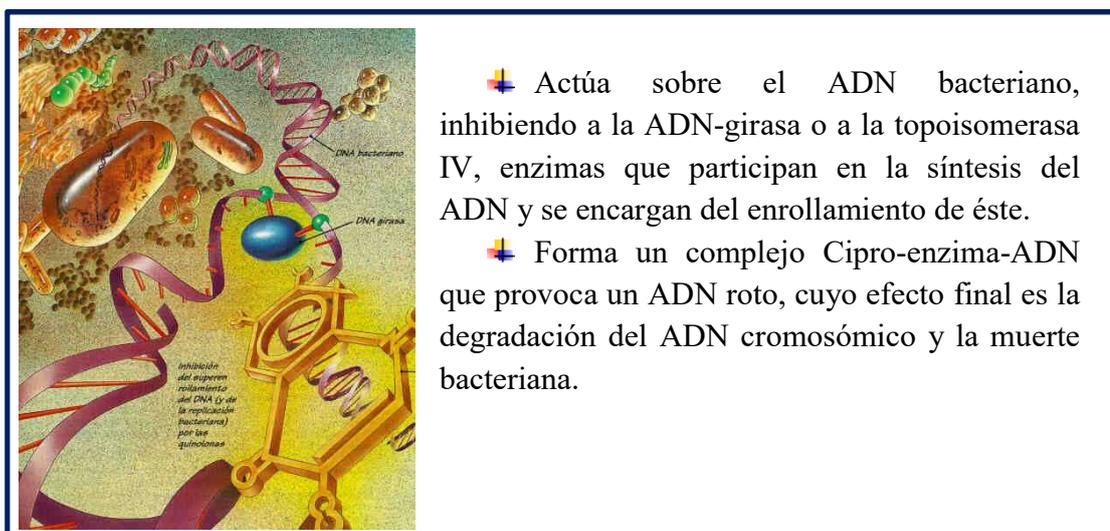


Figura 15: Mecanismo de acción de Ciprofloxacino

Se observa que existe una asociación entre la estructura química (figura 16) con la actividad y los efectos adversos que provoca dicha sustancia. La gran actividad antimicrobiana y un espectro de acción tan amplio se debe a la incorporación de un átomo de flúor en la posición 6, que controla la unión y efectos sobre la unión DNA-girasa y además la penetración intrabacteriana, lo cual aumenta notablemente la potencia (figura 15). Además también debemos su acción a la incorporación de un grupo piperazina heterocíclico en la posición 7. Además el grupo ciclopropil característico de la molécula va a aumentar la potencia de la misma. Los grupos cetónido y el ácido carboxílico no pueden ser modificados ya que resultan indispensables en la unión a la enzima girasa bacteriana.



Figura 16: Estructura química de ciprofloxacino

En las fistulas perianales que aparecen como complicación en la EC, en particular cuando el recto está implicado o como presentación inicial de la enfermedad cuando aún no ha aparecido otra sintomatología, los microorganismos que con más frecuencia colonizan estas fistulas son Gram-positivos, por lo que los principales tratamientos médicos incluyen antibióticos, azatioprina o mercaptopurina, infliximab u otros (tacrolimus, ciclosporina). También se ha demostrado que el metronidazol y el ciprofloxacino solos o en combinación han tenido una buena respuesta al tratamiento de las manifestaciones leves y de la EC, incluso en el cierre de las fístulas. Parece que el efecto que tiene el ciprofloxacino en la curación de las fístulas no es debido a su actividad antimicrobiana de amplio espectro, sino a otros mecanismos todavía desconocidos; se sospecha que tiene algunas propiedades inmunosupresoras que pueden influir en la actividad inflamatoria (49,50) o también puede deberse a que es eficaz en el tratamiento de la enfermedad de Crohn activa, independientemente de la presencia de microorganismos específicos (51).

Otros investigadores, tales como Prantera et al., Greenbloom et al. y Lal y Steinhart, han evaluado el efecto de una combinación de ciprofloxacino y metronidazol en pacientes con EC activa (52–54), pero los resultados han sido contradictorios.

En 1993, Peppercorn publicó los resultados de un pequeño estudio, demostrando una respuesta clínica a ciprofloxacino en pacientes con ileitis de Crohn (55). Seis años después, Colombel et al. (56) demostraron que 1 g al día de ciprofloxacino durante seis semanas es tan eficaz como 4 g/día de mesalamina para inducir la remisión de la enfermedad, lo cual ha sido corroborado por Arnold et al. en 2002 (49).

FORMAS FARMACÉUTICAS UTILIZADAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA EII

El tratamiento convencional de la enfermedad inflamatoria intestinal se basa en la administración diaria de dosis altas de la sustancia activa. Este tratamiento no es eficaz debido a que no se consiguen concentraciones de fármaco suficientes en el sitio de acción y se han observado ciertos efectos adversos, que actúan como factores limitantes de dicha terapia. Estos efectos adversos se cree que están relacionados con la escasa liberación selectiva del fármaco en el lugar deseado del intestino, desencadenándose por factores ampliamente independientes de las condiciones fisiológicas de la inflamación y su ubicación.

Lo ideal sería conseguir un sistema de liberación controlada, es decir, un sistema transportador que libere la sustancia activa específicamente en las regiones intestinales inflamadas y muestre una liberación prolongada en el tiempo (57).

Existen una serie de directrices médicas para la elección de una estrategia de tratamiento adecuada, en la que se incluye la elección de los agentes activos más apropiados en cada uno de los casos y la vía de administración. En general, aunque a veces se recurre a la vía parenteral, lo más frecuente es utilizar la vía de administración oral o la rectal.

1. Vía parenteral

Esta vía se utiliza para una terapia inmunosupresora sistémica en caso de una exacerbación grave, así como en una enfermedad extra intestinal severa. También se emplea para potentes antiinflamatorios, los corticosteroides o anti-TNF- α -anticuerpos.

Esta vía muestra varias ventajas sobre las demás, como son la rápida acción del fármaco, y ausencia del efecto de primer paso hepático. Sin embargo, una desventaja importante es que el agente activo administrado presenta una biodisponibilidad casi 100% con un aumento del riesgo de reacciones adversas sistémicas (58).

2. Vía rectal

La administración por vía rectal muestra varios beneficios con respecto a la administración parenteral u oral, ya que el fármaco alcanza el lumen intestinal evitando la circulación portal minimizando el efecto de primer paso. Para esta vía de administración hay varios tipos de formulaciones que facilitan la llegada del fármaco a las partes bajas del recto y del colon distal, tales como enemas, espumas o supositorios que son sistemas de administración fáciles de usar para fármacos que actúan de forma local y tópica en las áreas enfermas. La administración rectal proporciona una alta concentración del agente activo en el lugar de la inflamación y disminuye la posibilidad de reacciones adversas debido a una baja absorción sistémica del fármaco.

Las formulaciones rectales están indicadas para una leve a moderada CU distal y en la proctitis ulcerosa. Los supositorios se utilizan si se necesita tratar sólo a las partes bajas del recto, mientras que los enemas y las espumas, con agentes activos disueltos, se pueden emplear cuando lo que está afectado es el recto, colon sigmoide y descendente.

Los fármacos más comunes en formulaciones rectales son 5-ASA y los corticosteroides (58).

3. Vía oral

La vía oral se caracteriza por una producción económica, una buena aceptación por parte de los pacientes, dosificación exacta y una excelente estabilidad y capacidad de almacenamiento. En contraste, esta vía está limitada por la variabilidad en la absorción intestinal, metabolización en enterocitos y generalmente termina en la circulación portal, sufriendo efecto de primer paso. A pesar de estos inconvenientes, en general, es la forma más deseada y aceptada para administrar sustancias activas en el tratamiento de la EII.

La absorción en el tracto gastrointestinal ocurre en el estómago, intestino delgado e intestino grueso, de forma activa o pasiva través de las células (absorción transcelular) o entre ellas (paracelular) (59).

Las sustancias activas son absorbidas por la mucosa gastrointestinal, acceden a la circulación sistémica y se distribuyen por todo el organismo. En consecuencia, pueden surgir reacciones adversas sistémicas que pueden influir en la calidad de vida del paciente. Por ello, lo ideal es conseguir una absorción localizada en el lugar donde se encuentra la patología, garantizando además que en dicha zona se alcancen concentraciones eficaces de la sustancia activa y que éstas se mantengan durante el mayor tiempo posible (60).

La función principal del estómago es de almacenamiento temporal en donde se mezclan comida, agua y los jugos gástricos secretados por la mucosa gástrica (pepsinógeno, lipasas, ácido clorhídrico, etc.), para conseguir la destrucción de los alimentos física y química (digestión) y su posterior absorción como nutrientes. En ésta zona, el pH es de 1-2 (figura 17) y aumenta hasta 4 en presencia de comida. Dado el ambiente degradativo, y su escasa superficie, la absorción en el estómago es mínima. En cuanto al tiempo de vaciado gástrico, varía de 1-2 horas cuando se ingieren dietas ligeras, hasta 2-4 horas cuando se ingieren alimentos con elevado contenido en grasas.

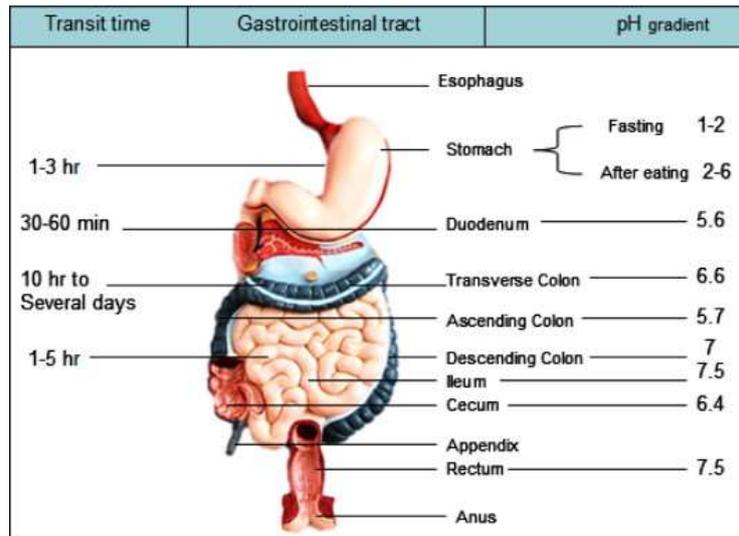


Figura 17: Características de las diferentes zonas del tracto gastrointestinal (61).

La mayor absorción de nutrientes y sustancias tiene lugar en el intestino delgado (90%) debido a las particularidades de dicha zona tales como el tipo de mucosa que incrementa el tiempo para la digestión y absorción de nutrientes, una elevada superficie de absorción creada por las vellosidades intestinales y una zona de elevada irrigación para una mayor absorción y transporte de nutrientes, ya que cada vellosidad se encuentra innervada (figura 18).

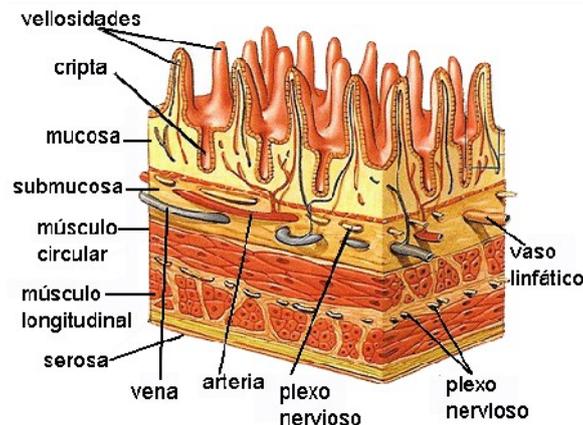


Figura 18: Esquema de la mucosa del intestino delgado.

El intestino delgado mide unos 7 metros de longitud y se divide en tres secciones duodeno, yeyuno e íleo, variando el pH a lo largo de las tres regiones entre 6 y 7. La absorción se produce mediante dos mecanismos: difusión pasiva o gracias a un transporte activo. La primera ocurre a través de las membranas lipídicas o de los poros acuosos de las membranas de enterocitos. Esta difusión se origina gracias a un gradiente de concentración (no necesita energía) entre el interior y el exterior. El transporte activo necesita energía para transportar moléculas que son reconocidas por receptores de membrana, en contra de un gradiente de concentración. El tiempo de tránsito a través de dicha zona es de 4-6 horas (más o menos constante), ya que normalmente no está influenciado por el estado físico del individuo, el tamaño de la forma de dosificación o

la presencia o no de alimento en el estómago y del tipo de dieta ingerida. Durante este tiempo la forma farmacéutica se encontraría expuesta a la actividad enzimática del intestino delgado.

El intestino grueso es la porción final del aparato digestivo (Figura 19). Se extiende desde la unión ileocecal hasta el ano y constituye aproximadamente los últimos 1.5 de los 6 metros del tubo digestivo. Está formado por el ciego, el colon y el recto.(62).

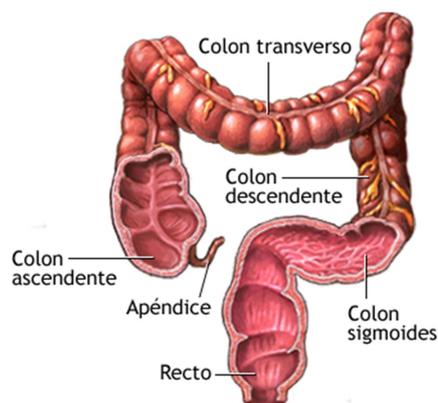


Figura 19: Partes que componen el intestino grueso.

El colon a su vez tiene varias zonas: colon ascendente (con el apéndice), colon transversal, colon descendente y colon sigmoide, que termina en el recto. A diferencia del intestino delgado, no posee vellosidades especializadas y principalmente sus funciones son las de recuperación de agua y de almacenamiento del contenido fecal. En esta zona no se producen enzimas, sino que son secretadas por la microbiota, descrita en la primera parte de esta obra. Sin embargo, las microvellosidades de las células epiteliales absortivas, la presencia de criptas y los pliegues irregulares de la mucosa consiguen aumentar la superficie del colon hasta 10 o 15 veces comparada con la de un simple cilindro (no obstante, la superficie es 30 veces menor que la del intestino delgado). Esta gran masa bacteriana puede realizar varias reacciones metabólicas, como la hidrólisis de ésteres de ácidos grasos y la reducción de fármacos conjugados inactivos a su forma activa. Las bacterias obtienen su energía y sus carbonos a partir de los polisacáridos no digeridos de la dieta y los componentes hidrocarbonados de secreciones tales como el moco (63,64).

Los microorganismos degradan los polisacáridos dando lugar a ácidos grasos que reducen el pH luminal y generan gases como hidrógeno, dióxido de carbono y metano. Por ello el pH del ciego es de alrededor de 6-6.5, aumentando hasta 7-7.5 en las porciones más distales.

El colon presenta algunas particularidades que lo hacen candidato a ser utilizado como lugar para liberación de fármacos ya sea para el tratamiento de enfermedades localizadas a este nivel o como un modo de liberar sistémicamente moléculas como péptidos y proteínas. El tiempo de tránsito colónico es muy variable entre individuos e influyen diversos factores tales como el contenido en fibra dietética, la motilidad, el

estrés, alguna patología concomitante o la administración de fármacos. Las enfermedades como la diarrea o el estreñimiento también afectan al tránsito colónico aumentándolo y disminuyéndolo respectivamente, aunque normalmente es muy lento en comparación con el resto del tracto gastrointestinal. De hecho, el tiempo de permanencia de una forma farmacéutica es mayor en esta zona que en el intestino delgado, como el de una cápsula que puede ser de entre 20 a 35 horas, llegando incluso a tiempos de entre 50 a 70 horas, por tanto, al aumentar este tiempo de residencia se mejora el contacto con la flora bacteriana residente en el colon, y por tanto, la liberación y la absorción del fármaco administrado. También varían dichos tiempos en función de si una forma farmacéutica es administrada por la mañana o por la noche (figura 18). En cuanto a la estabilidad de fármacos, el colon presenta un pH y actividad enzimática mucho menos agresivos que el resto del tracto gastrointestinal, de forma que puede ser viable la administración de fármacos inestables en otros segmentos (65–67).

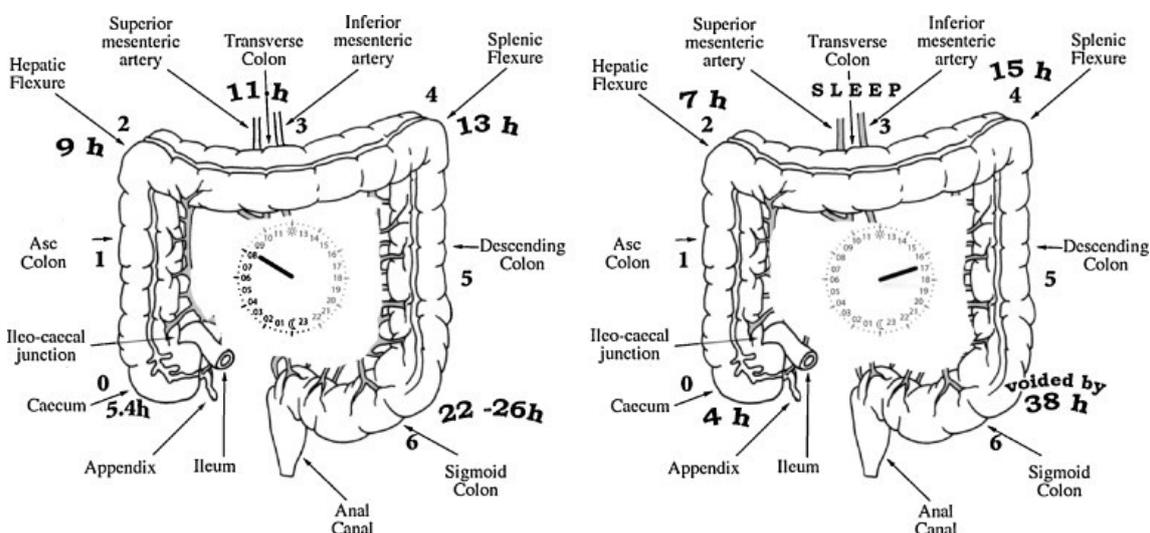


Figura 20: Partes del intestino grueso y tiempos de permanencia de cada una de las regiones de una forma farmacéutica administrada por la mañana y por la noche (66).

Por todo lo expuesto, no es de extrañar la publicación en los últimos años de numerosos artículos de revisión sobre las ventajas y el diseño de Sistemas Portadores de Fármacos que liberen al fármaco en el colon (68–74).

Como es lógico, el diseño de este tipo de formas farmacéuticas no es tarea fácil pues se debe atravesar el tracto gastrointestinal, en el que aparecen diferentes cambios fisiológicos (incremento en el pH y un decrecimiento continuo en la actividad enzimática, fluidos y motilidad) y también cambios entre zonas intestinales inflamadas y saludables.

Teniendo en cuenta esto, un reto para la tecnología farmacéutica consiste en desarrollar sistemas innovadores capaces de vehiculizar y liberar compuestos activos específicamente en las zonas intestinales inflamadas como en el caso de la EII que ocurre principalmente en el colon (75,76), por lo que las formas de dosificación se diseñan para que sean protegidas del ambiente degradativo del estómago, de la zona de máxima absorción localizada en el intestino delgado, y además aguanten los tiempo de

tránsito hasta alcanzar el colon (5-10h) con la mayor concentración de sustancia activa posible (77–85).

Por ello se diseñan los siguientes sistemas clásicos de **liberación colónica** (62,63,82,83,86) (figura 21):

- ❖ Profármacos
 - ❖ Sistemas osmóticos
 - ❖ Sistemas de presión
 - ❖ Sistemas a base de recubrimiento
 - Sistemas pH dependientes
 - Sistemas tiempo-dependientes
 - Sistemas controlados por microbiota colónica
 - Sistemas combinados

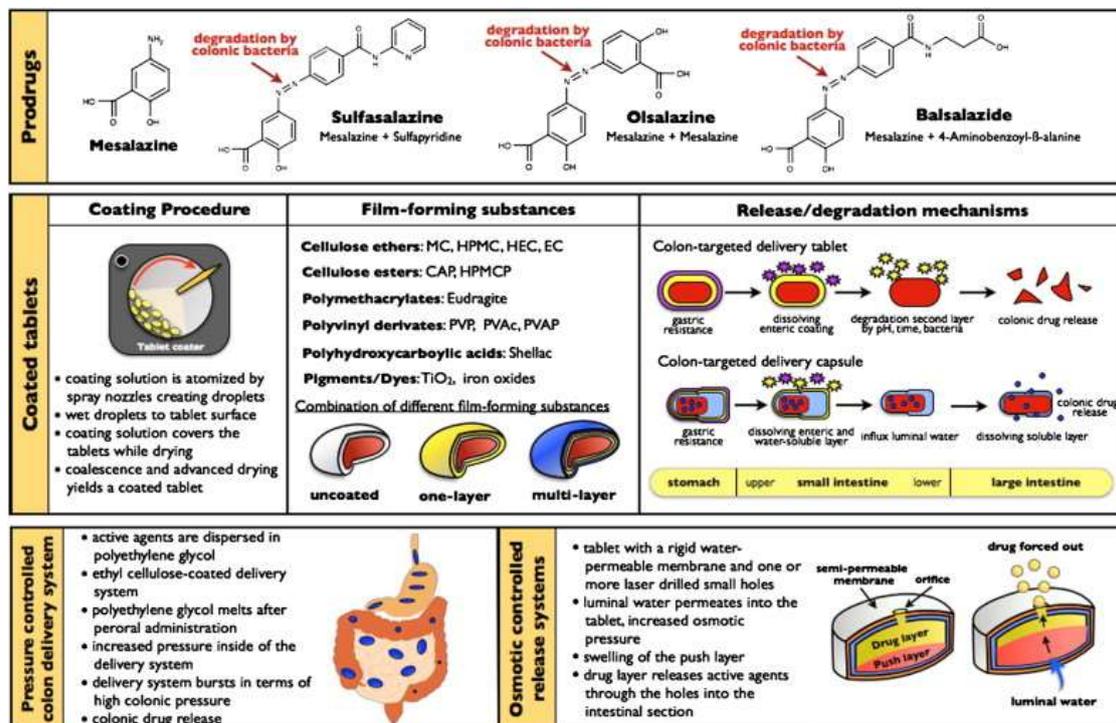


Figura 21: Tipos de sistemas de liberación colónica (58).

❖ PROFÁRMACOS:

Un profármaco es un derivado, farmacológicamente inactivo, de una molécula que requiere algún tipo de transformación in vivo para liberar la sustancia activa en el lugar de acción. Es necesario que haya un enlace covalente entre el fármaco y su portador, de tal manera que tras la administración oral, la molécula permanezca intacta en el estómago y en el intestino delgado. El tipo de unión entre el fármaco y el portador determina el mecanismo de activación para la liberación del principio activo en el colon. Esta biotransformación se lleva a cabo por una variedad de enzimas, principalmente de origen bacteriano, presentes el colon. Las enzimas implicadas principalmente son azorreductasas, galactosidasas, β-xylosidasas, nitroreductasas, glucosidasas,

desaminasas, etc. Generalmente, un profármaco es exitoso como portador de fármacos al colon si es un fármaco hidrofílico, para minimizar la absorción desde el tracto gastrointestinal superior y, una vez en el colon, se convierte en una molécula más lipofílica que entonces estará disponible para la absorción (87,88).

❖ *SISTEMAS OSMÓTICOS:*

El comprimido osmótico elemental, conocido como OROS[®] (Osmotic Release Oral System) o GITS[®] (Gastrointestinal Therapeutic System), consta de un núcleo osmóticamente activo rodeado de una membrana semipermeable rígida provista de un orificio en el centro de una de las caras del comprimido (figura 20). El núcleo contiene además de la sustancia activa y otros excipientes convencionales para comprimidos (diluyentes, lubricantes....), agentes osmóticos como NaCl, KCl, manitol, etc.

Este núcleo está recubierto de una membrana semipermeable, en la que se practica un pequeño orificio (75-274 µm), para la liberación del fármaco, mediante un fino rayo láser.

El material de la membrana suele ser polimérico: derivados celulósicos (acetato de celulosa), cloruro de polivinilo, etc., junto con plastificantes, estabilizantes y otros componentes del recubrimiento pelicular.

Cuando este dispositivo se pone en contacto con agua o con los fluidos digestivos, éstos atraviesan la membrana atraídos por la sustancia osmóticamente activa del núcleo. El agua, que penetra continuamente gracias a este fenómeno osmótico, disuelve al fármaco, siendo expulsado en forma de solución saturada a través del orificio de salida a una velocidad controlada. Como la membrana semipermeable es rígida y no permite un aumento de volumen del sistema, la salida de la solución se realiza a la misma velocidad de entrada del agua por ósmosis. Puesto que la entrada de agua es constante mientras quede en el núcleo un exceso de sustancia osmótica en estado sólido, la velocidad de liberación del principio activo es constante y se controla por las propiedades osmóticas del núcleo y por las características de permeabilidad de la membrana, siendo totalmente independiente del pH y de la motilidad gastrointestinal.

De esta manera el comprimido osmótico es capaz de liberar el principio activo a una velocidad constante, mientras exista en su interior una solución saturada de fármaco (orden cero) (58).

$$\text{Velocidad de liberación} = \text{Velocidad de entrada de agua}$$

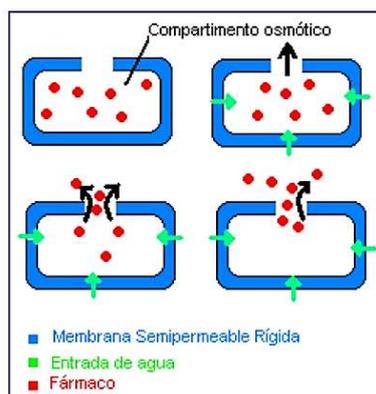


Figura 22: Sistema osmótico.

Cuando se va agotando el núcleo de sustancia activa, se va produciendo una disminución de la presión osmótica y la liberación de la sustancia activa se ajusta más a una cinética de primer orden.

Si la solubilidad del principio activo es baja o muy elevada se utiliza el comprimido osmótico bicompartimental, conocido como OROS push-pull[®], que consiste en un comprimido bicapa rodeado por una membrana semipermeable (Figura 23).

La capa inferior (compartimento de empuje) contiene un polímero hidrófilo capaz de formar un hidrogel expansible que empuja hacia el orificio de salida la formulación de la capa superior.

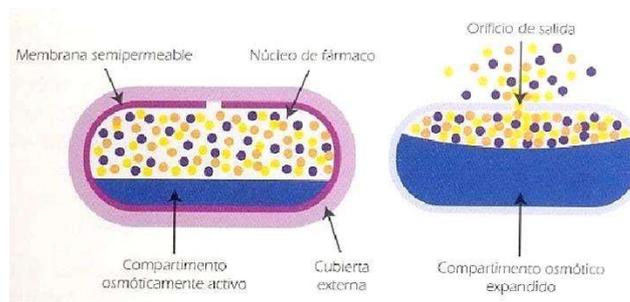


Figura 23: Sistema osmótico bicompartimental.

Este polímero no debe permitir la difusión del principio activo desde el otro compartimento, durante el funcionamiento del dispositivo.

Entre los principales polímeros formadores de hidrogeles que se utilizan actualmente en la formulación de comprimidos osmóticos bicompartimentales se pueden citar, entre otros, polímeros carboxivinílicos (como sal sódica), carboximetilcelulosa sódica, homopolímeros del óxido de etileno, ácido poliacrílico, pectinas, etc..

Estos polímeros pueden mezclarse con agentes osmóticos como cloruro sódico en seco o mediante granulación por vía húmeda con soluciones alcohólicas o hidroalcohólicas.

El conjunto suele constituir un 20-40% de la masa total del comprimido.

En el compartimento superior (segundo compartimento) se encuentra el principio activo solo o acompañado, a veces, de otros componentes.

La membrana semipermeable, al igual que en el caso de los comprimidos osmóticos elementales, está constituida por material polimérico, como el acetato de celulosa, uno de los polímeros más empleados para la formación de la membrana semipermeable de estos comprimidos bicompartimentales. La película formada sobre la superficie de los núcleos debe tener un grosor uniforme y una resistencia mecánica adecuada ya que debe impedir la expansión del hidrogel en sentido radial.

El comprimido osmótico bicompartimental actúa mediante el efecto combinado de la hidratación de sus dos compartimentos de modo que, inicialmente, el compartimento de principio activo absorbe agua suficiente para formar una suspensión o solución que será expulsada a través del orificio de salida tan pronto como se inicie la formación de un fluido en su interior.

Para formular principios activos poco o muy solubles, una de las configuraciones posibles es utilizar polímeros hidrófilos, formadores de hidrogeles en ambos compartimentos, siempre y cuando la difusión del principio activo hacia el compartimento de empuje y la interdifusión de ambos polímeros sea mínima. Esto puede conseguirse empleando polímeros con pesos moleculares muy diferentes entre sí, sean químicamente diferentes o no, utilizando el de mayor peso molecular en el compartimento de empuje, siendo necesario a veces la incorporación de agentes osmóticos como manitol, sorbitol o cloruro sódico para acelerar la absorción de agua.

Hay diferentes modificaciones de la tecnología de los comprimidos osmóticos elemental y bicompartimental y algunas se han orientado al desarrollo de sistemas terapéuticos gastrointestinales para la liberación de fármacos en colon.

Así, el OROS-CT[®] (OROS Colon Targeted) posee un recubrimiento gastrorresistente externo a base de Eudragit[®] S100 (polímero pH dependiente ya que es soluble a pH superior a 7) que bloquea el paso de agua hacia el interior del sistema en el medio ácido del estómago, retrasando la liberación del principio activo hasta que el sistema haya alcanzado el colon (figura 24). Una vez allí, el recubrimiento gastrorresistente se disuelve completamente en el intestino (medio neutro o alcalino), quedando expuesta la membrana semipermeable y a partir de este instante la liberación de principio activo se produce a velocidad constante. Se corre el riesgo de que el sistema absorba agua antes de que alcance el colon, liberando al principio activo prematuramente: Dado que el polímero de la cubierta entérica comienza a disolverse desde el momento en que el dispositivo se encuentra en el medio neutro o alcalino del intestino delgado, la absorción de agua podría iniciarse antes de que el dispositivo haya atravesado el esfínter ileo-cecal.

Para prevenir la liberación prematura del principio activo, el dispositivo puede diseñarse con tres estratos, de manera tal que expulse inicialmente durante 3 o 4 horas un hidrogel formado a partir de una formulación exenta de principio activo contenida en un primer estrato. Transcurrido este tiempo, y una vez alcanzado el colon, el principio activo, contenido en el segundo estrato, comenzaría a ser liberado en solución o en suspensión, con una cinética de orden cero, empujado por la expansión del hidrogel que se encuentra en el tercer compartimento (compartimento de empuje).

El polímero contenido en el compartimento de empuje, al expandirse constantemente durante el funcionamiento del sistema, expulsa así la totalidad del principio activo.

Con el fin de mejorar la distribución del principio activo a nivel de colon, pueden fabricarse sistemas con múltiples unidades individuales contenidas en una cápsula de gelatina dura (OROS-CTmu[®]; Colon Targeted multiple units - figura 24-) que se disuelve rápidamente en el estómago. De este modo, pueden quedar repartidos varios dispositivos a lo largo del colon al salir del estómago en forma espaciada de acuerdo con el vaciado gástrico.

En el tratamiento de la CU, se ha comprobado que cada unidad, diseñada con un retraso gástrico de 3-4 horas, consigue que la liberación del fármaco se inicie cuando la unidad alcanza el colon pudiendo mantener una velocidad de liberación constante hasta 24 h en el colon (71).

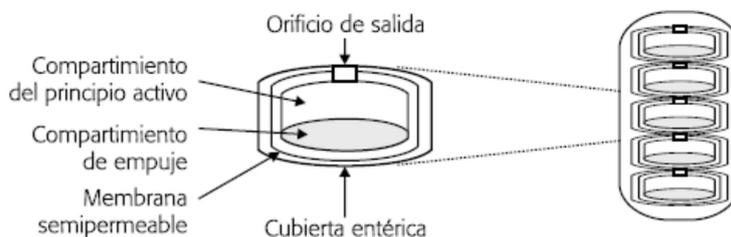


Figura 24: Sistema “OROS Colon Targeted” (OROS-CT[®]) y sistema “OROS Colon Targeted multiple units” (OROS-CTmu[®]).

❖ **SISTEMAS DE PRESIÓN:**

Los procesos digestivos en el tracto gastrointestinal implican actividad contráctil del estómago y los movimientos peristálticos para la propulsión del contenido intestinal. En el intestino, el contenido se mueve de una parte a otra, a partir del colon ascendente hasta el colon transverso por los movimientos peristálticos forzosos comúnmente denominados como peristaltismo masivo. Estas ondas peristálticas fuertes en el colon son de corta duración, y ocurren solamente tres o cuatro veces al día. Sin embargo, temporalmente aumentan la presión dentro del colon, lo que constituye la base para el diseño de sistemas controlados por presión luminal. Debido a la reabsorción de agua en el colon, la viscosidad del contenido luminal es mayor en el colon que en el intestino y como consecuencia, la presión luminal resultante del movimiento peristáltico es mayor en el colon (71). Se han desarrollado cápsulas de liberación colónica de presión

controlada usando etilcelulosa, que es insoluble en agua. La liberación del fármaco ocurre tras la desintegración de la cápsula como resultado de la presión en el lumen del colon, mecanismo independientemente del pH, observándose un tiempo de retraso de 3-5 horas en la absorción de fármaco (70). El espesor de la membrana de etilcelulosa es el factor más importante para la desintegración de la formulación, aunque también influye el tamaño de la cápsula.

❖ **SISTEMAS A BASE DE RECUBRIMIENTO:**

Las sustancias utilizadas como material de recubrimiento aparecen en la tabla 2 (74). Con ellas, se pueden conseguir distintas estrategias:

- **Sistemas pH dependientes:** este tipo de sistemas se basa en el gradiente de pH que hay a lo largo del tracto gastrointestinal que aumenta progresivamente desde el estómago con un pH 1-2 (que llega a 4 durante la digestión), al intestino delgado con pH 6-7 en el sitio de digestión que alcanza un valor de 7-8 en el íleo distal. Para conseguir una liberación del fármaco en el colon se utilizaran polímeros sensibles a pH, por lo que el fármaco se libera dependiendo del pH del medio circundante. Los polímeros utilizados deben ser capaces de soportar los bajos valores de pH del estómago y de la parte proximal del intestino delgado y deberán desintegrarse a pH neutro / ligeramente alcalino del íleon terminal distribuyéndose la sustancia activa a lo largo del intestino. Mientras que este patrón de liberación puede ser estudiado in vitro, no hay modo para confirmar un rendimiento fiable in vivo en el hombre (69).
- **Sistemas tiempo-dependientes:** son sistemas que presentan una capa que los protege de su paso por el estómago y consiguen que el fármaco se libere después de un lapso predeterminado de tiempo en el sitio deseado de acción. Para conseguir esto se utilizan unos polímeros de recubrimiento o una mezcla, cuyo espesor de la capa de recubrimiento influye en el tiempo requerido para que la forma de dosificación libere la sustancia activa en el colon, considerando como suficiente que transcurran 5 horas. Como el tiempo de vaciado gástrico difiere de persona a persona, el tiempo de llegada al colon de las formas de dosificación no se puede predecir con precisión, pero estos sistemas son útiles en el tratamiento de enfermedades basadas en ritmos circadianos. Basados en estos sistemas, se utilizan cápsulas y comprimidos bicapa, en los que el equilibrio entre el espesor de la membrana de polímero insoluble en agua y la cantidad de excipiente soluble controla el tiempo de liberación del fármaco. Dicha liberación se produce por disolución, ósmosis o por combinación de ambos mecanismos.
- **Sistemas activados por la microbiota colónica:** En este caso el mecanismo básico es la degradación de los polímeros de recubrimiento por la microbiota presente en el colon, provocando así la liberación de la sustancia activa en dicha zona. La microflora produce un gran número de enzimas como glucoronidasas, xylosidasas, arabinosidasas, galactosidasas, nitroreductasas, azareducatasas, desaminasas y dehydroxylasas de urea que van a degradar a dichos polímeros.

En este método, los fármacos o las formas de dosificación están cubiertas con los polímeros biodegradables, generalmente polisacáridos (tabla 2) y cuando atraviesan el tracto gastrointestinal, permanecen intactos en el estómago e intestino donde existe muy poca actividad microbiana (69). Al llegar al colon, actúan las enzimas sobre los polímeros de recubrimiento, se produce una reducción de sus pesos moleculares y una pérdida de resistencia mecánica, desintegrándose y dejando al descubierto la forma farmacéutica o liberando al fármaco. Debido a la presencia de las enzimas biodegradables únicamente en el colon, esta estrategia parece más específica que las anteriores para liberar al fármaco a nivel colónico (73,89–93).

Tabla 2: Tipos de polímeros utilizados en los sistemas de recubrimiento.

Polímeros pH dependientes	Polímeros tiempo dependientes	Polímeros degradados por bacterias
Eudragits® http://eudragit.evonik.com .	Eudragits® http://eudragit.evonik.com .	Chitosan
Polivinil acetato	Hidroxietil celulosa	Pectina
Hidroxipropil metil celulosa ftalato 50	Etil celulosa	Goma Guar
Hidroxipropil metil celulosa ftalato 55	Celulosa microcristalina	Dextranos
Hidroxipropil etil celulosa ftalato	Acetato succinato	Inulina
Acetato de celulosa ftalato	Lactosa/ácido belhínico	Lactulosa
Hidroxipropil metil celulosa		Amilosa
		Ciclodextrinas
		Alginatos
		Condroitin Sulfato

- **Sistemas combinados:** También se pueden combinar los polímeros anteriormente descritos para conseguir sistemas de liberación en los que estén implicadas varias de estas estrategias. Así, encontramos Sistemas pH-tiempo dependientes o Sistemas pH dependientes-activados por la microbiota colónica.

En la figura 25 podemos ver un esquema de estos sistemas recubiertos.

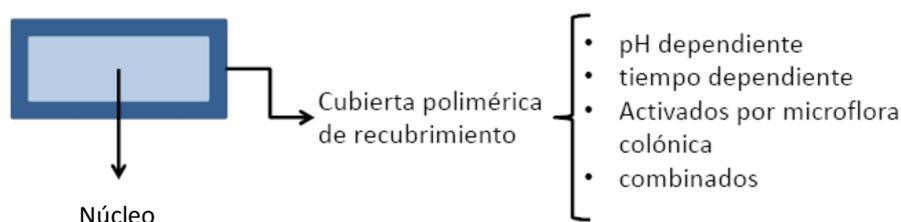


Figura 25: Comprimido recubierto.

SISTEMAS MICRO-NANOPARTICULARES PARA TRANSPORTAR AL FÁRMACO

Se han desarrollado otros sistemas más novedosos de tratamiento para la EII, basándose en peculiaridades de dicha patología.

Se ha comprobado una fuerte participación de macrófagos y células dendríticas en el lugar de la inflamación activa, por lo que hoy día, hay estrategias terapéuticas novedosas basadas en esta respuesta celular inmune.

La disminución del tamaño del sistema transportador de la sustancia activa ha demostrado ser una estrategia prometedora en el tratamiento de la EII (figura 26). Las micro y nanopartículas administradas por vía oral se adhieren selectivamente al tejido inflamado, son absorbidas más fácilmente por las células dendríticas y macrófagos y pueden desarrollar un mayor efecto local en el lugar de acción (94–96).

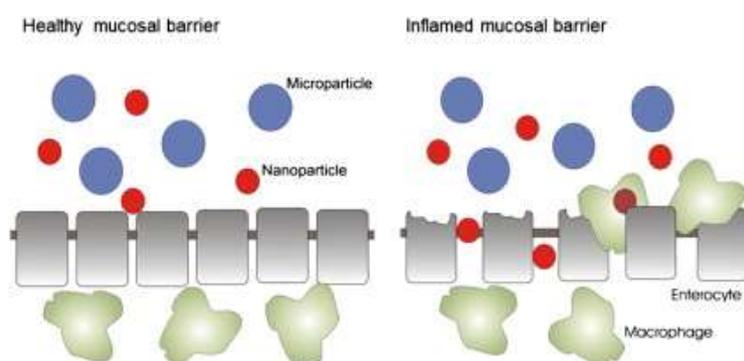


Figura 26: Mecanismo propuesto para sistemas portadores de fármaco con un tamaño nano-micrométrico. Se pueden acumular suficientes partículas pequeñas en los espacios entre las células epiteliales (por la barrera epitelial defectuosa) o ser absorbidas por las células inmunitarias y retenidas por el aumento de la capa de moco (97).

Un segundo fenómeno que contribuye a este efecto es el gran aumento de la mucosidad en la zona inflamada; se produce una capa de moco grueso, con el consiguiente aumento de la liberación de fármacos en sistemas mucoadhesivos. Pero además, con una barrera epitelial defectuosa (disfunción) se produce una más fácil penetración de sistemas con pequeño tamaño (98,99).

Otro fenómeno que se produce en la EII es que los pacientes sufren diarreas que provocan unos cambios en la absorción de líquidos, electrolitos y demás sustancias. Estas diarreas provocan un aumento del fenómeno llamado *streaming* en el colon, es decir, un movimiento más rápido de las fases sólidas y partículas grandes en comparación con las fases líquidas. Hardy demostró que reduciendo el tamaño de las partículas portadoras de fármaco, aumenta el tiempo de permanencia en el intestino grueso (100) aumentando la eficacia de las formas farmacéuticas, ya que se puede absorber más cantidad de principio activo (97).

La elaboración de sistemas portadores de fármacos de tamaño micro/nanométrico se llama micro/nanoencapsulación y consiste en recubrir materiales sólidos, líquidos o gaseosos con una película de material polimérico o graso, consiguiendo partículas con buenas propiedades de flujo, denominadas generalmente **micropartículas**, pudiendo distinguir entre **microesferas** o **microcápsulas** según su morfología y estructura interna. Cuando las partículas son menores de 1 μm , reciben el nombre de **nanopartículas** (**nanoesferas** o **nanocápsulas**). Al encapsular o recubrir un material sólido, se obtienen partículas que generalmente presentan una forma irregular, debido a que el material de la cubierta se deposita en la superficie de las partículas a encapsular y se adaptará a su forma original. Al encapsular gases se obtienen partículas compuestas de un núcleo gaseoso, rodeado de una película del material de cubierta, las cuales se denominan microcápsulas. Si la sustancia a encapsular es un líquido, una solución, una suspensión o una emulsión, se pueden obtener estructuras capsulares (**microcápsulas**) o matriciales (**microesferas**) (figura 27). El tipo de estructura depende, en gran medida, del procedimiento de encapsulación empleado, así como de las propiedades de la sustancia a encapsular y del material de cubierta (101,102).

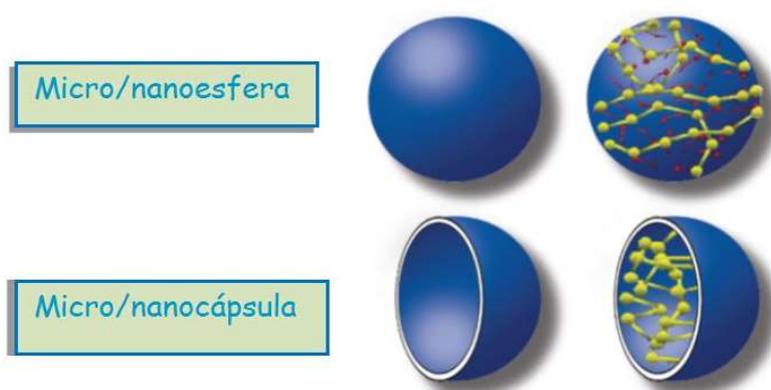


Figura 27: Estructuras de micro/nanoesferas y micro/nanocápsulas.

Existen diversos métodos de síntesis de estas micro-nanopartículas (103–108):

- ❖ **Coacervación:** Se basa en inducir, por algún procedimiento, la desolvatación del polímero, de manera que se deposita en forma de gotículas de coacervato alrededor del principio activo que se va a encapsular (figura 28).

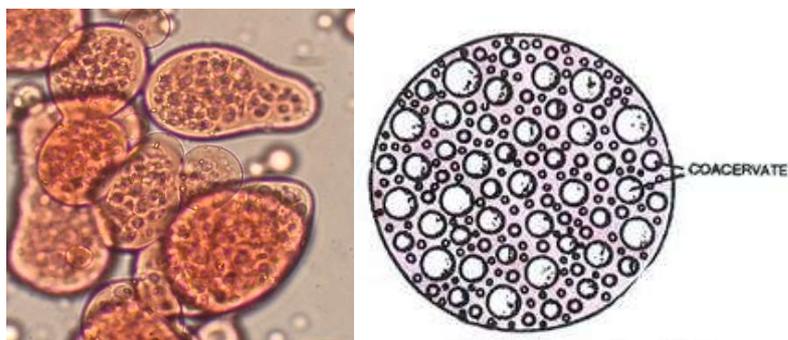


Figura 28: Ejemplo de disposición de las gotículas de coacervato alrededor de la sustancia a recubrir para la síntesis de micropartículas por coacervación.

- *Simple*: Como se describe en la figura 29, en la solución coloidal del polímero constituyente de la cubierta, se suspende o se emulsiona el fármaco a recubrir (Fase 1). A continuación, se induce la desolvatación parcial del material de cubierta (adicción de un no-disolvente, cambio de temperatura, cambio de pH, adición de una sal o de un polímero incompatible), de manera que el coacervato se va localizando en la interfase, envolviendo al fármaco (fases 2 y 3) y a continuación se consolida la cubierta formada (fase 4), pudiendo recoger las microcápsulas.

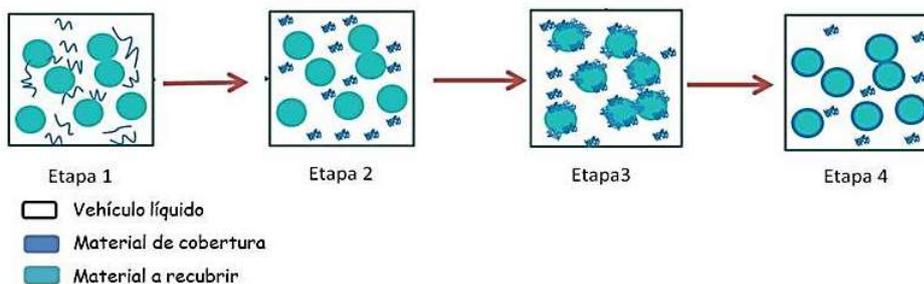


Figura 29: Esquema de la síntesis de micropartículas por coacervación compleja.

- *Compleja*: el proceso de separación de fases ocurre cuando en un medio acuoso se mezclan dos o más polímeros que presentan carga opuesta (policación y polianión), como consecuencia de la atracción electrostática entre ambos (figura 30).

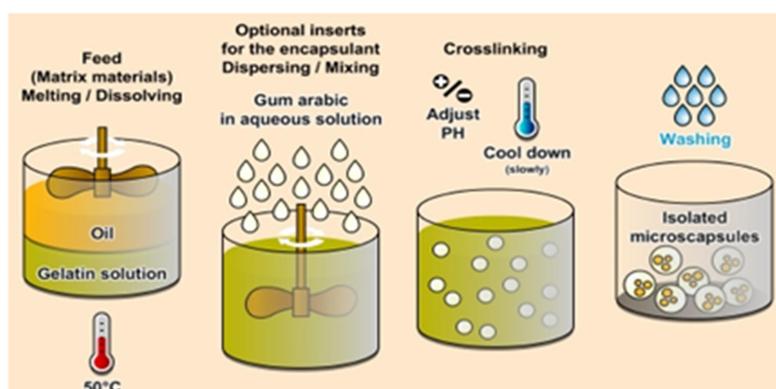


Figura 30: Esquema de la síntesis de micropartículas por coacervación compleja.

- ❖ **Extracción/evaporación disolvente**: se trata de un conjunto de procedimientos en los que el punto de partida común es la formación de una emulsión que puede ser del tipo aceite en agua (O/A), agua en aceite (A/O), aceite en aceite (O/O), en cuya fase externa se incorpora un agente tensioactivo. En la fase interna se encuentra el material de cubierta disuelto y también la sustancia que se ha de recubrir: si es una molécula lipofílica, la sustancia estará disuelta; si es una molécula hidrofílica, entonces estará dispersa. En este último caso se forma una emulsión triple (A/O/A) si la sustancia que se va a encapsular se dispersa en solución acuosa, o una dispersión del tipo S/O/A si la sustancia se

dispersa en forma sólida. La precipitación del material polimérico se logra al perderse el disolvente por su extracción / evaporación, mediada por su coeficiente de reparto entre las fases de la emulsión. Si el material que se empleará como cubierta es soluble en agua, se utiliza una emulsión agua-enaceite (A/O).

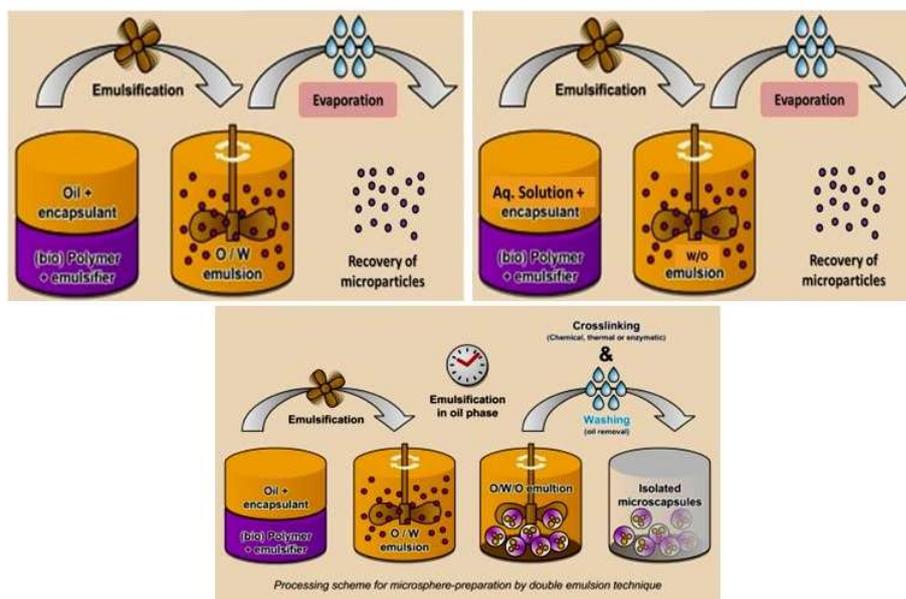


Figura 31: Esquema de la síntesis de micropartículas por extracción/evaporación del disolvente.

❖ **Secado por nebulización:** también conocido por “Spray drying”, es un proceso de una sola etapa para la preparación de partículas en polvo a gran escala, transformando un líquido en partículas secas por una nebulización o atomización del líquido inyectado en un medio seco y caliente. El proceso se divide en 3 fases:

- Nebulización del líquido inyectado en el nebulizador.
- Mezclado de las finas gotas creadas en la nebulización con una corriente de aire caliente para el evaporar el disolvente.
- Separación y recolección del polvo seco por la corriente de gas.

Generalmente producen una nebulización que contiene gotitas de diferentes tamaños y trayectorias, por lo que experimentan varios perfiles de secado en un mismo ambiente. Así pues, el producto nebulizado presenta variaciones en sus propiedades como el tamaño de partícula, morfología y microestructura, que afectan a las propiedades del producto final.

La formación de pequeñas gotitas en la nebulización es importante para permitir una buena evaporación del solvente que afecta a las propiedades finales del producto. Lo ideal sería que las gotitas tuvieran una distribución de tamaño lo más parecidas posible para evitar variación el secado de las mismas. Este tamaño se puede variar la energía de atomización además que variando el líquido a nebulizar.

El material de recubrimiento se disuelve en un disolvente apropiado, y en esta disolución se dispersa o disuelve el principio activo (sólido o líquido). Esta mezcla en estado líquido se nebuliza en una cámara de secado, en cuyo interior circula aire caliente a contracorriente. Cuando las pequeñas gotas del líquido se ponen en contacto con el gas a mayor temperatura, se produce una rápida evaporación del disolvente, formándose una fina película del material de recubrimiento que se encuentra disuelto en él y se obtienen las micro-nanopartículas. Estas partículas se recolectan por medio de un ciclón. Esta técnica se puede utilizar tanto para fármacos resistentes al calor, para los termosensibles, para fármacos solubles o insolubles en agua y para polímeros hidrofílicos o hidrofóbicos.

Un equipo de secado por atomización se compone, esencialmente, de un sistema de alimentación del líquido, un dispositivo de atomización, que por lo general consiste en una boquilla de atomización; una cámara de secado y un sistema colector del producto seco.

Las partículas sólidas se microencapsulan sometiendo a secado por atomización una suspensión de ellas en una disolución del agente de recubrimiento. Cuando el disolvente se evapora, el material de recubrimiento envuelve las partículas.

Los líquidos oleosos pueden microencapsularse emulsificándolos primero uno de ellos en una disolución acuosa del agente de recubrimiento y sometiéndolos, posteriormente, al proceso de secado por atomización. En este caso, al producirse la evaporación del agua, las gotitas de aceite son microencapsuladas por el material formador de la película. Con este procedimiento, pueden prepararse los denominados aceites sólidos, que contienen, generalmente, sustancias aromatizantes que se utilizan en preparados farmacéuticos, o perfumes que se emplean en la industria cosmética.

El producto que se obtiene por este procedimiento está constituido por microcápsulas de forma aproximadamente esférica y de un tamaño que varía entre 5 y 600 micras y que, casi siempre, presenta una cubierta porosa. Por esta razón, cuando se procesan materiales por este método es necesario emplear una baja proporción del ingrediente que va a constituir el material ya que, para asegurar una adecuada protección, es necesario que la cubierta ocupe un porcentaje importante de la microcápsula total. En el caso de la microencapsulación de aceites volátiles, se recomienda que el material no represente más del 20% del total de la microcápsula.

Se trata de un proceso que se puede producir a gran escala fácilmente, con bajo coste y consiguiendo partículas de pequeño tamaño, que permite reformularlas en forma de suspensiones, cápsulas o comprimidos. Las micropartículas obtenidas tienen un tamaño de una micra a varias decenas de

micras y son adecuadas para su administración por las vías oral, nasal o parenteral. Los parámetros del proceso de nebulización, como son el tipo de boquilla de alimentación utilizada, la velocidad de la bomba o el flujo de aire comprimido, permiten modular el tamaño de partícula (109–112).

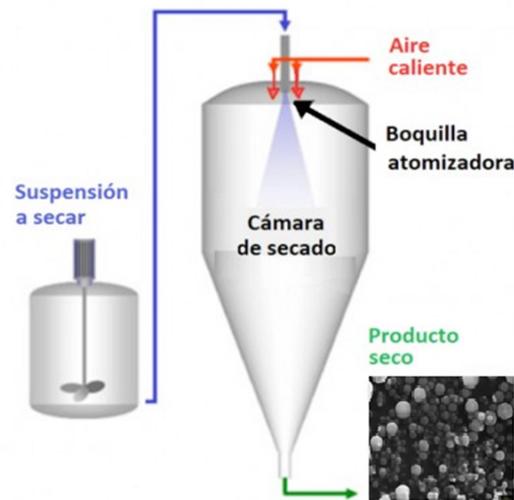


Figura 32: Esquema del funcionamiento del secado por nebulización.

- ❖ **Recubrimiento en lecho fluido:** las partículas de la sustancia a recubrir se disponen en un lecho fluido y sobre ellas, se nebuliza una solución del material de cubierta, que se deposita sobre las partículas y luego se solidifica por acción del aire en el propio lecho.

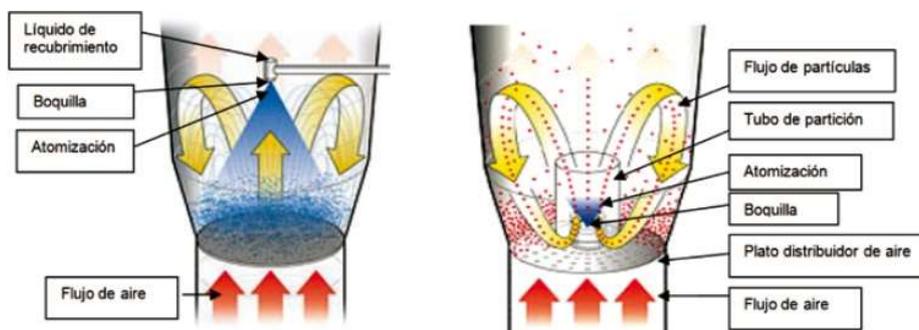


Figura 33: Esquema del funcionamiento del lecho fluido.

- ❖ **Gelificación iónica:** la formación de la cubierta de las microcápsulas tiene lugar por una reacción iónica entre un polisacárido y un ion de carga opuesta (113). Existen dos técnicas de gelificación:
 - Gelificación externa: Una sal de calcio soluble es agregada a una emulsión A/O. El tamaño de partícula no puede ser bien controlado y las partículas tienden a coagular en grandes masas antes de adquirir la consistencia apropiada. Además, el tamaño de partícula que se obtiene es grande, entre 400µm y 1mm.

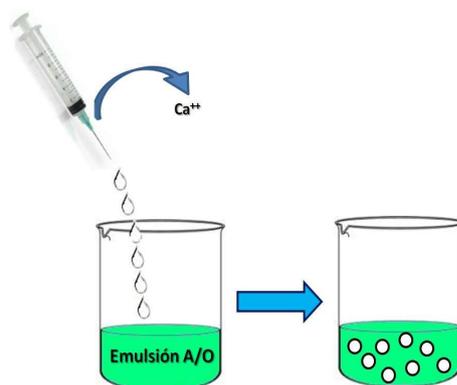


Figura 34: Esquema de gelificación iónica externa.

- Gelificación interna: se basa en la liberación del ión calcio desde un complejo insoluble en una solución de alginato de sodio (114,115). Esto se lleva a cabo por acidificación de un sistema aceite-ácido soluble, con participación en la fase acuosa del alginato. Esta técnica permite obtener partículas de un tamaño de aproximadamente 50 μm . De acuerdo con esta técnica, a la fase acuosa, generalmente formada por alginato y carbonato cálcico, se le adiciona la fase oleosa (aceite vegetal, Span[®] 80 y ácido acético).

❖ **Polimerización:** También hay dos modalidades para este método:

- *Polimerización Interfacial:* este proceso se produce en el seno de una emulsión. En la interfase se produce una polimerización que forma una membrana, que dará lugar a la formación de microcápsulas. Se puede partir de una emulsión en la que el monómero se encuentra disuelto en una de las fases y el iniciador en la otra, o de un sistema en el que se emplean dos monómeros, cada uno disuelto en una fase. En este último caso ocurre una policondensación en la interfase. Este proceso tiene lugar en tres pasos:
 1. Dispersión de una solución acuosa de un reactante soluble en agua, en una fase orgánica para producir una emulsión agua en aceite (A/O).
 2. Formación de una membrana polimérica en la superficie de las gotas de agua, iniciada por la adición a la emulsión anterior, de un complejo soluble en aceite.
 3. Separación de las microcápsulas de la fase orgánica y su transferencia en agua para dar una suspensión acuosa. La separación de las microcápsulas se puede llevar a cabo por centrifugación.

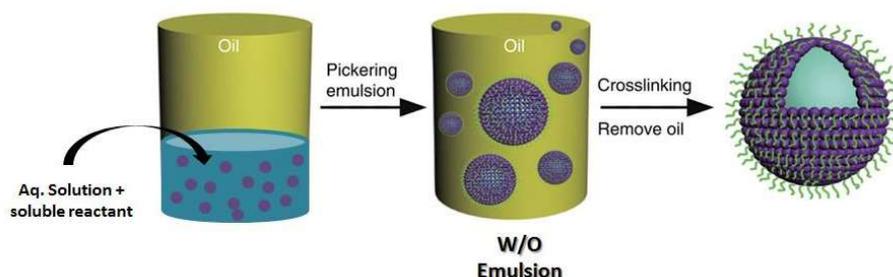


Figura 35: Esquema de la síntesis de micropartículas por el método de polimerización interfacial.

- *Polimerización Heterogénea*: la encapsulación ocurre en un sistema disperso en el que las micropartículas resultantes pueden tener tamaños variados, que depende de la técnica específica que se utilice.

*OBJETIVOS Y
PLAN DE TRABAJO*

OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

Actualmente se están buscando alternativas para la administración de fármacos por vía oral destinados a su liberación específica a nivel colónico, ya que presentan una serie de ventajas, tanto para el tratamiento de enfermedades del colon, como para evitar los posibles efectos sistémicos de las formas farmacéuticas convencionales, derivados de una administración oral. Por tanto se disminuye la dosificación y se mejora así su seguridad y eficacia.

De hecho, la liberación colónica podría permitir la administración vía oral de fármacos que muestran una mala absorción en el estómago e intestino, ya que no van a absorberse hasta su llegada al colon; también es útil en el caso de fármacos polares o susceptibles de degradarse en la parte superior del tracto gastrointestinal, entre los que se encuentran proteínas y péptidos. Además, para fármacos empleados en el tratamiento de infecciones, como amebiasis o helmintiasis o para aquellos fármacos que requieren una acción o un efecto local como para el tratamiento del cáncer de colon, o destinados a enfermedades específicas de esta zona como la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), etc.

Sea cual sea el lugar de acción del fármaco, el desarrollo y el objetivo de la administración de fármacos dirigidos al colon es que no se absorban en otras regiones del tracto gastrointestinal. En consecuencia, habrá que evitar que se degraden en el estómago, sufriendo solo una degradación imperceptible en el lumen del intestino delgado para llegar al colon de la forma más inalterada posible. En otras palabras, se trata de evitar el efecto del contenido ácido del estómago, así como el de las enzimas del intestino delgado, por lo que hay que dotar al medicamento de una serie de características específicas.

En el tratamiento de patologías específicas, tales como la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa, en las que son necesarias altas concentraciones de fármaco, puede lograrse una mejoría importante y de forma más efectiva, debido a una liberación específica del fármaco a nivel colónico evitando así los efectos adversos relacionados con la absorción sistémica.

En la introducción de la presente memoria se ha realizado un estudio de la anatomía y características fisiológicas del intestino, de la etiología de la enfermedad inflamatoria intestinal y de los fármacos y formas farmacéuticas que se emplean en el tratamiento de la enfermedad, haciendo especial hincapié en las de la vía oral.

En la EII se engloban a un grupo de enfermedades que comparten la característica de producir una inflamación crónica del tracto gastrointestinal, debido a una respuesta a microorganismos presentes en la flora intestinal, en individuos genéticamente susceptibles. Se produce una mutación de ciertos genes relacionados con estas patologías, que originan una ruptura de la regulación de la respuesta inmune en los

pacientes, ocasionando una respuesta inadecuada del sistema inmunitario que provoca una inflamación continuada. Además, también se produce una ruptura de la barrera epitelial provocando una rotura de la homeostasis en la mucosa intestinal provocando que las bacterias comensales se vuelvan patógenas, generando igualmente una inflamación crónica.

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos, el objetivo principal de este trabajo es el diseño de una forma farmacéutica, que permita la administración oral de ciprofloxacino, de manera que este antibiótico llegue lo más inalterado al colon y se vaya liberando localmente de forma gradual. Nuestro interés reside en mantener la concentración eficaz durante el mayor tiempo posible, evitando los efectos adversos relacionados con la escasa liberación selectiva del fármaco que presentan las formas farmacéuticas convencionales.

Para llevar a cabo este objetivo, en este trabajo de investigación se hicieron los siguientes planteamientos:

- Caracterización física de los polímeros quitosano, Eudragit® RL PO y Eudragit® RS PO utilizados para la obtención de micropartículas de ciprofloxacino, mediante DSC y TG.
- Diseño y elaboración de micropartículas portadoras del ciprofloxacino por dos procedimientos: secado por nebulización y evaporación del disolvente.
- Caracterización física (DSC y TG) de las formulaciones empleadas en la elaboración de las micropartículas.
- Caracterización física de las micropartículas, en cuanto a su granulometría, carga (%) y rendimiento del proceso de encapsulación.
- Estudio de disolución “in vitro” de las micropartículas para seleccionar las que proporcionan un perfil de liberación del fármaco más acorde a nuestro objetivo.
- Estudio de la cinética de disolución “in vitro”, de las micropartículas, determinando cuál es el modelo matemático que mejor describe su comportamiento de disolución.
- Estudio “in vivo” y “ex vivo” de la cesión del fármaco desde las micropartículas.
- Diseño y elaboración de una forma farmacéutica para conseguir que las micropartículas seleccionadas accedan al colon y liberen al fármaco.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Ciprofloxacino clorhidrato (Cipro): Es el antibiótico utilizado en nuestro estudio y ha sido suministrado por Guinama S.A., de nombre químico monohidrato del ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolincarboxílico, monohidratado [$C_{17}H_{18}FN_3O_3 \cdot HCl \cdot H_2O$] (figura 36) (116–119). Se trata de un antibiótico de amplio espectro antibacteriano, perteneciente al grupo de las fluoroquinolonas con efectos bactericidas. Está incluido, según los autores en la Clase II/ Clase IV en el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (120,121).

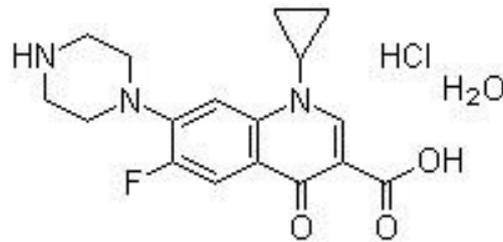


Figura 36: Estructura química de ciprofloxacino

Se presenta como polvo cristalino casi blanco o amarillo pálido, ligeramente higroscópico. Su peso molecular es de 385.84 y es soluble en agua (1 g en 10-30 ml), poco soluble en metanol, muy poco soluble en etanol anhidro y prácticamente insoluble en acetona, en acetato de etilo y en cloruro de metileno. Es estable, fotosensible y contiene no menos del 98.0 %, no más del equivalente al 102.0 % del hidrocloreto del ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolono-carboxílico y un contenido en agua de 4,7 a 6,7%. Su punto de fusión aproximado de 318-320° C y tiene un pH de 3 a 4,5 (pKa1: constante de ionización del grupo 3 carboxílico=6, pKa2: constante de ionización del grupo n-4 piperacínico= 8.8)(117,119,122,123).

Por ser una fluoroquinolona va a caracterizarse por una rápida absorción, en comparación con las quinolonas. Además su concentración en orina excede las CMI de todos los patógenos comunes. Posee una amplia distribución en los tejidos, con un volumen de distribución que varía de 2,1 a 5 l/kg y su unión a proteínas plasmáticas de aproximadamente un 30%. Su excreción se realiza fundamentalmente por riñón, aunque una pequeña parte se metaboliza en hígado y por ello se puede encontrar menos de un 1% en bilis. Su vida media es larga, permitiendo una dosificación en intervalos de 12-24h.

Quitano (CS): El quitano se sintetiza mediante una desacetilación parcial de la quitina (figura 37). Se trata de un polisacárido natural, biodegradable y no tóxico obtenido a partir del exoesqueleto de crustáceos, moluscos, o de animales invertebrados, insectos y ciertos hongos. Por tanto quitina y quitano tienen estructuras muy parecidas siendo ambos polisacáridos lineales compuestos por cadenas de β -(1-4) D-glucosamina (unidad desacetilada) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada) distribuidas aleatoriamente (41,124,125).

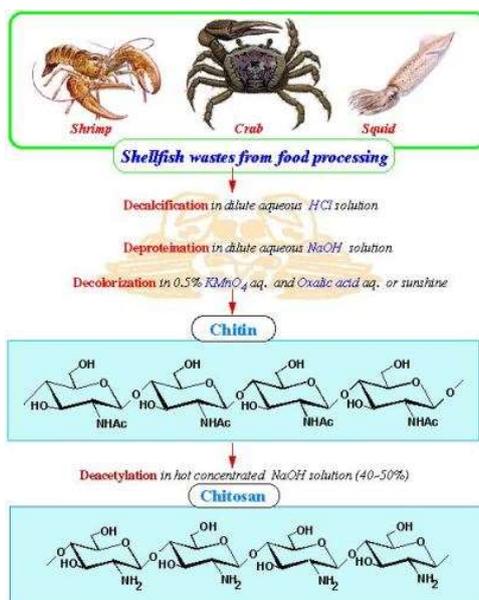


Figura 37: Síntesis y estructura química del quitosano (104).

El porcentaje de estas unidades de N-acetil-D-glucosaminas se define como el grado de desacetilación (DDA) del quitosano, que es un parámetro importante que determina muchas propiedades fisicoquímicas y biológicas tales como la solubilidad, la biodegradabilidad y la biocompatibilidad del polímero. El proceso de desacetilación es relativamente duro y consiste en la eliminación de grupos acetilo de la cadena molecular de quitina por tratamiento con NaOH concentrado en un período prolongado de tiempo, eliminando los grupos amino ($-NH_2$) (figura 38). Para evitar reacciones secundarias indeseables tales como generación de especies reactivas y despolimerización, esta desacetilación de la quitina suele llevarse a cabo en presencia de nitrógeno o por la adición de borohidruro de sodio a la solución de NaOH (126).

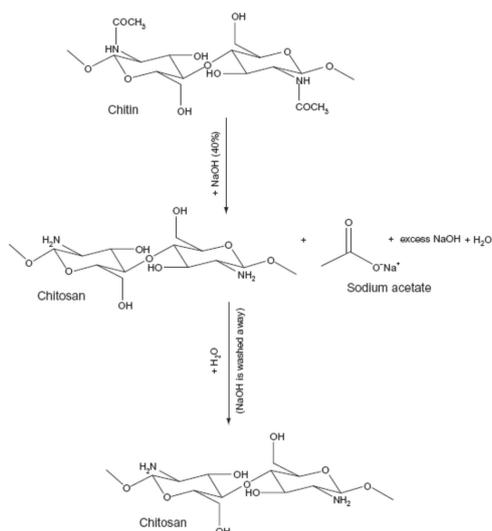


Figura 38: síntesis del quitosano a partir de quitina

Otro parámetro importante es el peso molecular del quitosano ya que también afecta a las propiedades fisicoquímicas del polímero como a la solubilidad, aumentando en soluciones ácidas cuando el peso molecular es menor (42,127).

El quitosano se utiliza para multitud de efectos. Es un polímero quelante, eficaz para eliminar iones metálicos, debido a los grupos amino primarios distribuidos por su cadena. Por ello, se ha utilizado como soporte cromatográfico para la concentración de iones y la resina para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con metales tóxicas. En solución se comporta como un polielectrolito catiónico por lo que se emplea como floculante en el tratamiento de aguas residuales. En la industria alimentaria se ha empleado, por dicho carácter catiónico, en el tratamiento de zumos de frutas y vinos. Posee además actividad antifúngica, por lo que se emplea en el desarrollo de cultivos, ya que promueve cambios metabólicos que permiten el aumento de la germinación y mayores rendimientos.

En Tecnología Farmacéutica se ha utilizado por diversas razones. Posee una excelente capacidad para formar películas con capacidad de hinchamiento limitada en agua. Dicha capacidad ha sido utilizada para su uso en matrices con diferentes grados de hidrofiliidad al unirse con otros polímeros altamente hidrófilos. Además se trata de un polímero mucoadhesivo, por lo que proporciona numerosas aplicaciones en medicina y la industria farmacéutica. Posee además actividad antimicrobiana, antiviral y antitumoral, además de poseer actividad inmunoadyuvante.

Por todas sus características es un buen polímero para la fabricación de matrices ya sean en microesferas, microcápsulas, membranas y comprimidos para la liberación de fármacos (128–133).

En este trabajo se ha empleado para la obtención de micropartículas matriciales para la liberación de Cipro en el colon de forma controlada.

El quitosano utilizado, de bajo peso molecular y con grado de desacetilación superior al 75%, ha sido suministrado por Sigma-Aldrich.

Eudragit®: Bajo este nombre registrado, se encuentran estos derivados de ésteres de ácido acrílico y metacrílico cuyas propiedades fisicoquímicas son determinadas por los grupos funcionales presentes en su molécula (134). Se encuentran disponibles en diferentes formas físicas (dispersiones acuosas, soluciones orgánicas, gránulos y polvos). En este trabajo, las micropartículas se han elaborado utilizando, Eudragit® RL PO (ERL) y Eudragit® RS PO (ERS) (130), que se presentan como polvos insolubles. Son copolímeros de acrilato de etilo, metacrilato de metilo y un bajo contenido de un éster del ácido metacrílico con grupos de amonio cuaternario (cloruro de metacrilato trimetilamonioetil). Los grupos de amonio están presentes como sales y hacen que los polímeros sean más o menos permeables. La fracción molar de acrilato de etilo, metacrilato de metilo y cloruro de metacrilato trimetilamonioetil es aproximadamente 1:2:0.2 en ERL y 1:2:0.1 en ERS (134–139). En la figura 39 podemos observar la estructura química de dichos polímeros.

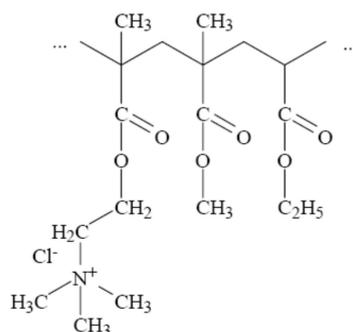


Figura 39: Estructura de ERL y ERL.

Se pueden observar diferencias entre ambos polímeros, ya que ERS con un 5% de amonios cuaternarios en su estructura, es menos permeable que ERL, que contiene un 10%. Ambos tipos de Eudragit[®] presentan un hinchamiento independiente del pH, que permite una liberación controlada del principio activo. Ambos van a tener el mismo valor medio de peso molecular 32.00 g/mol, y se van a diferenciar en el valor álcali en donde encontramos que ERL tiene un valor de 28,1 mg KOH/g polímero, mientras que ERS tiene un valor de 15,2 mg KOH/ g de polímero. Tienen temperaturas de transición vítreas parecidas 63° C (+/- 5° C) para ERL, y de aproximadamente 65° C para ERS (140).

Ambos Eudragit[®] fueron facilitados por Evonik Industries (140).

Pectina: Las pectinas son un tipo de heteropolisacáridos, mezcla de polímeros ácidos y neutros muy ramificados que se componen principalmente de ácidos poligalacturónicos coloides (derivados del ácido galacturónico CHO(CHOH)₄COOH). Podemos ver su estructura en la figura 40. Se encuentran en los tejidos de las plantas y constituyen el 30 % del peso seco de la pared celular primaria de células vegetales. Las pectinas son útiles por su capacidad, en presencia de agua, para formar geles o jaleas con compuestos polihidroxilados, como los azúcares, o con cantidades diminutas de iones polivalentes. Determinan la porosidad de la pared, y por tanto, el grado de disponibilidad de los sustratos de las enzimas implicadas en las modificaciones de la misma. Las pectinas también proporcionan superficies cargadas que regulan el pH y el balance iónico (117,119,122).

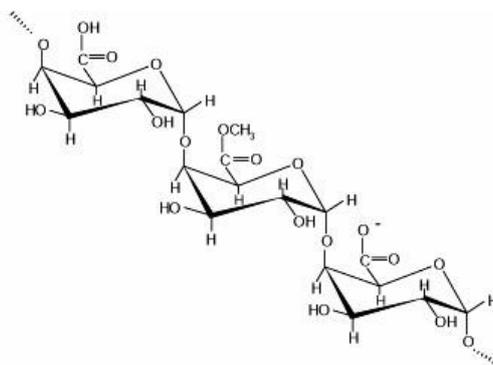


Figura 40: Estructura de las pectinas

Estos polisacáridos permanecen intactos en el entorno fisiológico del estómago y del intestino, pero son degradados por la población bacteriana del colon humano, ya que contiene una enzima llamada Pectinasa capaz de hidrolizarlos (91,134,141,142).

La pectina, proporcionada por Guinama S.A., se ha utilizado, junto con hidroxipropilmetilcelulosa para el recubrimiento de los comprimidos.

Pectinex® Ultra SP-L: Es una Pectinasa, compuesta por enzimas pectinolíticas activas producidas por diferentes tipos de hongos y bacterias. En nuestro trabajo utilizamos la obtenida por *Aspergillus aculeatus* (solución acuosa con ≥ 3.800 units/mL), que contiene principalmente pectintranseliminasa, poligalacturonasa y pectinesterasa, además de pequeñas cantidades de hemicelulasa y celulasas. Las pectinasas son capaces de descomponer o separar grupos pectínicos, sustratos la pectina (143–145).

Pectinex Ultra SP-L ha sido suministrado en este trabajo por Sigma- Aldrich.

Methocel®: Hidroxipropilmetil celulosa (HPMC) o “Hypromellose”. Es un derivado celulósico semisintético, inerte y viscoelástico. Se define como una celulosa parcialmente O-metilada y O-2hidroxipropilada (117–119,122,134).

Hay una amplia variedad de derivados que se diferencian en la viscosidad y en el grado de sustitución y que se utilizan fundamentalmente en formas farmacéuticas tópicas y orales. En las orales, se emplean como aglutinantes, para elaborar comprimidos matriciales de liberación prolongada y en recubrimiento pelicular (134,141,146–150).

En este estudio utilizaremos Methocel® K100 MCR para recubrir los comprimidos que llevan las micropartículas, protegiéndolas del pH ácido del estómago, para alcanzar el colon. Esta capa de recubrimiento es una mezcla de HPMC y pectina. Con la pectina sola no se consigue una eficaz protección del núcleo, por lo que se adiciona HPMC en una proporción óptima para conseguir nuestro objetivo. Se han realizado varios estudios que demuestran que esta cubierta resulta eficaz para lograr una liberación colónica. Ugurlu et al. realizan un estudio de dicho recubrimiento variando los porcentajes de pectina y HPMC a fin de recubrir comprimidos de nisina para lograr una liberación colónica. Hodjes et al. desarrollan un estudio in-vivo de comprimidos recubiertos con pectina-HPMC y Turkoglu y Ugurlu estudian comprimidos recubiertos con pectina:HPMC a distintas proporciones para una liberación colónica de 5-ASA (81,141,147,151,152).

El Methocel® utilizado en el estudio ha sido suministrado por Colorcon Limited.

Na-CMC: Carboximetilcelulosa sódica o “Carmelosa cálcica”. Se trata de una sal sódica de un éter policarboximético de celulosa. Se presenta como polvo granuloso, blanco o casi blanco, higroscópico tras su desecación. Se dispersa fácilmente en agua dando soluciones coloidales y es prácticamente insoluble en acetona, en etanol

al 96% y en tolueno (117,119,122,134). Oscurece a aprox. 227°C y se quema aproximadamente a 252° C. Contiene no menos de 6.5% y no más de 9.5% de sodio.

Se utiliza principalmente en formas farmacéuticas tópicas, parenterales y orales líquidas, por sus propiedades viscosizantes (estabilizante de suspensiones y emulsiones). También se puede utilizar en comprimidos como aglutinante y como disgregante.

En este trabajo, se ha utilizado como disgregante en los comprimidos para que las micropartículas se liberen rápidamente, una vez que alcanzan el colon (153).

Este polímero ha sido suministrado por Hoechst Ibérica S.A.

Ácido acético glacial: se utiliza para solubilizar el quitosano ya que solo es soluble en soluciones acidas (pH<6)(42,154). En la figura 41 se presenta la reacción que ocurre tras la adición del ácido acético glacial a la solución de quitosano.



Figura 41: Reacción química entre quitosano y ácido acético.

Otros materiales utilizados

Etanol absoluto: Utilizado como disolvente de los polímeros ERL y ERS, en la síntesis de micropartículas por el método de spray dryer. Suministrado por Scharlau.

Acetona: utilizada como disolvente en el método de síntesis de evaporación del disolvente. Suministrada por Guinama S.A.

Estearato magnésico: utilizado como lubricante. Proporcionado por Guinama S.A.

Parafina líquida: medio dispersante en la síntesis de micropartículas por el método de evaporación del disolvente. Suministrada por Guinama S.A.

n-hexano: utilizado para lavar las micropartículas obtenidas por el método de evaporación del disolvente eliminando así restos de disolventes del proceso. Facilitado en este estudio por Prolabo.

MÉTODOS

1. Preparación de las micropartículas.

Inicialmente se preparan distintos tipos de micropartículas para conseguir una liberación prolongada en el colon. Para ello, se utilizan dos polímeros distintos, quitosano y Eudragit®. Se describen a continuación los procedimientos de elaboración utilizados.

1.1. *Micropartículas de quitosano.*

Estas micropartículas se consiguen gracias a un secado por nebulización tal y como describen He, Mi y Vehring en sus respectivos estudios (111,155,156). Se mantiene bajo agitación magnética durante 24 horas una solución acuosa de CS en ácido acético al 2% para conseguir una correcta hidratación del polímero. A continuación, se añade el Cipro y se deja en agitación otras dos horas y finalmente esta solución resultante se somete a una evaporación/desecación en un nebulizador Mini Spray Dryer B-290 (Büchi) (Figura 42). Se hace llegar la solución a desecar, gracias a una bomba peristáltica, a la cámara de secado del instrumento mediante un flujo de aire comprimido a una temperatura de 120° C, en donde se nebuliza a través de una boquilla de 0.5 mm. Las micropartículas se forman tras la evaporación del disolvente por un flujo de aire caliente (80 ° C) aspirado por una bomba. Las partículas obtenidas se separan gracias a un ciclón, recogiénolas en un vaso colector.

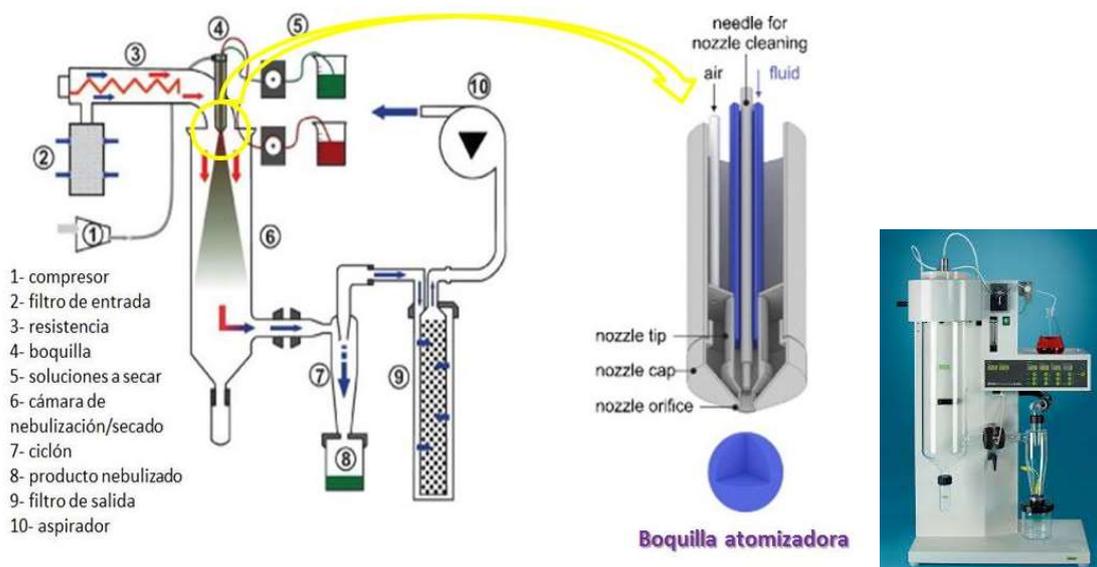


Figura 42: Esquema del funcionamiento (157) e imagen del Mini Spray Dryer B-290 (Büchi)

La composición de las formulaciones utilizadas para la preparación de las micropartículas, bajo estas condiciones, se recogen en la tabla 3.

Tabla 3: Composición de las formulaciones para preparar las micropartículas de quitosano: porcentajes de quitosano y de ciprofloxacino y volumen de producto a nebulizar.

Muestras	Quitosano (%)	Ciprofloxacino (%)	Volumen (ml)	Proporción fármaco:polímero
1	0.5	4	200	8:1
2	2	4	200	2:1
3	0.5	1	200	2:1
4	0.5	4	50	8:1
5	0.5	1	50	2:1
6	2	1	50	1:2
7	2	1	200	1:2
8	2	4	50	2:1
9	2	4	200	2:1
10	0.5	1	200	2:1
11	0,5	4	50	8:1
12	2	4	50	2:1
13	2	1	50	1:2
14	0.5	1	50	2:1
15	2	1	200	1:2
16	0.5	4	200	8:1

Se realiza un estudio 2^3 con dos réplicas, las cuales se elaboran todas de forma independiente para luego comparar los estudios como réplicas.

1.2. Micropartículas de Eudragit

Para prepararlas, se utilizan dos técnicas: secado por nebulización y evaporación del disolvente.

Secado por nebulización: A una solución de ERL, ERS o mezcla de ambos en etanol absoluto, se le añade Cipro y se mantiene bajo agitación magnética dos horas. La solución resultante se deseca bajo las mismas condiciones descritas en el punto 2.1.1, mostrando en la tabla 4 todas las formulaciones empleadas (158–160).

Tabla 4: Composición de las formulaciones para preparar las micropartículas de Eudragit® mediante secado por nebulización.

Muestras	Fármaco:Polimero	Eudragit®	Ciprofloxacino	Etanol
1sp	2:1	500 mg ERS	1 g	100 ml
2sp	2:1	500mg ERL	1 g	100 ml
3sp	2:1	250 mg ERS+250 mg ERL	1 g	100 ml
4sp	1:1	1 g ERS	1 g	100 ml
5sp	1:1	1 g ERL	1 g	100 ml
6sp	1:1	500 mg ERS+500 mg ERL	1 g	100 ml
7sp	1:2	2 g ERS	1 g	100 ml
8sp	1:2	2 g ERL	1 g	100 ml
9sp	1:2	1 g ERS+1 g ERL	1 g	100 ml

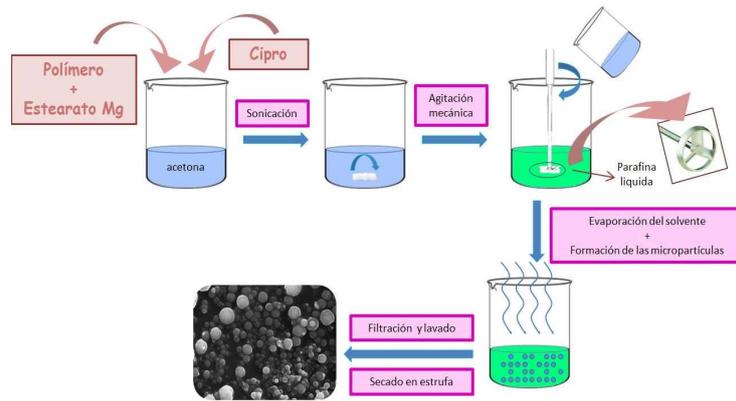


Figura 43: Esquema de síntesis de micropartículas por el método de evaporación del disolvente

Evaporación del disolvente: a una solución de ERS, ERL o mezcla de ambos en 5 ml de acetona se añade Cipro y el estearato magnésico (30 mg) y se mantiene en agitación magnética durante 30 minutos, A continuación, se lleva a un baño de ultrasonidos hasta la dispersión total. Una vez obtenida, se adiciona a un vaso de precipitados con 150 ml de parafina líquida y se mantiene en agitación mecánica con un agitador de varillas de tipo disco (Lab Digital Stirrer, Remi) con un diámetro de 50mm durante 3 horas a 700 rpm para conseguir la evaporación total de la acetona. Durante este proceso se forman las micropartículas que se recogen por filtración a vacío, se lavan 3 veces con 30 ml de n-hexano y se desecan en una estufa a 25-30° C durante 24 horas (153,161–165). El esquema de dicha síntesis viene representado en la figura 43.

Las diferentes formulaciones utilizadas se recogen en la Tabla 5.

Tabla 5: Composición de las formulaciones para preparar las micropartículas de Eudragit® mediante evaporación del disolvente

<i>Muestras</i>	<i>Fármaco:Polímero</i>	<i>Eudragit®</i>	<i>Ciprofloxacino</i>
1ev	2:1	50 mg ERS	100 mg
2ev	2:1	50mg ERL	100 mg
3ev	2:1	25 mg ERS+25 mg ERL	100 mg
4ev	1:1	100 mg ERS	100 mg
5ev	1:1	100 mg ERL	100 mg
6ev	1:1	50 mg ERS+50 mg ERL	100 mg
7ev	1:2	200 mg ERS	100 mg
8ev	1:2	200 mg ERL	100 mg
9ev	1:2	100 mg ERS+100 mg ERL	100 mg

Todas las micropartículas elaboradas mediante cualquier procedimiento y con cualquier polímero fueron almacenadas en desecadores hasta la realización de las pruebas.

2. Pruebas físicas

Tamaño de partícula

El análisis granulométrico de las micropartículas se realiza con un Mastersizer Hydro 2000 μ P (A). Su finalidad es obtener la distribución por tamaño de las partículas presentes en la muestra estudiada. Se programó el equipo para realizar 3 mediciones, lo que el resultado final es la media de las tres mediciones.

Rendimiento del proceso de encapsulación

El rendimiento se determina mediante la ponderación de las micropartículas obtenidas con respecto a la cantidad inicial de material utilizado en el proceso (cantidad de polímero y de principio activo) (164).

$$\text{Rendimiento}(\%) = \frac{\text{cantidad de micropartículas obtenidas}}{\text{Cantidad inicial de producto (polimero + \acute{a}rmaco)}} \times 100$$

Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación se determina disolviendo 10 mg de las micropartículas obtenidas en 25 ml de un solución reguladora de HCl pH 1.2 por duplicado. Las soluciones se mantienen bajo agitación magnética durante 24 h realizando diluciones de 1:10, 1:20, y 1:40 que se analizan espectrofotométricamente (Perkin Elmer Lamda 35) a una longitud de onda de 277 nm. Mediante una curva de calibrado estándar se determina el contenido de Ciprofloxacino de las micropartículas.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se realizan estudios de DSC mediante un calorímetro diferencial de barrido (Mettler Toledo mod. DSC1) de los productos puros y de las micropartículas de quitosano y de Eudragit[®]. Se trata de una técnica termoanalítica en la que la diferencia de calor entre una muestra y una referencia es medida como una función de la temperatura. Con esta técnica podemos determinar la cantidad de calor absorbido o eliminado durante los procesos exotérmicos (tales como una cristalización) o endotérmicos (como un cambio de sólido a líquido). Así pues podemos utilizarla para medir varias propiedades características de una muestra pura, como los procesos de fusión, cristalización o temperaturas de las transiciones vítreas entre otras, y comprar su variación tras el proceso de síntesis en las micropartículas al producirse interacciones (166).

Análisis termogravimétricos (TGA)

Todas las micropartículas de quitosano, de Eudragit[®], además de los productos puros, se someten a un análisis termogravimétrico (TGA) en el analizador termogravimétrico Mettler-Toledo mod. TGA/DSC1 HT7/851. Se trata de una técnica en la que los cambios en las propiedades físicas y químicas de los materiales son medidos como una función del incremento de temperatura (con un flujo de calor constante) o como una función del tiempo (con temperatura o pérdida de masa constante). En este caso se mide el peso de una muestra frente a la temperatura, mientras se somete la muestra a un programa de temperatura de 0 a 950° C con una velocidad de calentamiento controlada de 10°C/min en una atmósfera de nitrógeno. TGA puede proporcionar información acerca de los fenómenos físicos, como las transiciones de fase de segundo orden, incluyendo la vaporización, sublimación, absorción, adsorción y desorción. Asimismo, TGA puede proporcionar información acerca de los fenómenos químicos incluyendo quimisorción, desolvation (especialmente deshidratación), descomposición y reacciones sólido-gas (por ejemplo, oxidación o reducción). Podemos ver dichos efectos en las sustancias puras y compararlos con los de las micropartículas para ver si varían, debido a las posibles interacciones que se produzcan en la síntesis (166).

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se realizaron estudios de SEM mediante un microscopio electrónico de barrido Hitachi S-510. Con esta técnica se puede observar la apariencia física de las micropartículas, su morfología, superficie, si existe o no agregación entre ellas, si la muestra es homogénea, el tamaño y la distribución de las mismas, etc. El inconveniente es que utiliza condiciones de vacío, y al enfocar las micropartículas para observarlas con detenimiento se provoca su ruptura en un porcentaje muy elevado de las mismas.

Microscopía diferencial de barrido ambiental (ESEM)

Se realizaron estudios de ESEM (167) mediante un microscopio electrónico de barrido ambiental FEI mod. Quanta 400. Con esta técnica se puede observar de igual forma la apariencia física de las micropartículas, su morfología, superficie, etc, pero la ventaja de esta técnica es que se utilizan presiones ambientales, lo cual permite visualizar bien las muestras puesto que no se destruyen.

3. Preparación de comprimidos

De las micropartículas preparadas, se seleccionan las más adecuadas para conseguir una liberación prolongada del principio activo en el colon y con ellas se elaboran comprimidos (núcleos) que luego se recubren por compresión para protegerlas del medio gástrico y de las primeras porciones del intestino, y conseguir que lleguen lo más inalteradas al colon. En otras palabras, se van a elaborar comprimidos recubiertos por compresión (o de doble capa).

Los comprimidos constituyentes del núcleo están compuestos por 55 mg de micropartículas, 40 mg de Na-CMC, utilizado como disgregante, y 5 mg de estearato magnésico, como lubricante. En la figura 44 se describen esquemáticamente los pasos seguidos: se mezclan todos los componentes siguiendo la regla de las diluciones seriadas durante 10 min y se comprime la mezcla en una prensa hidráulica (Specac®) (Figura 45) con punzones de 7 mm de diámetro. En un principio, se utilizan distintas presiones: 1, 2 y 3 tons durante 1 minuto (81) y el estudio de disolución nos permitirá escoger los comprimidos que constituirán el núcleo a recubrir.

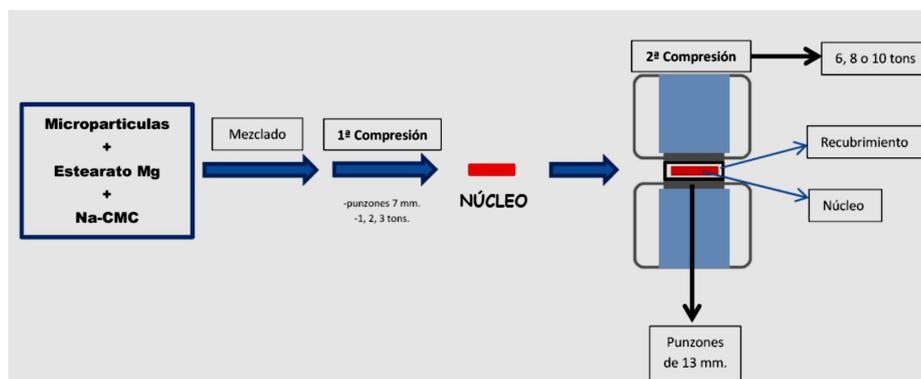


Figura 44: Esquema elaboración de los comprimidos.



Figura 45: Imagen de prensa hidráulica Specac®

El recubrimiento se compone de una mezcla de HPMC y Pectina en una proporción de 20:80. Ésta cubierta ha sido estudiada por numerosos autores, tales como Ugurlu, Shukula, Hodges y Turkoglu ya que realizan estudios variando las proporciones de pectina y HPMC para conseguir la proporción adecuada que resista el paso por el estómago e intestino y alcance el colon lo más intacta posible (141,147,151,152). Se mezclan ambos polímeros y siguiendo las indicaciones de Orlu et al. (81), se utilizan 400 mg de mezcla para conseguir un recubrimiento óptimo. En la misma prensa hidráulica utilizada para la elaboración de los núcleos, esta vez con punzones de 13 mm, se coloca el 50% de la mezcla de polímeros sobre el punzón inferior, con unas pinzas se coloca el núcleo (comprimidos de 1 ton) en el centro de la cámara de compresión y a continuación, se adiciona el otro 50% de la mezcla. Finalmente se comprime el conjunto utilizando tres presiones 6, 8 y 10 tons durante 3 minutos.

Como en el caso de los núcleos, el estudio de disolución nos permitirá seleccionar los comprimidos recubiertos más adecuados a nuestro objetivo.

4. Ensayo de disolución

El dispositivo utilizado para los ensayos de disolución es el aparato I (de cestillos) de la USP (Sotax AT7 Smart) (figura 44). El aparato consta de un baño termostático en el que se encuentran 6 vasos de disolución con capacidad para 1000 ml cada uno con su correspondiente cestillo con posición fija y centrada en el vaso. El vástago del agitador posee un prefiltro (rejilla de acero inoxidable) para la toma automática de muestras en lugar fijo (zona intermedia del vaso) y un filtro (fibra de vidrio) en el cabezal de salida superior que origina la filtración fina de la muestra. La velocidad de agitación utilizada es de 50 rpm y la temperatura del baño $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (168,169).

El equipo dispone de una tapa que cierra el baño termostático y los vasos, evitando la pérdida de volumen de medio de disolución por evaporación.

Se toman muestras a intervalos predeterminados de tiempo sin reponer el medio, debiendo utilizar un factor de corrección para los cálculos posteriores. Todas las formulaciones se analizan por sextuplicado.



Figura 46: Aparato de disolución (Sotax AT7 Smart).

Se realizan ensayos de disolución utilizando distintas soluciones reguladoras según el fin requerido.

- Con las micropartículas se realizan dos tipos de ensayos:
 - Con solución reguladora de HCl a pH 1.2 para simular el paso de las micropartículas por el estómago.
 - Con solución reguladora o tampón fosfato salino (PBS) a pH 7.4 para simular el paso de las micropartículas por el colon donde ejercerán su acción (87,170).
- Con los comprimidos se pretende simular el paso por el estómago y por el intestino hasta llegar al colon. Así, se comienza el ensayo con una solución de

HCl a pH 1.2 durante 2 horas y se continúa el ensayo cambiando el medio a PBS pH 7.4. Tras 6 horas en esas condiciones, se adiciona el Pectinex[®] Ultra SP-L para simular la llegada del comprimido al colon, donde se encuentran las enzimas pectinasas (81,152).

5. Análisis espectrofotométrico de las muestras.

Las muestras obtenidas tras el ensayo de disolución se analizan espectrofotométricamente utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 35 UV/Visible y se determina la cantidad de ciprofloxacino mediante una curva de calibración.

5.1. Determinación de la longitud de onda de máxima absorción.

Se realiza la determinación de la longitud de onda (λ) de máxima absorción para conocer la λ a la cual medir las muestras en cada uno de los medios utilizados. Se realiza en agua y en los dos medios en los que se realizaron los ensayos de disolución.

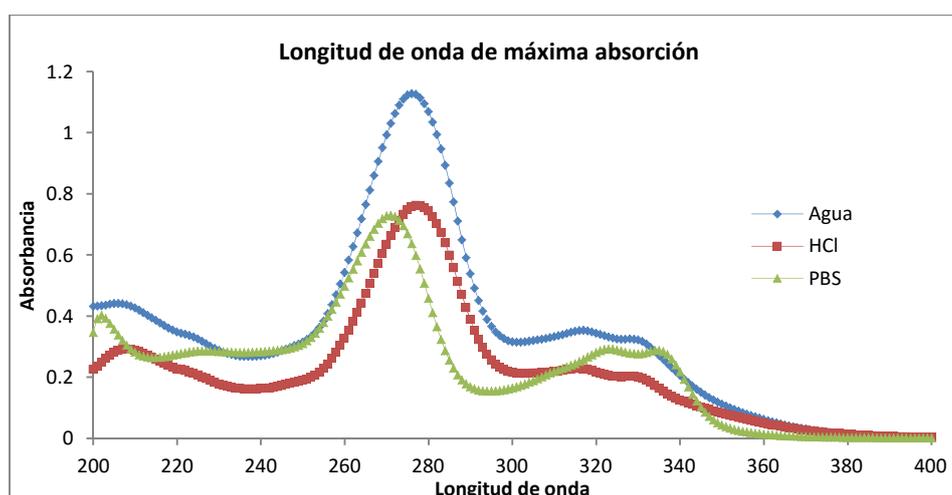


Figura 47: Curva de λ para ciprofloxacino en agua PBS y solución reguladora de HCl.

Las longitudes de onda de máxima absorción son:

- Agua= 276 nm.
- Solución reguladora de HCl pH 1.2= 277 nm.
- Solución reguladora PBS pH 7.4= 271 nm.

5.2. Validación del método analítico.

Para determinar si dicho método es correcto para la determinación de la cantidad de fármaco en las muestras, previamente se realiza una valoración del método analítico (171–175).

Se realizan tres curvas patrón: una en agua, otra en tampón PBS pH 7.4 y en tampón HCl pH 1.2, siguiendo el mismo protocolo.

Dichas curvas son el promedio de dos soluciones madre, una de 8.2 mg / L (A) y otra de 9.5 mg/ L (B). Se realizaron para cada una de las soluciones madre, diluciones: 1:10, 2:10, 3:10, 4:10, 1:2, 6:10, 7:10, 8:10, 9:10 y se midieron, junto con las soluciones madre, por duplicado. Se obtuvieron las ecuaciones de la recta siguientes:

➤ En agua:

$$Abs = -0.000 + 0.097 * [C]; r = 0.999, r^2 = 0.999$$

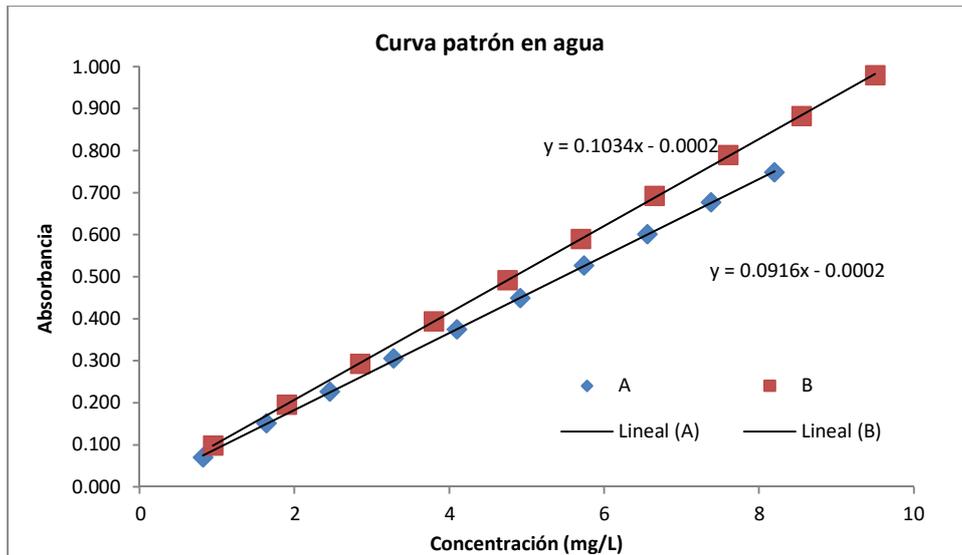


Figura 48: Curva patrón de Ciprofloxacino en agua.

➤ En PBS pH 7.4:

$$Abs = 0.013 + 0.088 * [C]; r = 0.999, r^2 = 0.999$$

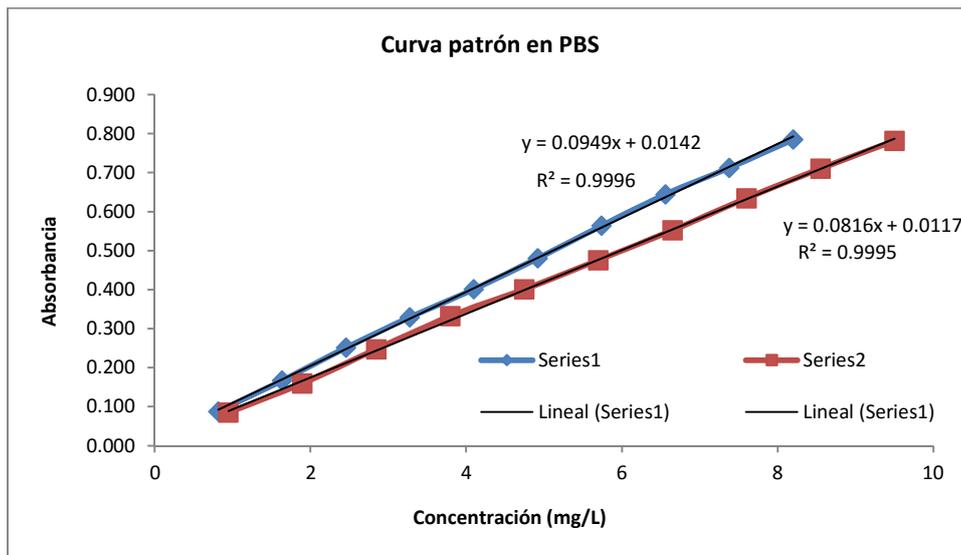


Figura 49: Curva patrón de Ciprofloxacino en PBS.

➤ En solución reguladora de HCl pH 1.2:

$$Abs = 0.005 + 0.101 * [C]; r = 0.999, r^2 = 0.999$$

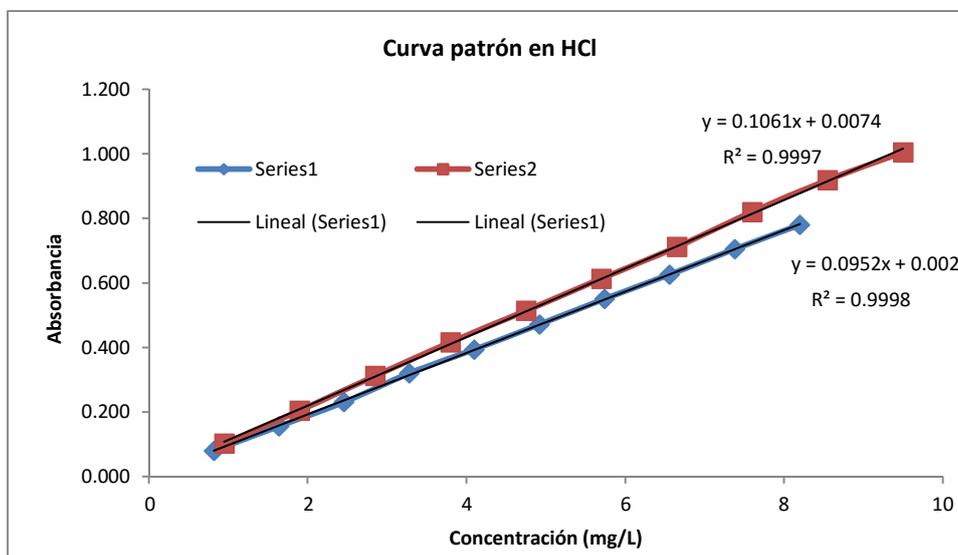


Figura 50: Curva patrón de Ciprofloxacino en solución reguladora de HCl.

Para la determinación de dicha ecuación, se utilizó el programa Excel[®] para el cálculo de la regresión lineal.

Los parámetros evaluados en el proceso de validación han sido:

- Linealidad
- Precisión
 - Repetibilidad
 - Reproducibilidad
- Exactitud

Linealidad:

Para determinar la linealidad del método se determinan los factores respuesta de cada una de las diluciones y ambas madres, de las dos curvas:

$$f = \frac{Abs}{[C]} \pm DE$$

Dónde:

Abs = absorbancias medidas para cada una de las concentraciones estudiadas

[C] = concentraciones analizadas

DE = desviaciones estándar de cada una de las concentraciones estudiadas

Se calcula, además, el coeficiente de variación de los factores respuesta calculados (CV_f):

$$CV (\%) = \frac{DE}{|\bar{f}|} 100$$

Siendo:

\bar{f} = media de los factores respuesta

DE = desviación estándar

Se obtienen los valores de CV_f :

- En agua: $CV_f = 1.383 \%$
- En PBS pH 7,4: $CV_f = 1.162 \%$
- En HCl pH 1,2: $CV_f = 3.106 \%$

En los tres casos, el valor es inferior al 5%, indicativo de que el método tiene una buena linealidad.

Además también se cumple que los f son semejantes a la pendiente calculada para la ecuación de la recta, por lo que queda también demostrada la buena linealidad del método.

Precisión:

La precisión incluye dos parámetros a determinar, repetibilidad y reproducibilidad. Para determinar si se cumplen o no dichos parámetros, se preparan tres disoluciones con tres concentraciones diferentes: alta, media y baja. Para ello se utiliza una media de las concentraciones madre utilizadas para la curva patrón, como solución de concentración alta (8.85 mg /L), y de ella se realiza una dilución 1:2 para la disolución de concentración media y una dilución 1:10 para la disolución de concentración baja. Se utiliza esta metodología en los tres disolventes empleados: agua, PBS pH 7.4 y solución reguladora HCl pH 1.2.

- Repetibilidad: se realiza una medida de cada una de las soluciones 5 veces, por un mismo analista y el mismo día, y se calculan los valores de DE y CV. Se determina que en ninguno de los tres casos, los CV (%) no superan el valor de CV (%) máximo para un intervalo de aceptación de 5% ($CV_{\text{máx}} = 4.2$) como se puede observar en la tabla 6, por lo que se considera como aceptable dicho ensayo de repetibilidad.

Tabla 6: Resultados del ensayo de repetibilidad.

	Agua			HCl pH 1.2			PBS pH 7.4		
	Madre	Media	Baja	Madre	Media	Baja	Madre	Media	Baja
Media	0.874	0.445	0.089	0.865	0.649	0.239	0.688	0.453	0.239
DE	0.002	0.001	0.003	0.001	0.001	0.002	0.001	0.001	0.004
CV(%)	0.229	0.188	3.348	0.063	0.169	0.962	0.159	0.27	1.762

- **Reproducibilidad:** se miden las soluciones dos veces durante cuatro días consecutivos por un mismo analista. Se calculan las DE y los CV para cada una de las concentraciones. Los CV (%) son inferiores a los límites de CV máximos de aceptación para un intervalo de aceptación de 5%, por lo que se determina como aceptable dicho ensayo.

Tabla 7: Resultados del ensayo de reproducibilidad.

	Agua			HCl pH 1.2			PBS pH 7.4		
	Madre	Media	Baja	Madre	Media	Baja	Madre	Media	Baja
Media	0.89	0.424	0.093	0.869	0.651	0.239	0.685	0.451	0.237
DE	0.009	0.005	0.003	0.002	0.001	0.001	0.002	0.002	0.004
CV(%)	1.025	1.08	3.335	0.268	0.173	0.415	0.364	0.48	1.74

Exactitud:

Para determinar la exactitud, se comparan los valores de concentración experimentales (hallados) obtenidos en el laboratorio, con los valores calculados en la curva de calibrado (teóricos). Dicho parámetro se va a determinar mediante el porcentaje de recuperación (%R):

$$\% R = \frac{\text{concentración teórica}}{\text{concentración hallada}} \times 100$$

Para determinar la buena o mala exactitud del método se calcula la “t de Student” (t_{ex}):

$$t_{exp} = \frac{|100 - R|\sqrt{n}}{CV}$$

Siendo:

R = porcentaje de recuperación

n = número de muestras (9 diluciones, más la solución madre, de dos curvas con dos réplicas, n=40)

CV = coeficiente de variación de los datos de R

Se obtiene que:

- En agua: $t_{\text{exp}} = 0.2077$.
- En tampón PBS (pH 7,4): $t_{\text{exp}} = 0.1564$
- En tampón HCl (pH 1,2): $t_{\text{exp}} = 2.0859$

Siendo el valor de la t de Student en las tablas de 2.971 ($p = 0.05$; $GI = 40 - 1 = 39$), en los tres disolventes utilizados, el valor de $t_{\text{exp}} < t_{\text{tablas}}$, indicando que el método tiene una buena exactitud.

6. Estudio cinético de los resultados de disolución

La liberación del fármaco a partir de la forma de dosificación que lo contiene es un proceso secuencial, disolución/liberación del fármaco y acumulación en el medio de disolución en función del tiempo. Los resultados se representan gráficamente como porcentaje de fármaco liberado/tiempo, resultando las curvas de velocidad de disolución/liberación.

Su caracterización puede llevarse a cabo mediante modelos matemáticos y/o parámetros modelo independiente.

6.1. Modelos matemáticos

El tratamiento de la cinética de liberación del fármaco es muy diverso, siendo numerosos los modelos matemáticos utilizados. Sin embargo, realmente no hay uno que sea utilizable para todos los mecanismos implicados ni para todos los sistemas, ya que dependiendo de la composición de la forma farmacéutica, pueden tener importancia más o menos fenómenos como la difusión del agua y del fármaco, la solubilidad de éste, etc.

El “padre” de los modelos matemáticos para el estudio de la liberación del fármaco desde diversas formas farmacéuticas es el profesor Takeru Higuchi, que en 1961 publicó su conocida ecuación de raíz cuadrada. Con ella consiguió describir de una forma muy sencilla la liberación del fármaco a partir de bases de formas semisólidas y supuso el comienzo del tratamiento cuantitativo de la liberación del fármaco desde distintas formas farmacéuticas.

Desde entonces, se han propuesto numerosos modelos tanto realistas mecanicistas como empíricos y semi-empíricos.

Los primeros se basan en fenómenos reales tales como difusión, disolución, hinchamiento, erosión, precipitación y/o degradación y permiten determinar parámetros específicos del sistema que pueden ofrecer una mejor comprensión de los mecanismos esenciales de la liberación. Así, se puede apreciar la importancia relativa de varios procesos que estén implicados (por ej., difusión del fármaco e hinchamiento del polímero). La forma farmacéutica no se trata de una entidad desconocida, sino de un sistema real de liberación cuyo mecanismo se puede comprender. En el desarrollo de

un producto, estos modelos permiten una predicción cuantitativa de los efectos de la formulación y de los parámetros del proceso (por ej. la altura y diámetro iniciales del comprimido) sobre la cinética de liberación resultante.

Entre estas teorías, se encuentran la famosa ecuación de Higuchi, basada en la ley de difusión de Fick y la propuesta por Korsmeyer y colaboradores, que consideran el hinchamiento del polímero.

Por el contrario, en los modelos empíricos y semi-empíricos, el tratamiento matemático es, al menos parcialmente, puramente descriptivo y no se basan en fenómenos reales físicos, químicos y/o biológicos. En consecuencia, se puede decir que revelan poco o nada sobre los mecanismos esenciales de liberación del fármaco. Estas teorías son útiles por ejemplo si se comparan varios perfiles de liberación de fármacos utilizando un parámetro específico (una constante de velocidad de liberación en análisis de diseño de experimentos). Pero hay que tener mucha precaución si se extraen conclusiones mecanicistas o se hacen predicciones cuantitativas, ya que son modelos poco predictivos, a excepción de los modelos basados en redes neuronales artificiales (artificial neural networks ANNs).

Entre los modelos matemáticos empíricos y semi-empíricos, podemos citar el de Hopfenberg, el propuesto por Cooney, las redes neuronales artificiales y la también muy utilizada y más sencilla de aplicar, la llamada ecuación de Peppas.

Una información más detallada sobre este tema se puede encontrar en una edición especial de la revista *International Journal of Pharmaceutics* dedicado al 50º aniversario de la clásica ecuación de Higuchi (176).

De todos estos modelos matemáticos, en nuestro estudio, los resultados obtenidos en los ensayos de disolución se ajustan a las ecuaciones cinéticas que se exponen a continuación.

▪ **Cinética de orden cero**

Este modelo cinético se ajusta a sistemas en los que la liberación del principio activo no se ve afectada por su concentración en la matriz, sino que depende de otras propiedades tales como la solubilidad o la fotólisis, produciendo una liberación con un ritmo constante.

Se da fundamentalmente en sistemas erosionables con un área superficial constante y se corresponde con una liberación de “orden cero” o mecanismo “Caso II” y la ecuación es:

$$C(\%) = k_0 \cdot t$$

Dónde:

$C(\%)$ es el porcentaje de fármaco liberado en el tiempo t

k ($\% \cdot h^{-1}$) sería la constante cinética

t es el tiempo.

▪ **Cinética de primer orden**

La velocidad del proceso es directamente proporcional a la concentración del fármaco remanente en la forma farmacéutica. La forma más sencilla de definir la velocidad de disolución es:

$$\ln C_t = \ln C_0 + k_1 \cdot t$$

Siendo:

C_t es la concentración en el momento t .

C_0 es la concentración inicial.

k_1 es la constante de velocidad de orden uno.

t es el tiempo

▪ **Cinética de Higuchi.**

Se trata de un modelo cinético que se ajusta bien a una liberación controlada por difusión a partir de matrices homogéneas y granulares. Este es el modelo más frecuentemente utilizado, también conocido como “Fickiano” o mecanismo “Caso I”. Su ecuación matemática es:

$$C(\%) = k_H \cdot t^{1/2}$$

Dónde:

$C(\%)$ es el porcentaje de fármaco liberado en el tiempo t .

k_H ($\% \cdot h^{-1/2}$) es la constante de Higuchi

t es el tiempo.

▪ Cinética de Peppas-Ritger

Es un análisis de liberación de principio activo para sistemas poliméricos hinchables. Se obtuvo a partir de las soluciones matemáticas de la segunda ley de Fick, bajo condiciones límites simples, empleadas frecuentemente en experimentos de liberación en agua o fluidos biológicos, y para polímeros con formas geométricas sencillas como cilindros y esferas (177) y para periodos de tiempo cortos (178). Para caracterizar la cinética de liberación se utiliza la siguiente ecuación general:

$$C(\%) = k \cdot t^n$$

Dónde:

$C(\%)$ es la fracción de principio activo liberado en el tiempo t .

K es la constante cinética ($\% \cdot h^{-1}$).

t es el tiempo.

n es el exponente de liberación.

Los valores de n y k se determinan a partir de la pendiente e intersección de la representación de $C(\%)$, en función del tiempo, de acuerdo con la ecuación en escala logarítmica, ajustando los datos experimentales a una regresión lineal.

El exponente de liberación “ n ” es dependiente de la geometría del sistema y su valor puede orientar acerca del mecanismo de liberación:

- ✓ Si $n \leq 0.5$ tendría lugar una liberación por difusión fickiana, también denominada caso I.
- ✓ Si $0.5 < n < 1$ tendría lugar una difusión no fickiana, conocida como transporte anómalo.
- ✓ Si $n \approx 1$ sería una cinética cercana al orden 0. Es un caso especial del anterior conocido como caso II.
- ✓ Si $n > 1$ tendría lugar un transporte por super caso II

Si la constante cinética k tiene valores elevados suele indicar una liberación brusca de fármaco, alta en los primeros momentos del ensayo.

▪ Cinética mixta Higuchi-Orden cero

Se ha descrito como un transporte “no Fickiano” o anómalo. La velocidad de liberación se puede describir como una combinación de las cinéticas $t^{1/2}$ y orden cero:

$$C(\%) = k_0 t + k_H t^{1/2}$$

Dónde:

$C(\%)$ es el porcentaje de fármaco liberado en el tiempo t .

k_0 ($\% \cdot h^{-1}$) es la constante cinética

k_H ($\% \cdot h^{-1/2}$) es la constante de Higuchi

t es el tiempo

Los valores de k_0 y k_H se determinan ajustando los datos experimentales de $C(\%)$ utilizando como variables independientes $t^{1/2}$ y t . La comparación de estas dos constantes nos permite deducir si predomina la difusión ($k_H > k_0$) o la erosión ($k_H < k_0$) en la liberación de sustancia activa.

Para el ajuste de todas las ecuaciones cinéticas y el cálculo de las constantes se ha utilizado el programa Statgraphics® Plus Versión 5.1 y el programa Excel®.

6.2. Parámetros modelo independientes.

Otros parámetros de disolución se utilizan para caracterizar los perfiles de disolución/liberación: tiempo de disolución ($t_{x\%}$), tiempo de ensayo (t_{\min}), eficacia de disolución (ED), tiempo medio de disolución, factor de diferencia (f_1), factor de similitud (f_2).

- $t_{x\%}$: Parámetro correspondiente al tiempo necesario para la liberación de un determinado porcentaje de fármaco (ejemplo $t_{50\%}$, $t_{80\%}$). Las farmacopeas usan este parámetro como un límite de aceptación del test de disolución.
- **Área bajo la curva de disolución ($ABC_{\text{in vitro}}$)**: Calculada por el método trapezoidal. Útil para calcular otros parámetros amodelísticos y para estudios de correlación.
- **Eficiencia de disolución (ED)**: Aporta una buena información sobre el comportamiento en disolución, ya que relaciona el área bajo la curva in vitro con la cantidad máxima disuelta y el tiempo requerido para que se disuelva esta cantidad máxima. Se calcula a partir de las curvas acumulativas de fármaco disuelto, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$ED (\%) = \left[\frac{ABC_{in vitro}}{C_{100\% \cdot t}} \right] \cdot 100$$

Siendo:

ABC_{in vitro}: valor del área bajo la curva acumulativa de disolución, desde tiempo cero hasta el último tiempo experimental (t), en nuestro caso 24 o 48 horas, calculada por método de los trapecios.

C₁₀₀ · t: área del rectángulo delimitado por el porcentaje máximo de fármaco disuelto (C_∞) y el tiempo t correspondiente al último tiempo experimental (24 o 48 horas).

La ED aporta información sobre la formulación que disuelve con mayor o menor eficacia, siendo más eficaz cuanto más se aproxime a 100. La eficacia de disolución tiene dos limitaciones: debe disolverse como mínimo el 90% de la dosis, y el último punto experimental tiene carácter arbitrario.

7. Estudios estadísticos

Se realizan dos estudios estadísticos.

- El primero de ellos se realiza con las micropartículas de quitosano obtenidas por spray dryer. En él, se evalúa la influencia de los parámetros de síntesis (concentración del polímero, concentración del principio activo y volumen de suspensión a secar) sobre la eficacia de encapsulación, el rendimiento del proceso de síntesis y el tamaño de partícula.
- El segundo, se lleva a cabo con las micropartículas de Eudragit[®] obtenidas por ambos métodos. En este estudio nos permite escoger la formulación más acorde al fin pretendido entre todas las estudiadas. Se estudia la influencia de cada uno de los parámetros de síntesis tales como el método de síntesis utilizado, la proporción fármaco:polímero y el tipo de Eudragit[®] sobre el tamaño de partícula, eficacia de encapsulación y sobre el porcentaje de fármaco liberado a las 24 horas.

Para todos estos estudios estadísticos, así como para el diseño de experimentos se utiliza el programa Design-Expert[®] V8 el.

8. Estudio de absorción “in vivo” y permeabilidad “ex vivo”

8.1. Absorción “in vivo”

Se estudia la biodisponibilidad de las micropartículas preparadas así como del fármaco libre tras la administración de una dosis oral en los conejos (179,180).

Se utilizan doce conejos albinos blancos sanos con un peso corporal de 1 a 1.2 kg, que se colocan en jaulas de polipropileno, con acceso libre a una dieta estándar de laboratorio y agua *ad libitum*. Se utiliza una iluminación estándar con un ciclo de 12 h encendida/12 h apagada. Se estudia la biodisponibilidad del ciprofloxacino contenido en las micropartículas así como del fármaco libre tras la administración de una dosis oral en los conejos.

Se separan los animales aleatoriamente en dos grupos ($n = 6$) y se les administra una única dosis aproximadamente de 212 mg/kg de peso corporal. El primer grupo recibe 500 mg de micropartículas que contienen 212 mg de ciprofloxacino. Para el otro grupo se prepara una solución del fármaco y se administra de manera similar al otro grupo a través de una sonda de alimentación por vía oral.

Se recolectan muestras de sangre a través de la vena central de los conejos en tubos de centrífuga de vidrio heparinizada utilizando jeringas de plástico desechables esterilizadas. Se toman muestras a 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 y 24 horas después de la administración del fármaco y las muestras se centrifugan a 5000 rpm durante 10 minutos para separar el plasma para su análisis.

A las muestras de plasma se les añade una cantidad igual de acetonitrilo para separar las proteínas. La mezcla se agita durante dos minutos y luego se centrifuga a 2000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se transfiere a un frasco para el análisis de las concentraciones del fármaco por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (181).

El cromatógrafo utilizado está equipado con una columna analítica de fase reversa C18 (220 x 4.4 mm I.D., tamaño de partícula 5 μm) precedido por una precolumna (15 x 3.2 mm, tamaño de partícula de 7 μm). La fase móvil está compuesta por una mezcla de una solución acuosa al 2% de ácido acético y ACN (85:15, v/v). El caudal se fija en 1.0 mL/min siendo el volumen de inyección de 20 μL y midiendo el efluente a 279 nm por un detector de UV. El tiempo de retención es de 6.5 ± 0.26 min y la elución se lleva a cabo a temperatura ambiente. Previamente se comprueba que el método es selectivo y sin interferencias de otros componentes (182).

8.2. Permeabilidad “ex vivo”

Se colocaron en una sala con temperatura y humedad controladas (23° C, humedad del aire del 55%) 12 ratones Wistar macho (con un peso de 200 – 250 g) con libre acceso a agua y una dieta estándar. Se mantienen en ayunas durante la noche con agua *ad libitum* antes del experimento. Los animales se sacrifican mediante una dislocación de la columna vertebral y se extrae el intestino delgado inmediatamente después del sacrificio por un corte en el extremo superior del duodeno y el extremo inferior del íleon y manualmente se extrae el mesenterio. Se lava cuidadosamente el intestino delgado con una solución salina oxigenada normal fría (0.9%, peso/volumen, NaCl) utilizando una jeringa equipada con un extremo romo y una vez limpio se corta en trozos de 8 ± 0.2 cm de largo para hacer sacos (183,184).

Se llenan 6 sacos con agua mediante una aguja despuntada con una solución de ciprofloxacino HCl (equivalente a 20 mg del principio activo) y los otros 6 sacos se llenan con 50 mg de micropartículas dispersadas en agua. Los dos lados del intestino se atan con un hilo y cada saco se coloca en un frasco cónico de vidrio que con 10 mL de solución de Ringer. Todo el sistema se mantiene a 37° C en un baño de agua con una agitación de 100 rpm y aireado con un aireador de laboratorio. Cada 15 min se toman muestras del medio receptor (solución Ringer), reponiendo la cantidad tomada con medio fresco durante 2 horas. A continuación, las muestras de tejido se homogenizan con solución salina normal y se someten a ciclos de congelación-descongelación con frecuente agitación utilizando Vortex. Se agrega acetonitrilo y se centrifuga a 4000 rpm durante 30 minutos, separando el sobrenadante y determinando el contenido de fármaco por HPLC según lo explicado previamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Micropartículas de quitosano

1.1. Caracterización física de las micropartículas de quitosano

Para el estudio de las micropartículas de quitosano, elaboradas por desecación por nebulización, se utiliza un diseño de experimentos 2^3 con dos replicas, como se recoge en la tabla 3 (apartado de materiales y métodos); por lo que hay cuatro muestras para cada proporción fármaco:polímero. En la tabla 8 se agrupan las formulaciones según la proporción Cipro:CS para facilitar el estudio comparativo.

Tabla 8: Composición de las formulaciones analizadas, en función de la proporción fármaco:polímero.

Muestras				Proporción Cipro:CS
200ml		50ml		
1	16	4	11	8:1
2	9	8	12	2:1 4% Cipro + 2% CS
3	10	5	14	2:1 1% Cipro + 0.5% CS
7	15	6	13	1:2

Para determinar si influye la cantidad de Cipro o CS utilizado en la síntesis sobre las distintas pruebas físicas, con la proporción 2:1 se estudian dos grupos: unas micropartículas se preparan con 4% de Cipro y 2% de CS, y otras con 1% de Cipro y 0.5% de CS.

Eficiencia de encapsulación o Carga (%)

Los datos obtenidos de eficiencia de encapsulación de estas micropartículas, recogidos en la tabla 9, indican que cuanto mayor es la proporción de fármaco:polímero utilizado en la síntesis, mayor es la eficiencia de encapsulación del proceso. Así en las micropartículas sintetizadas con la proporción 8:1 se alcanza una carga en torno al 90-95 %, mientras que con la proporción 1:2, la carga obtenida es demasiado baja (27-36 %). Con la proporción 2:1, sea cual sea la cantidad de polímero y de sustancia activa utilizada, se obtiene una eficiencia de encapsulación intermedia, en torno al 55-78 %.

Tamaño partícula

En la tabla 9 también se recogen los tamaños de las micropartículas elaboradas y en el anexo I se presentan las curvas de distribución de los tamaños.

Se puede comprobar que los tamaños de partículas son todos muy similares (4-10 μm) sea cual sea la proporción estudiada, aunque las micropartículas con una proporción 8:1 son ligeramente más grandes.

Parece que ninguna de las variables de síntesis utilizadas, tiene influencia sobre el tamaño de partícula.

Rendimiento del proceso de encapsulación (%)

En cuanto al rendimiento del proceso (tabla 9), se observa que sea cual sea la proporción estudiada, el rendimiento es bastante alto, en torno al 70-83 %, a excepción de una muestra, la número 5, cuyo rendimiento desciende a un 57.36 %.

Tabla 9: Resumen de los datos obtenidos para la eficiencia de encapsulación, tamaño de partícula y rendimiento del proceso de encapsulación para las micropartículas de quitosano.

Muestras	Proporción Fármaco:Polímero	Eficiencia de encapsulación (%)	Tamaño de partícula (μm)	Rendimiento (%)
1	8:1	94.3 \pm 0.01	8.710 – 10.00	83.76
4		92 \pm 0.03	7.586 – 8.710	74.11
11		90 \pm 0.0	7.586 – 8.710	73.44
16		94 \pm 0.03	7.586 – 8.710	78.88
2	2:1 4% Cipro + 2% CS	65 \pm 0.02	6.607 – 7.586	71.36
8		75 \pm 0.07	6.607 – 7.586	68.23
9		62 \pm 0.03	5.754 – 6.607	72.54
12		65.2 \pm 0.0	7.586 – 8.710	76.39
3	2:1 1% Cipro + 0,5% CS	71 \pm 0.03	5.012 – 5.754	75.47
5		57.6 \pm 0.02	4.365 – 5.012	57.36
10		78 \pm 0.04	5.012 – 5.754	69.18
14		55.1 \pm 0.12	5.012 – 5.754	71.42
6	1:2	27.8 \pm 0.01	5.754 – 6.607	72.63
7		30.1 \pm 0.02	6.607 – 7.586	77.12
13		28 \pm 0.01	5.754 – 6.607	81.81
15		36.3 \pm 0.0	6.607 – 7.586	73.45

Estos datos se analizan estadísticamente con el programa Design Expert[®] V8, para relacionar los distintos parámetros de síntesis (concentración de CS, concentración de Cipro y volumen a secar) con los resultados obtenidos en las distintas pruebas físicas.

1.2. Análisis estadístico de las micropartículas de quitosano

Se ha realizado un estudio estadístico 2^3 (tres variables a dos niveles) con dos réplicas, para comprobar la influencia de las variables de síntesis de las micropartículas, sobre los parámetros a medir. En consecuencia, las variables de síntesis estudiadas y los parámetros analizados en las micropartículas sintetizadas son los siguientes:

- Variables de síntesis:
 - Concentración de CS: toma valores de 0.5% o de 2%
 - Concentración de Cipro: toma valores de 1% o de 4%
 - Volumen a secar: toma valores de 50 ml o de 200 ml.
- Parámetros a medir.
 - Eficiencia de encapsulación
 - Tamaño de partícula
 - Rendimiento del proceso de encapsulación

Para ello se utiliza el programa estadístico Design Expert[®] V8, que proporciona para cada uno de los parámetros analizados, una ecuación que sirve para identificar el impacto relativo de las variables de síntesis utilizadas. Cuanto mayor es el coeficiente que acompaña en la ecuación a una variable, mayor será su impacto relativo sobre el parámetro analizado.

Se presentan a continuación, para cada uno de los parámetros analizados, la ecuación y los gráficos superficie respuesta, junto con el diagrama de Pareto

Eficiencia de encapsulación o Carga (%)

La ecuación que representa la influencia de las variables de síntesis sobre este parámetro y los gráficos correspondientes, se muestran en la figura 51.

En la ecuación y en los gráficos, se comprueba que la carga de las micropartículas de quitosano aumenta al aumentar la concentración de ciprofloxacino y el volumen de secado. En la ecuación, al tener un valor positivo mayor, influye en mayor medida la concentración de Cipro. Por el contrario, la carga aumenta cuando la concentración de quitosano disminuye.

Tras un estudio ANOVA de los datos, se corrobora el efecto estadístico altamente significativo que tienen la concentración de quitosano y la concentración de ciprofloxacino sobre la carga de las micropartículas, al presentar un valor de $p < 0.01$.

También se confirma por el diagrama de Pareto, ya que las barras pertenecientes a la concentración de CS y a la concentración de Cipro superan la línea de referencia marcada, presentando esta última, un efecto algo mayor.

$$\text{Eficiencia de encapsulación} = +58.49583 - 20.15833 * [\text{cs}] + 10.59583 * [\text{cipro}] + 0.032750 * \text{volumen}$$

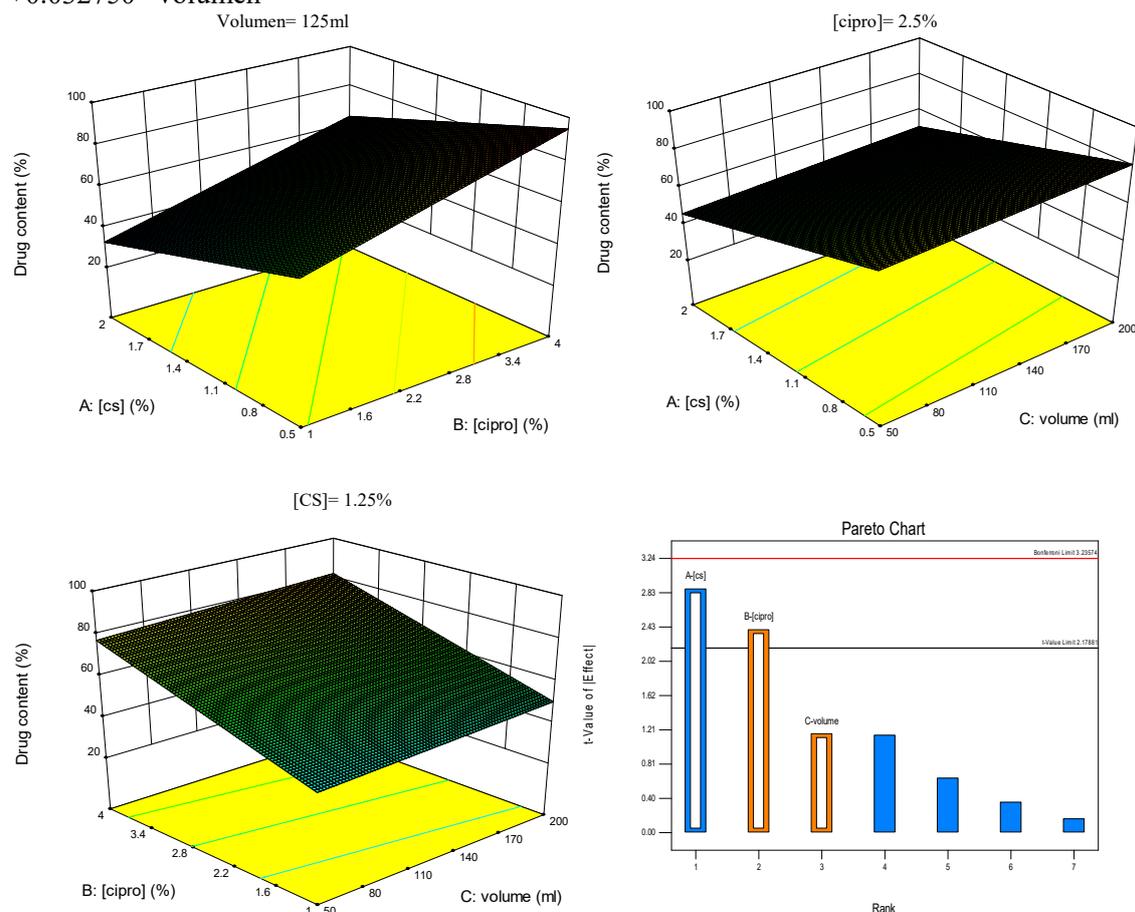


Figura 51: Ecuación y gráficos que describen la influencia de las variables de síntesis sobre la eficiencia de encapsulación.

Tamaño de partícula

La ecuación que representa la influencia de las variables de síntesis sobre este parámetro y los gráficos correspondientes, se muestran en la figura 52.

Como indica la ecuación y se puede comprobar en los gráficos, el tamaño de partícula aumenta al aumentar la concentración de ciprofloxacino y el volumen de secado, siendo el efecto de esta última variable, mucho menos importante. Mientras que disminuye al aumentar la concentración de quitosano. Estos resultados contrastan con los obtenidos por He et al. (1) ya que su estudio revela que al aumentar la concentración de quitosano, va a aumentar el tamaño de las partículas de su estudio.

Únicamente la concentración de quitosano y la concentración de ciprofloxacino van a tener un efecto estadísticamente significativo como vemos en el diagrama de Pareto (ambas barras superan notablemente la línea de referencia) y en los resultados del análisis ANOVA, ya que el valor de $p < 0.05$.

Tamaño de partícula= +6.63217 -1.64962* [cs] +0.68673* [cipro] +6.69458E-003* volumen

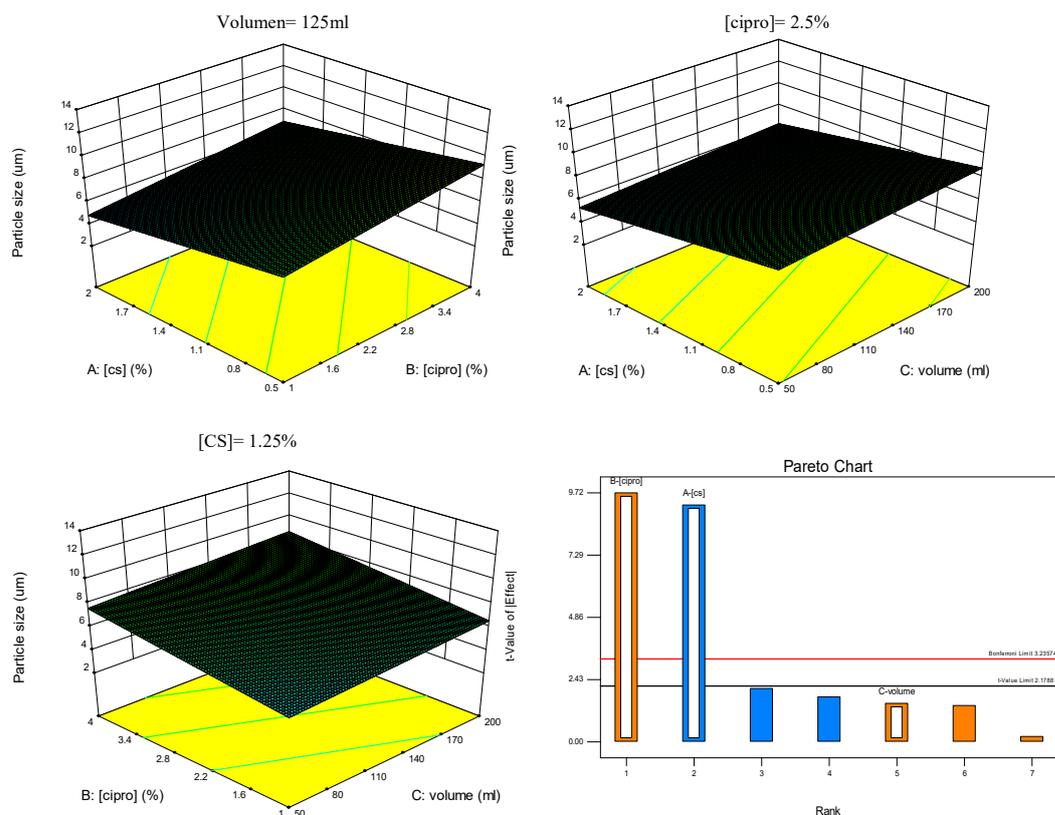


Figura 52: Ecuación y gráficos que describen la influencia de las variables de síntesis sobre el tamaño de partícula.

Rendimiento del proceso de encapsulación (%)

La ecuación que representa la influencia de las variables de síntesis sobre este parámetro y los gráficos correspondientes, se muestran en la figura 53.

Se puede deducir por la ecuación y los gráficos, que el rendimiento del proceso aumenta cuando aumentan todos los factores estudiados. El que más afecta es la concentración de ciprofloxacino al ser de mayor valor el coeficiente que acompaña a esta variable, y el factor que menos afecta es el volumen de secado.

En el diagrama de Pareto se corroboran estas deducciones, ya que se observa que ninguna variable de síntesis tiene un efecto estadísticamente significativo. Ninguna barra supera la línea de referencia y ninguna tiene un valor de $p < 0.05$.

$$\text{Rendimiento} = +67.68292 + 0.82500 * [\text{cs}] + 0.84417 * [\text{cipro}] + 0.021983 * \text{volumen}$$

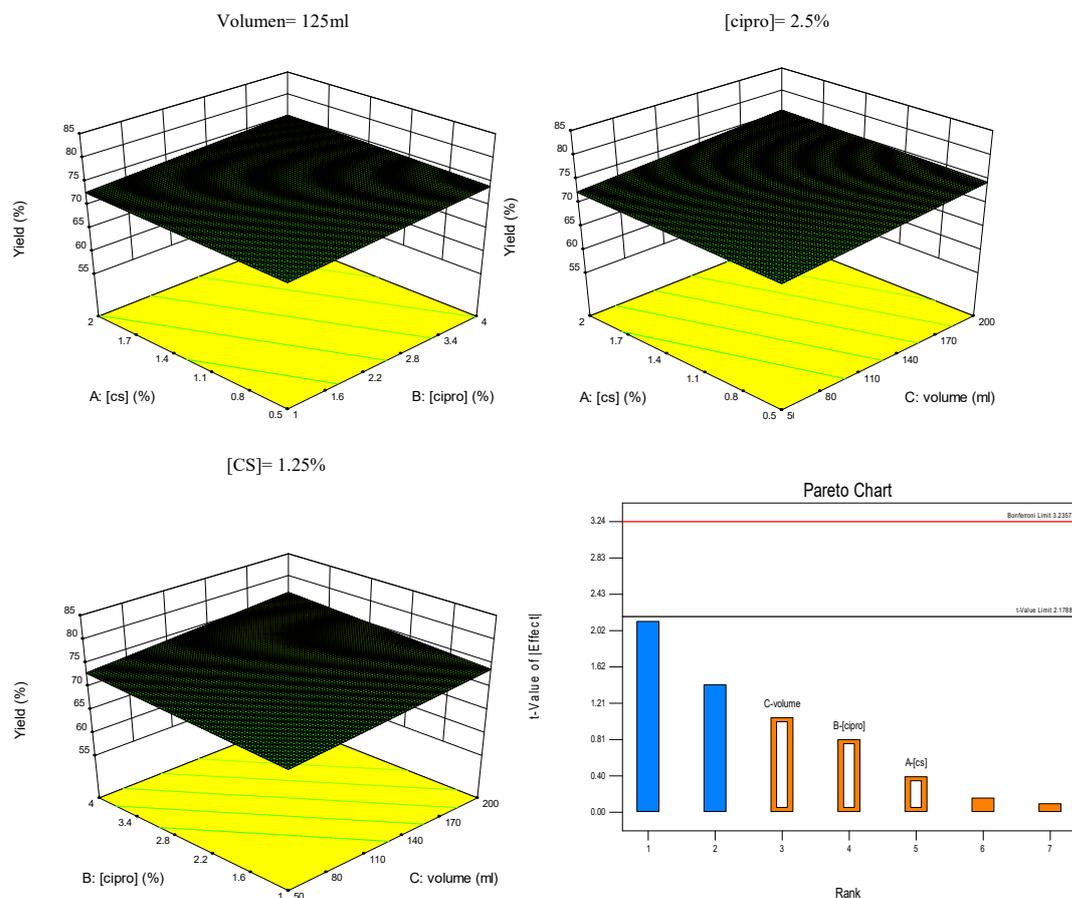


Figura 53: Ecuación y gráficos que describen la influencia de las variables de síntesis sobre el rendimiento.

1.3. Estudio térmico

Para evaluar la posible interacción entre los elementos que componen cada formulación, o cambios estructurales, así como cambios en las propiedades físicas y químicas de los componentes que se hayan podido producir en la elaboración de las micropartículas, se realiza el estudio térmico, cuyos resultados se exponen a continuación.

Calorimetría diferencia de barrido (DSC)

En la figura 54 se representan las curvas de DSC correspondientes a los productos puros y se agrupan el resto de las muestras analizadas según la proporción fármaco:polímero utilizada en la síntesis de las micropartículas.

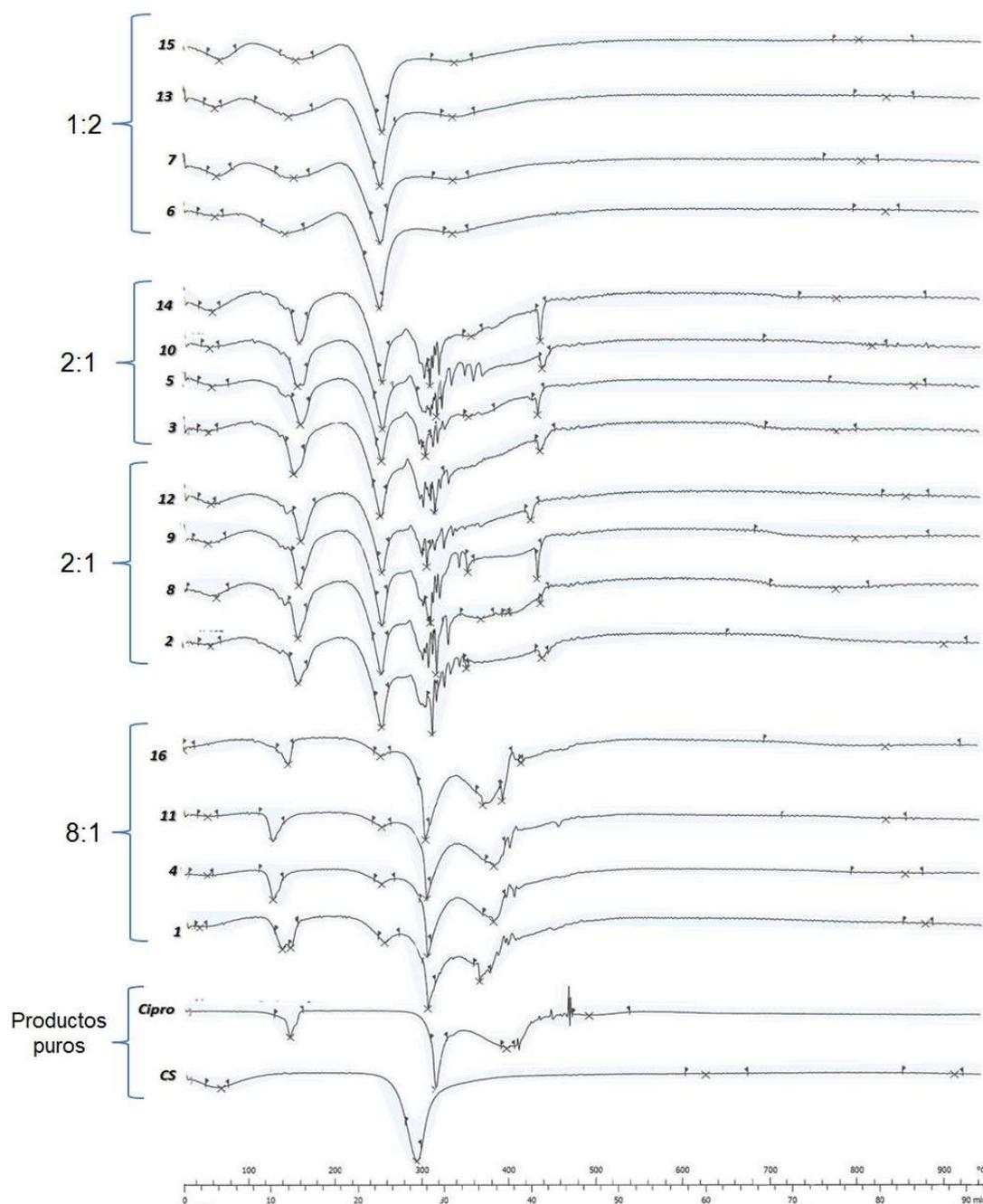


Figura 54: Curvas de DSC de los productos puros y de las formulaciones utilizadas para preparar las micropartículas de quitosano estudiadas.

La curva del CS muestra dos eventos térmicos. A los 67.95°C se modifica la línea base, lo que se corresponde con una pérdida de agua de la muestra, dada su higroscopicidad. El segundo proceso endotérmico más marcado, se observa a 295.17°C , podría deberse a la rotura de los enlaces éter de la cadena polisacárida del quitosano y por tanto, se produce la descomposición del polímero sin previa fusión. Finalmente se observa una descomposición muy gradual de los residuos de glucosamina que quedarían tras la descomposición de las cadenas del polímero. Estos resultados coinciden con los estudios realizados por numerosos autores tales como González y Guerrero (2000),

Kittur et al. (2002), Mucha y Paulak (2005), Guinesi y Cavalheiro (2006) y Ramya et al. (2012) (2–7).

El Ciprofloxacino presenta una curva de DSC con un pico endotérmico a los 147.35° C correspondiente a la pérdida de agua dada la higroscopicidad de la sustancia. Otros dos picos endotérmicos se presentan a 319.19° C, más intenso y a 404.13° C, de menor intensidad. Estos se podrían deber a una fusión del principio activo seguido de una descomposición. Finalmente se observa una descomposición gradual de los restos del compuesto. Ciertos autores han caracterizado por DSC esta sustancia y nos permiten corroborar los resultados obtenidos. Mahapatra et al. (8) realiza un estudio de varios fármacos en el que ponen de manifiesto que en todas las sales de ciprofloxacino estudiadas, no hay enlace de hidrógeno sosteniendo la molécula ciprofloxacino, en cambio, el enlace de hidrógeno implica una solvatación. Turel et al. (9–11) y Dillen et al. (12) estudian en profundidad la estructura química del Cipro, analizando su estabilidad térmica mediante DSC y TGA. En todos estos trabajos se llega a las mismas deducciones que acabamos de aportar.

Todas las muestras de las formulaciones con las que se elaboran las micropartículas presentan picos endotérmicos desplazados a temperaturas inferiores con respecto a los de los productos puros, a excepción de los debidos a la pérdida de agua (aparecen en torno a los 60-70° C y 130-140° C). Esto podríamos explicarlo tras una búsqueda no selectiva de la estructura del Ciprofloxacino y tras el estudio del comportamiento de dicha estructura cristalina (11). Se puede deducir que los cristales de este compuesto están estabilizados por enlaces de hidrógeno clásicos mientras que en los cocrystalos que se forman con el Cipro y con el CS (coformadores) solo existen interacciones no convencionales, que resultan más débiles que las anteriores. Por este motivo, al resultar más débiles, los eventos térmicos quedan desplazados hacia temperaturas inferiores (8). Estas deducciones han sido corroboradas con trabajos realizados por Turel et al. en los años 1994 y 1996 (13,14), en los que comprueban las estructuras cristalinas del Cipro y ponen de manifiesto este comportamiento. Otros autores que han analizado este comportamiento son Tan et al. (15) y Zupančič et al. (16) sobre complejos de Cipro con iones cobre, magnesio y zirconio. Liu et al. (17) y Refat et al. (18) también estudian el comportamiento de los cristales de ciprofloxacino monohidratado mediante DSC, TGA, difracción de rayos X y microscopía electrónica de barrido.

Se observa que las muestras con proporción 8:1 y 2:1 presentan en sus curvas todos los picos de ambos productos puros claramente diferenciados, mientras que en las micropartículas con proporción fármaco:polímero 1:2 no ocurre esto. En los productos puros los picos endotérmicos ocurren a temperaturas similares. Por ello en las micropartículas 1:2, al estar el polímero en una proporción superior al Cipro, queda enmascarada la descomposición del principio activo por la fusión del CS y solo se observa un pequeño pico que se corresponde con el ocasionado por la fusión del Cipro.

Análisis termogravimétrico (TG)

Las curvas de TG pueden servir para corroborar las deducciones anteriores, ya que en ciertos eventos térmicos como las transiciones vítreas o procesos de cristalización no hay pérdidas de masa de la muestras, mientras que en otros procesos, como las fusiones, descomposiciones, sublimaciones, reducciones y vaporizaciones, van acompañados de una pérdida de masa (19). Las curvas de TG se muestran en la figura 55 en la que podemos comparar unas con otras, y además, con mayor detalle podemos ver dichas curvas en el anexo III, donde se observan las pérdidas de masa de forma integrada.

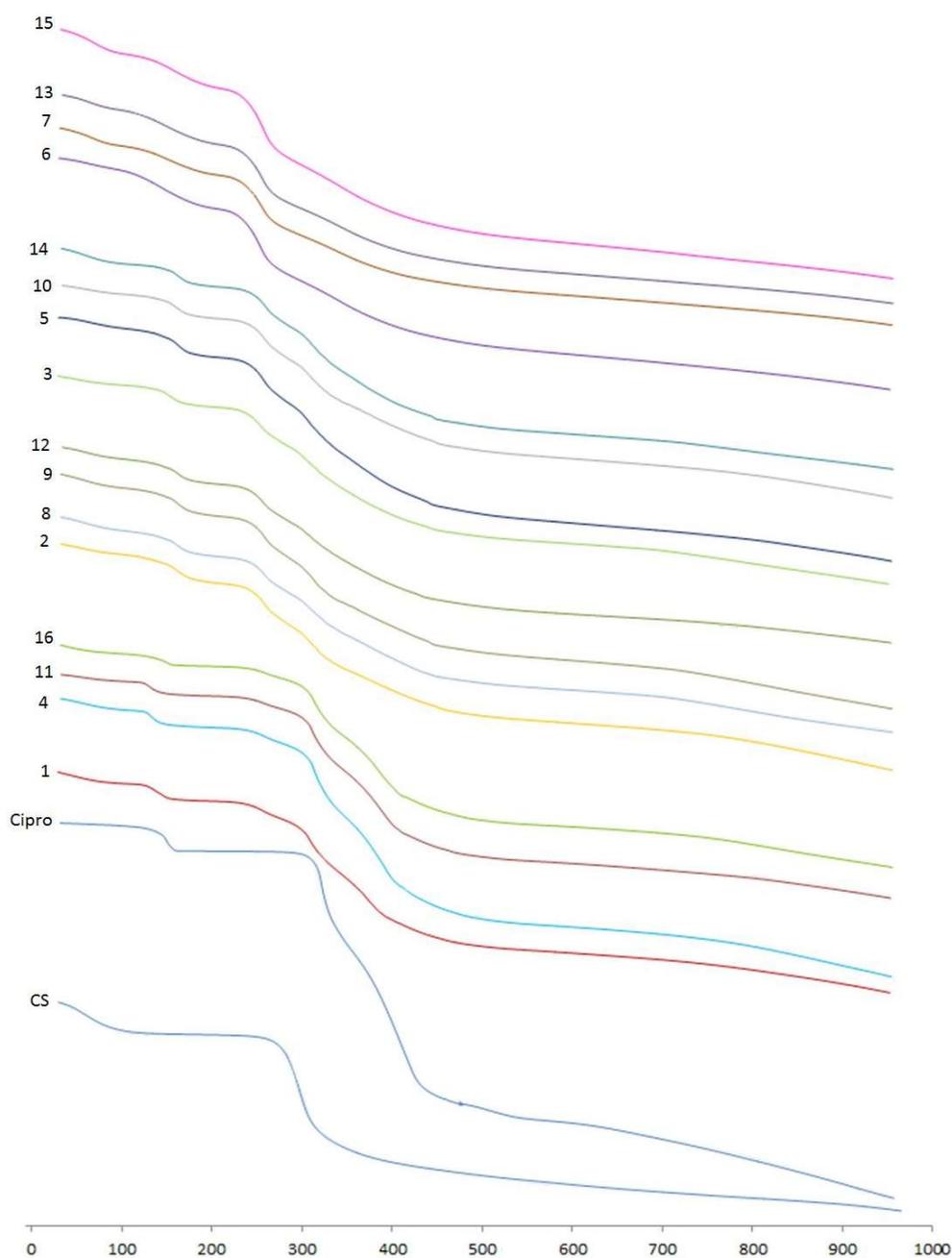


Figura 55: Curvas de TG de los productos puros y de las formulaciones utilizadas para preparar las micropartículas de quitosano estudiadas.

En la curva correspondiente al Cipro podemos ver que se produce una pérdida de un 7 % de masa que comienza en torno a los 100° C, lo que podría deberse a una pérdida de agua de la muestra, ya que como se comentó en el DSC, se trata de una sustancia higroscópica. Alrededor de 290° C, se produce una pérdida de masa de un 21 %, debido a la fusión del Cipro, que se acompaña de otra pérdida de masa de un 41 %, correspondiente a la descomposición que sigue a su fusión del Cipro. Finalmente encontramos otra pérdida de masa mucho más gradual, debida a la descomposición final de la muestra. Estos resultados han sido confirmados con los estudios realizados por Turel y Bukovec (9) que analizan la estabilidad térmica de Ciprofloxacino y sus componentes. Silva-Júnior et al. (20) realizan un estudio térmico de micropartículas elaboradas mediante spray dryer que contienen Cipro y PLGA obteniendo resultados de TG para Cipro que coinciden con nuestros resultados.

La curva del CS muestra que este polisacárido sufre una pérdida de masa de un 11 % que comienza a producirse a los 110° C, que se corresponde a la pérdida de agua dada su higroscopicidad. Entre 220° C y 520° C se observa una pérdida de masa de un 51 %, que se debe a una rotura de los enlaces éter de las cadenas de CS, provocando una descomposición del polímero. Finalmente vemos dos procesos finales de pérdida de masa pequeños de 7 % y 4 % que corresponde a una descomposición muy gradual de los residuos de glucosamina obtenidos tras la rotura previa de los enlaces éter. Estos resultados corroboran los encontrados por Pawlak y Mucha (21) en un estudio termogravimétrico y de infrarrojos de las cadenas de quitosano. Otros autores como Ramya et al. y Sakurai et al. también han caracterizado este polímero (4,22).

Como ocurría con las curvas de DSC, en las muestras de las formulaciones con las que se elaboran las micropartículas, los resultados de pérdida de masa se solapan, siendo más evidentes los correspondientes a la sustancia activa o al polímero, según que la muestra lleve más o menos porcentaje de cada uno. Incluso en las muestras con proporción 1:2 se llegan a solapar los dos procesos ocurridos en el Cipro en un único proceso térmico.

Destaquemos que la proporción de agua en estas muestras es menor que en los productos puros, debido a la evaporación sufrida en la síntesis de las micropartículas. En consecuencia la pérdida de agua de todas ellas es mucho menos evidente.

A nivel general podemos decir que en todas las muestras analizadas se ven dos procesos de pérdidas de masa que comienzan al inicio del estudio térmico y acaban en torno a 180° C. La primera, más o menos uniforme en todas las muestras, es de un 3-7 %, mientras que la segunda se corresponde con un 4-13 % de pérdida de masa y resulta algo menos uniforme.

A continuación, entre 180° y 400° C, los procesos ocurren o comienzan a las mismas temperaturas en todas las muestras. La descomposición de CS comienza a los 220° C y acaba a los 300° C y a continuación comienza la fusión y descomposición del Cipro que abarca los 300-520° C.

Por último, se comprueba en todas que hay una pérdida de masa final o residual, que comienza a 400° C y que se debe a la descomposición total de los residuos de los compuestos que forman las micropartículas.

1.4. Ensayo disolución

Se realiza el ensayo de las micropartículas que se preparan con un 1% de Cipro y 2% de CS (proporción 1:2) o bien 0.5% de CS (proporción 2:1). Los correspondientes perfiles de disolución se muestran en la figura 56.

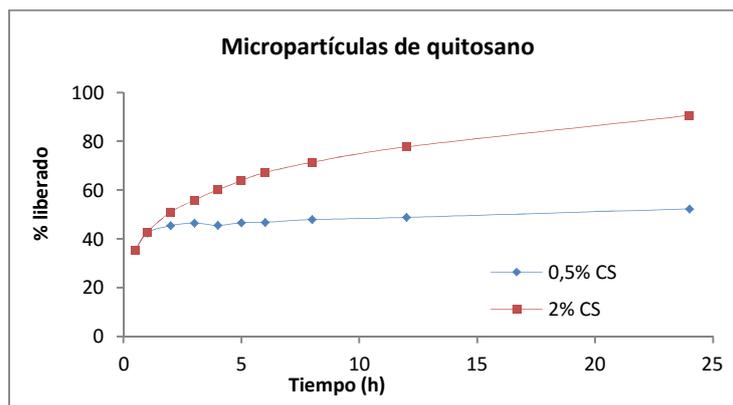


Figura 56: Perfil de liberación de micropartículas de quitosano con 0.5 % CS y 2 % CS.

Las curvas de disolución en ambos casos muestran que ambos tipos de micropartículas a las 2 h han liberado entre un $40-50 \pm 0.45$ % de su contenido, porcentaje de fármaco demasiado alto para nuestro objetivo. Las micropartículas que llevan un 0.5 % de CS prácticamente no liberan más Cipro hasta el final del ensayo (24h). Sin embargo, las que contienen un 2 % de CS continúan liberando gradualmente el fármaco que contienen, hasta alcanzar al final del ensayo una liberación de un 90 ± 2.6 %. La diferencia en esta liberación podríamos encontrarla en que, como se dijo en el análisis estadístico, el tamaño de partícula se ve influenciado por la concentración del quitosano, siendo las micropartículas más pequeñas, cuando la concentración del polímero aumenta. Por lo que, según lo encontrado en la bibliografía, podemos decir que a mayor superficie específica, las micropartículas liberan más rápidamente.

Estos resultados encontrados utilizando solamente CS para la elaboración de la matriz de las micropartículas, confirman lo encontrado en la extensa bibliografía consultada, en el sentido de que las micropartículas así obtenidas resultan excesivamente porosas y por tanto permiten una fácil penetración del medio de disolución en la matriz. Ésta, rápidamente se hincha y favorece la pronta salida del fármaco, que no queda lo suficiente retenido. Mi et al. (23) exponen similares resultados en un estudio sobre microesferas de quitosano, y además ponen de manifiesto la necesidad de un entrecruzamiento para un mejor control de la liberación del fármaco.

Por tanto, tras una búsqueda de una extensa cantidad de artículos relacionados con quitosano y su entrecruzamiento, intentamos elaborar micropartículas entrecruzando al CS con TPP (tripolifosfato sódico). Se elaboraron de similar manera

que las no entrecruzadas, salvo que una vez preparada la solución de CS (2 %) en ácido acético, se adiciona el TPP al 0.2 % junto con el Cipro al 1 %, dejándolos en agitación 2 horas. Finalmente se nebulizan en el spray dryer bajo las mismas condiciones que las no entrecruzadas.

Para confrontar las diferencias entre la superficie de las micropartículas entrecruzadas o no con TPP, se estudiando por microscopía SEM, mostrando las microfotografías obtenidas en la figura 57.

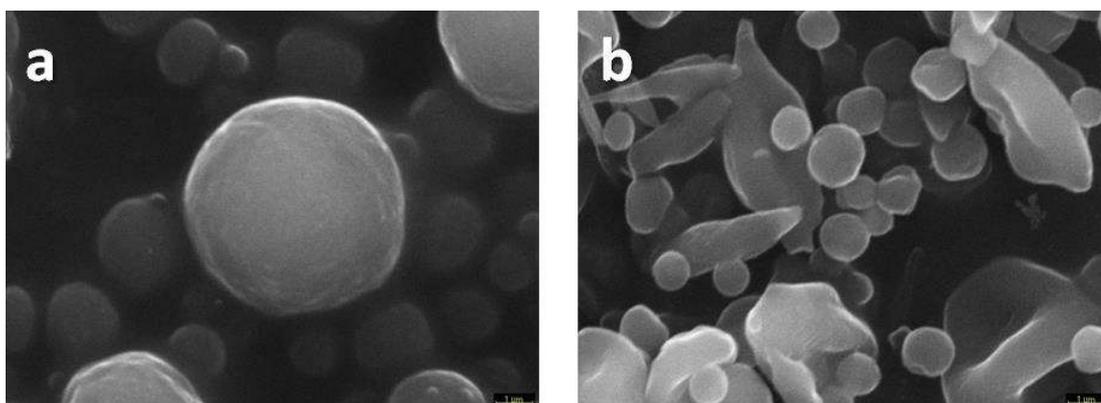


Figura 57: Microfotografía de micropartículas de quitosano a) sin entrecruzar; b) entrecruzadas con TPP.

En ella, se comprueba que la superficie de las micropartículas elaboradas sin entrecruzamiento es más rugosa, mientras que en las elaboradas entrecruzando el CS con TPP muestran superficies más lisas y también son de menor tamaño (24).

En la figura 58 podemos ver el perfil de liberación de las micropartículas de quitosano con una concentración de 2 % de CS y entrecruzadas con TPP, en medio PBS a un pH 7.4.

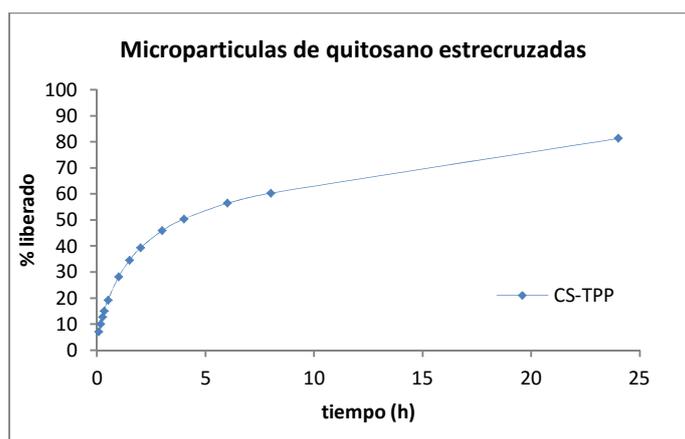


Figura 58: Perfil de liberación de micropartículas de quitosano entrecruzadas con TPP.

Se comprueba que presentan un perfil de liberación similar al obtenido con las micropartículas sin entrecruzar con la misma concentración de quitosano. A las 2 horas se ha liberado un 40 ± 1.5 % y continúa liberando progresivamente Cipro hasta alcanzar un 90 ± 2.6 % a las 24 horas de ensayo.

Los resultados obtenidos tampoco fueron los esperados, ya que tampoco consiguen perfiles de liberación que se ajusten al objetivo de esta tesis, por lo que abandonamos esta línea de trabajo y ampliamos el estudio de las micropartículas con los Eudragit®.

2. Micropartículas de Eudragit®

Para la elaboración de estas micropartículas, se utilizan los polímeros ERS, ERL y una mezcla 1:1 de ambos. Se sintetizan micropartículas con proporción 2:1 y 1:2 fármaco:polímero, como las estudiadas para quitosano. Además para completar el estudio se utiliza una proporción intermedia, 1:1. Con estas mismas proporciones se elaboran micropartículas por otro método de síntesis, evaporación del disolvente.

Para cada uno de los métodos empleados (ev: evaporación del disolvente o sp: secado por nebulización) y para cada proporción fármaco:polímero, hay tres formulaciones. De ellas, en la primera se utiliza como polímero ERS, en la segunda ERL y en la tercera la mezcla de ambos polímeros a partes iguales (1:1). La composición de las formulaciones utilizadas se recoge en la tabla 4 y 5 del apartado de materiales y métodos.

2.1. Caracterización física de las micropartículas de Eudragit®

Los resultados de la eficiencia de encapsulación, tamaño de partícula y rendimiento del proceso, para estas micropartículas, se recogen en la tabla 10.

Eficiencia de encapsulación o Carga (%)

Tras el estudio comparativo de esta tabla 10, se puede deducir que la eficiencia de encapsulación es mayor cuanto mayor es la proporción de fármaco en la formulación, sea cual sea el método de síntesis utilizado y el polímero o mezcla de ellos utilizado en la síntesis de micropartículas.

De las micropartículas elaboradas por el método de evaporación del disolvente, entre las que tienen una proporción fármaco:polímero de 2:1, las de la formulación 3ev tiene una eficiencia de encapsulación de un 80 %, superior a las otras dos. Sin embargo, en las otras dos proporciones estudiadas, todas tienen una carga muy similar, en torno a un 55 % de fármaco encapsulado para las elaboradas con proporción 1:1, y de un 30-40 % para las de proporción las 1:2.

En las micropartículas elaboradas mediante el secado por nebulización, podemos observar que las eficiencias de encapsulación no son tan homogéneas como en el grupo anterior, presentando las micropartículas con proporciones 2:1 y 1:1, una eficiencia de encapsulación entre un 60-70 %, superior a las de proporción 1:2, que tienen una carga en torno al 40-50 %.

Tanto las micropartículas elaboradas por evaporación del disolvente como por secado por nebulización, la mayor eficiencia de encapsulación se obtiene para las que se han elaborado a proporción 2:1 y se ha utilizado la mezcla de ERS y ERL. Las obtenidas por evaporación del disolvente tienen un 80.62 % de carga y las obtenidas por secado por nebulización, un 84.9 %.

Tamaño de partícula

Tras el análisis granulométrico de las micropartículas (tabla 10), se puede deducir que, en general las elaboradas con el método de secado por nebulización tienen un tamaño menor que las elaboradas por evaporación del disolvente. Las curvas de distribución completas vienen recogidas en el anexo II.

Los tamaños de partículas elaboradas con el método de evaporación del disolvente, son aparentemente bastante altos (tabla 10), pero al estudiar con detenimiento los resultados de este análisis (anexo II), se puede comprobar que, en la mayor parte de las micropartículas la distribución granulométrica presenta una distribución multimodal. Destacan las muestras 2ev y 9ev, en las que los tamaños son bastante más pequeños que en el resto, lo cual nos hizo suponer que posiblemente los componentes utilizados en la elaboración de las micropartículas por este procedimiento, en las condiciones a las que se ven sometidos en el ensayo granulométrico, favorecen la agregación. En consecuencia, aunque son mayores que las obtenidas por secado por nebulización, no son tan grandes como aparece reflejado en los datos.

Para comprobarlo, tratamos con ultrasonidos las micropartículas en suspensión justo antes de realizar la determinación granulométrica, con lo que se consigue romper los agregados. A modo de ejemplo se muestran los resultados conseguidos con la muestra 7ev antes (figura 57 a) y después (figura 57 b) del tratamiento, en donde vemos claramente que tras recibir ultrasonidos, el resultado es una curva de distribución bimodal con tamaños de partícula menores.

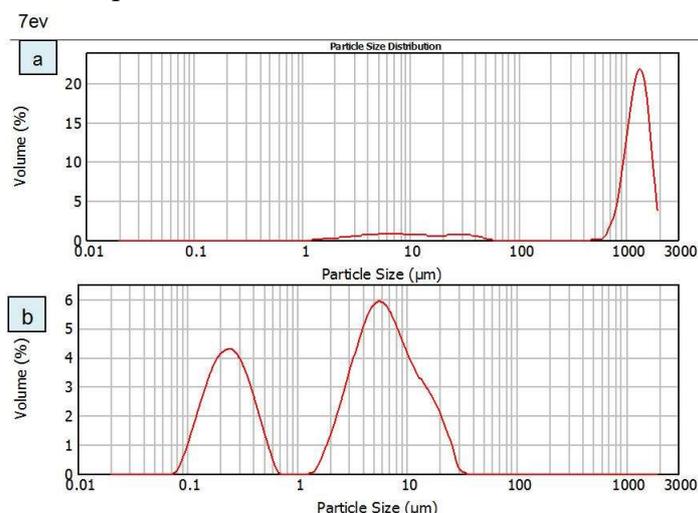


Figura 59: Distribución granulométrica de las micropartículas de fórmula 7ev: a) antes; b) después del tratamiento con ultrasonidos.

Esta agregación también se comprueba al estudiar estas micropartículas con la microscopía electrónica de barrido (SEM).

El estudio comparativo de las micropartículas elaboradas por secado por nebulización, permite afirmar que las micropartículas elaboradas con las proporciones 1:1 y 1:2 tienen un tamaño muy similar (entre 3-4.5 μm) y menor que las de proporción 2:1. Además, las micropartículas de proporciones 1:1 y 1:2, con la mezcla de ERS + ERL (muestras 6sp y 9sp), tienen un tamaño ligeramente superior que sus homólogas elaboradas con uno solo de los polímeros.

Rendimiento del proceso de encapsulación (%)

En líneas generales el rendimiento del proceso (tabla 10) de secado por nebulización es superior al del método de evaporación del disolvente y además, a excepción de las muestras 1sp y 2sp, resulta más homogéneo, entre un 65-72 %, frente al 37 % y al 82 % que se consigue con el de evaporación del disolvente.

Tabla 10: Resultados de eficiencia de encapsulación, tamaño de partícula, y rendimiento del proceso de encapsulación para micropartículas de Eudragit®.

Muestras	Proporción Fármaco:polímero	Eficiencia de encapsulación (%)	Tamaño de partícula (μm)	Rendimiento (%)
1ev	2:1	66 \pm 0.02	138.038 – 158.489	57.93
2ev		66.54 \pm 0.0	45.709 – 52.481	81.93
3ev		80.62 \pm 0.08	1258.925 – 1445.440	37.4
4ev	1:1	55.15 \pm 0.02	478.630 – 549.541	68
5ev		55.35 \pm 0.01	1258.925 – 1445.440	53.9
6ev		54.57 \pm 0.02	363.078 – 416.869	54.9
7ev	1:2	37.48 \pm 0.01	1258.925 – 1445.440	64.7
8ev		33.79 \pm 0.07	1258.925 – 1445.440	51.13
9ev		29.47 \pm 0.04	19.953 – 22.909	79.37
1sp	2:1	58.82 \pm 0.02	208.930 – 239.883	8.74
2sp		65.31 \pm 0.0	26.306 – 30.200	44.753
3sp		84.9 \pm 0.03	17.378 – 19.953	71.56
4sp	1:1	80.45 \pm 0.01	3.802 – 4.365	72.05
5sp		63.74 \pm 0.04	3.311 – 3.802	70.05
6sp		67.8 \pm 0.04	4.365 – 5.012	73.495
7sp	1:2	51.15 \pm 0.03	3.802 – 4.365	65.52
8sp		42.73 \pm 0.02	3.802 – 4.365	71.92
9sp		39.99 \pm 0.0	4.365 – 5.012	69.15

Los datos presentados sobre la caracterización de las micropartículas elaboradas mediante el método de evaporación del disolvente, concuerdan con los datos obtenidos por Biswal et al. (25) en un estudio en el que sintetizan microesferas de losartan potásico elaboradas con ERS 100 y ERL 100 mediante este método. Sus resultados son similares en cuanto al tamaño de partícula y eficiencia de encapsulación, aunque el rendimiento es ligeramente superior.

Sin embargo, Esposito et al. (26) realizan un estudio de micropartículas de Eudragit para encapsular vitamina C, y obtienen valores de tamaños de partícula muy superiores a los nuestros y de rendimiento muy por debajo de los obtenidos con el mismo método.

Morfología y tamaño (SEM)

Se analizan mediante microscopía SEM todas las micropartículas para identificar su apariencia física, morfología, superficie y características.

Es necesario decir que debido a las características de esta técnica, para enfocarlas se necesita una energía tan elevada que las micropartículas se rompen. En consecuencia, las microfotografías obtenidas no son tan claras o nítidas como sería deseable, pero han servido para dar una idea de los tamaños, la morfología, la agregación o no agregación, y en menor medida, la superficie.

En las figuras 60 y 61 se presentan las microfotografías de las micropartículas de Eudragit[®] obtenidas por evaporación del disolvente (figura 60) y por secado por nebulización (figura 61).

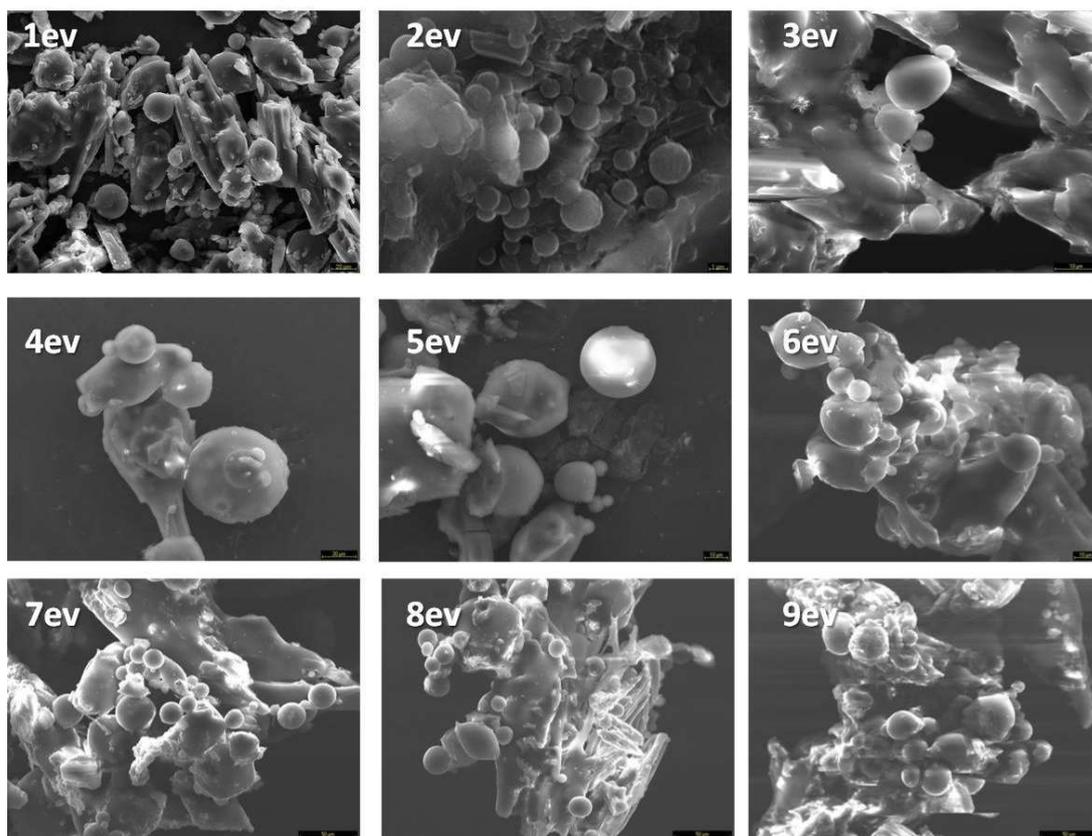


Figura 60: Microfotografías de las micropartículas de Eudragit[®] obtenidas por el método de evaporación del disolvente.

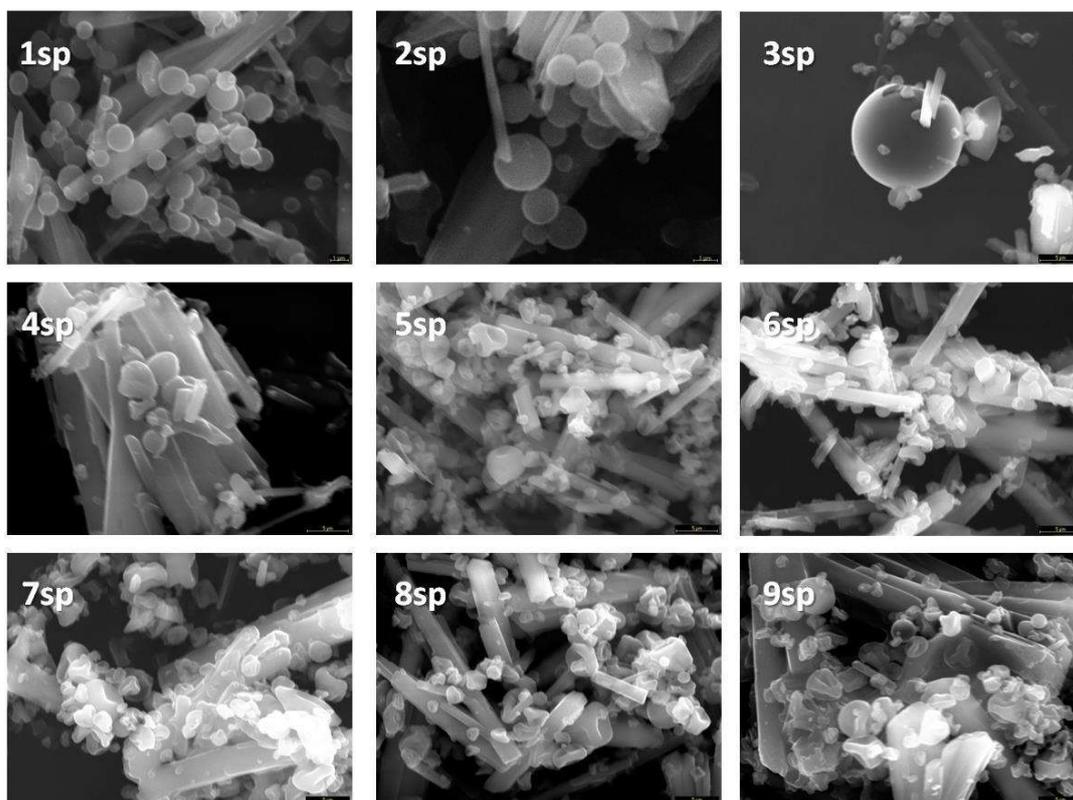


Figura 61: Microfotografías de las micropartículas de Eudragit® obtenidas por el método de secado por nebulización.

En ellas podemos observar como a nivel general, las micropartículas tienen un tamaño heterogéneo, lo cual nos confirman los resultados obtenidos en el ensayo granulométrico, en cuanto a la polidispersión. Las partículas son esféricas y aparentemente de superficie lisa, pudiendo observar además que en ambos métodos quedan restos de polímeros tras la síntesis. Por último, destaquemos que las micropartículas obtenidas por el método de evaporación del disolvente tienen más tendencia a aparecer agregadas que las elaboradas por el método de secado por nebulización.

2.2. [Ensayo de disolución](#)

Se realizan los ensayos de estas micropartículas según lo explicado en el apartado 4 de materiales y métodos, utilizando 600 ml de solución reguladora. En estos ensayos se pretende estudiar la influencia del método de síntesis, de la proporción utilizada y del polímero utilizado sobre la velocidad de disolución.

Se utilizan dos medios de disolución: uno a pH 1.2, para reproducir el paso de las partículas por el estómago y otro a pH 7.4, simulando su paso por el colon. En las figuras 62-64 se muestran los perfiles de liberación del antibiótico contenido en las micropartículas.

A pH 1.2 se aprecia que las micropartículas elaboradas por evaporación del disolvente, a excepción de las correspondientes a las formulaciones 7ev, 8ev y 9ev (figura 62 a), muestran inicialmente un perfil de liberación excesivamente rápido (efecto

burst), ya que en la primera hora han cedido entre un 60 y un 90 % del fármaco que contienen y a partir de ese momento, la cesión se ralentiza hasta el final del ensayo, momento en el que han cedido entre un 85 y un 90 % de Cipro. En el caso de las micropartículas preparadas por secado por nebulización (figura 62 b), aunque en los primeros 30 minutos no es tan rápida como en las anteriores, y a excepción de las muestras 4sp, 6sp y 7sp, también se observa una liberación inicial excesivamente rápida del principio activo, que luego se ralentiza hasta el final del ensayo.

Esta liberación inicial podría deberse a una liberación de fármaco libre adherido a las micropartículas pero que no forma parte de su matriz.

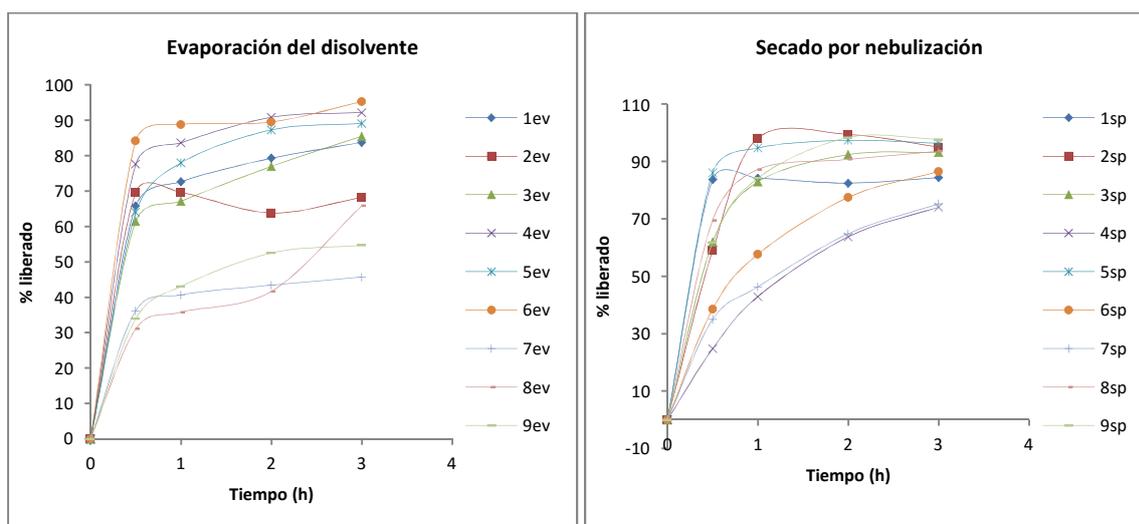


Figura 62: Perfiles de liberación de las micropartículas de Eudragit® a pH 1.2: a) obtenidas por evaporación del disolvente y b) obtenidas por secado por nebulización.

Estos resultados prueban la necesidad de proteger las micropartículas con un recubrimiento entérico o mediante otro procedimiento, para evitar la cesión de la práctica totalidad del fármaco en las condiciones del estómago.

En la figura 63 se recogen los perfiles de liberación de estas micropartículas a pH 7.4. Para facilitar su estudio comparativo, se muestran en cada gráfica las de igual composición, pero elaboradas por distinto método.

En general se observa al principio, una liberación rápida del antibiótico (mismo efecto burst anteriormente descrito), seguida de un periodo de liberación más lento. Además se evidencia que las micropartículas elaboradas con el método de evaporación del disolvente (líneas rojas de todas las gráficas) ceden más rápidamente al fármaco que las que se preparan por secado por nebulización, indicando que con este último procedimiento se controla de una manera más eficaz la liberación.

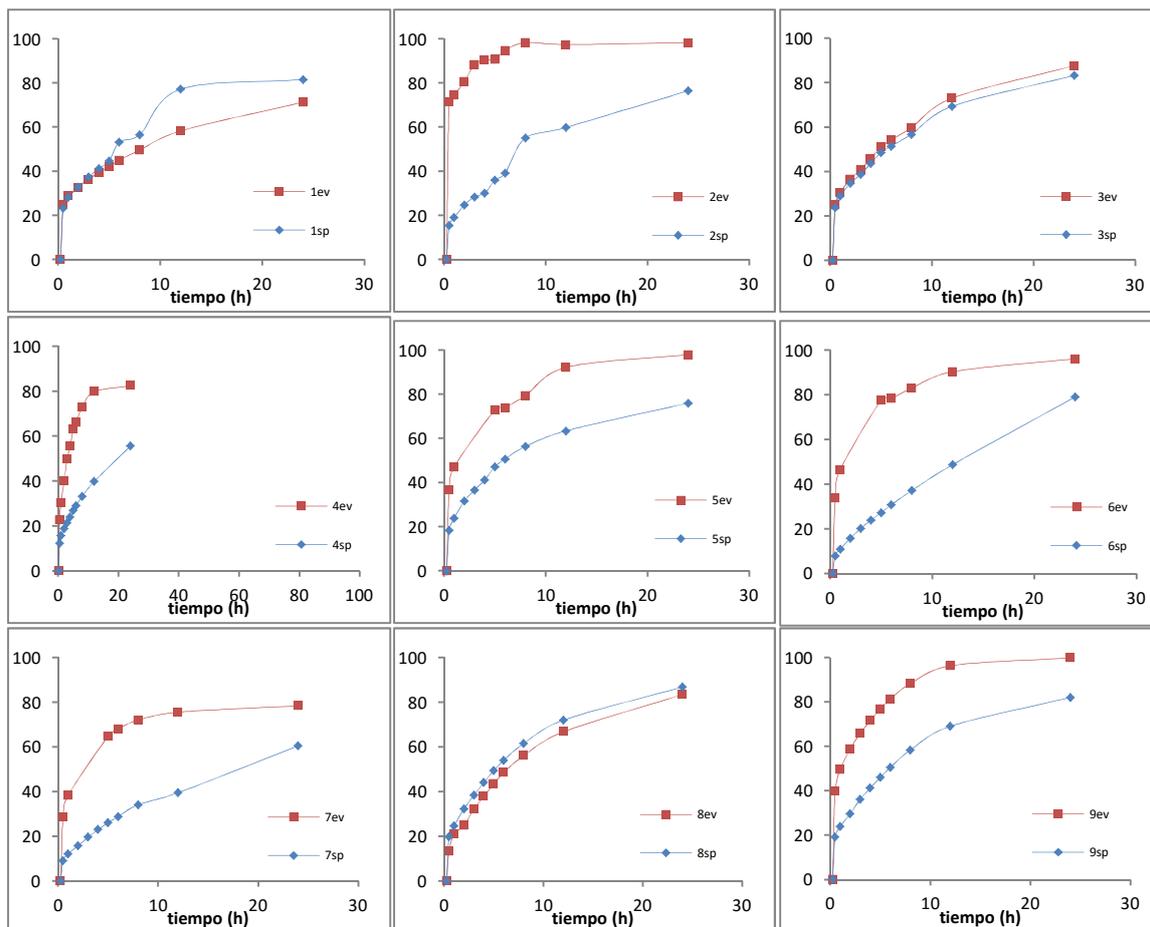


Figura 63: Perfiles de liberación de las micropartículas de Eudragit® a pH 7.4 de muestras homólogas pero elaboradas por distinto método de síntesis.

Estos resultados condujeron a la selección del procedimiento de desecación por nebulización y para determinar la proporción fármaco:polímero más adecuada a nuestro objetivo, se presentan (figura 64) los perfiles de disolución de las micropartículas agrupándolas por el tipo de polímero utilizado.

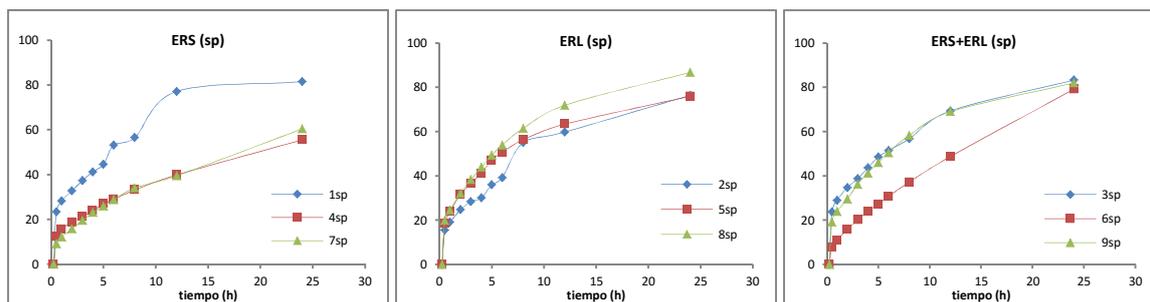


Figura 64: Perfiles de liberación de las micropartículas elaboradas por secado por nebulización, agrupadas según el polímero utilizado.

En cada gráficas, las líneas de color azul corresponden a las muestras con proporción 2:1 de fármaco:polímero, las rojas corresponden a las 1:1 y las verdes a la 1:2. De su estudio comparativo, se puede deducir que la liberación del principio activo de las micropartículas viene regido por la proporción fármaco:polímero. En general, las

micropartículas formuladas con la proporción 2:1 tienen perfiles de liberación anómalos e irregulares. Las micropartículas que presentan un mejor control de la liberación del fármaco son las de proporciones 1:1 y 1:2, siendo esta última la que más se ajusta a nuestro objetivo. Estos resultados concuerdan con los presentados por Garekani et al. (27) en un estudio realizado con una solución orgánica y una dispersión acuosa de ERS para una liberación prolongada de teofilina en donde ponen de manifiesto que la liberación está influida por la proporción fármaco:polímero, y además es más lenta debido a que las partículas de fármaco quedan mejor atrapadas en las micropartículas elaboradas con una solución orgánica que con una dispersión acuosa.

2.3. Análisis estadístico de las micropartículas de Eudragit®

Se ha realizado un estudio estadístico (Design Expert® V8) de las micropartículas de Eudragit® para estudiar la influencia de las variables de síntesis sobre las variables eficiencia de encapsulación, tamaño de partícula y liberación de fármaco a las 24 horas en el ensayo de disolución. Por consiguiente se utiliza un diseño en el que se tienen:

- Variables de síntesis
 - Método de síntesis: secado por nebulización (sp) o evaporación del disolvente (ev).
 - Proporción fármaco:polímero: 2:1, 1:1 y 1:2.
 - Tipo de polímero utilizado: ERS, ERL o mezcla (1:1) de ambos polímeros.
- Parámetros
 - Eficiencia de encapsulación o carga (%).
 - Tamaño de partícula.
 - Porcentaje de fármaco liberado a las 24h.

Como para el caso de las micropartículas de quitosano, se obtienen unas ecuaciones y unos gráficos que muestran el impacto relativo de las variables de síntesis, mediante la comparación de los coeficientes de las variables a medir.

Eficiencia de encapsulación (%)

La ecuación que representa la influencia de las variables de síntesis sobre este parámetro y los gráficos correspondientes, se muestran en la figura 65.

Se puede observar en las gráficas que la eficiencia de encapsulación, sea cual sea el polímero utilizado y sea cual sea la técnica de síntesis utilizada para la elaboración de las micropartículas, es mayor cuanto mayor es la proporción fármaco:polímero (2:1 > 1:1 > 1:2), es decir es mayor cuanto más cantidad de fármaco contiene la formulación. También se observa en la ecuación, ya que el coeficiente que acompaña a la variable B[1] (proporción 1:2) es mayor que el coeficiente que acompaña a B[2] (proporción 1:1).

Eficiencia de encapsulación = +57.44 + 12.93 * B[1] + 5.41 * B[2]
 (B= proporción fármaco:polímero; B[1]=proporción 2:1, B[2]=proporción 1:1 y B[3]=proporción 1:2)

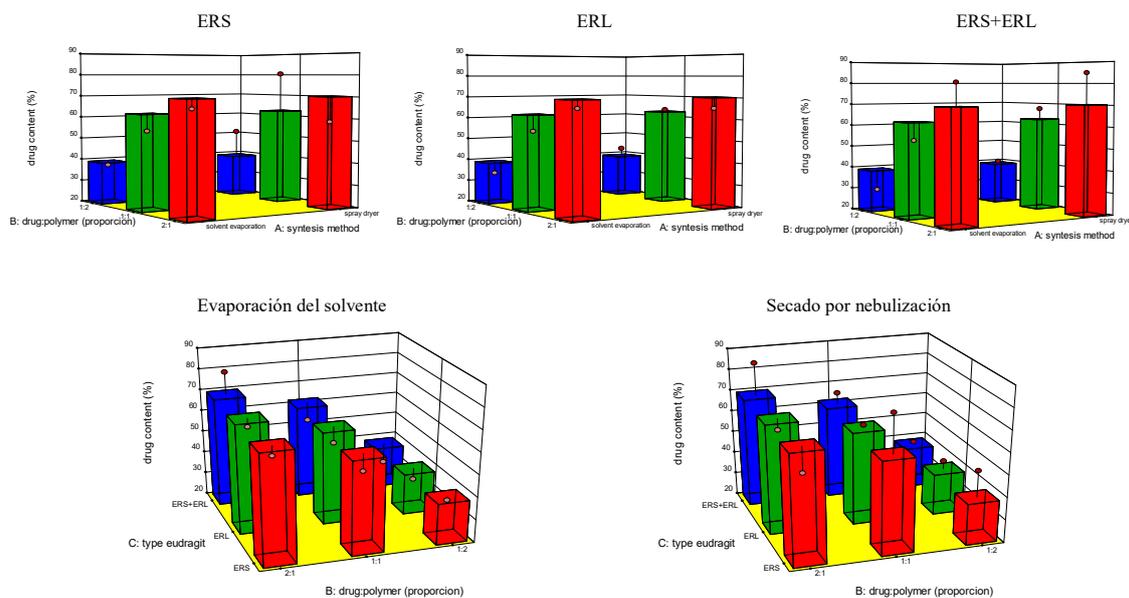


Figura 65: Ecuación y gráficos que describen la influencia de las variables de síntesis sobre la eficiencia de encapsulación.

El estudio ANOVA lo corrobora ya que el factor que tiene un efecto estadísticamente significativo es la proporción utilizada ($p < 0.05$).

Tamaño de partícula

La ecuación que representa la influencia de las variables de síntesis sobre este parámetro y los gráficos correspondientes, se muestran en la figura 66.

Del estudio de la ecuación y los gráficos se puede deducir que sea cual sea el polímero utilizado y sea cual sea la proporción fármaco:polímero utilizada en la elaboración, las micropartículas son menores con el procedimiento de secado por nebulización que con el de evaporación del disolvente.

El estudio ANOVA de los datos confirma que el único factor que tiene un efecto estadísticamente significativo es el método de síntesis utilizado ($p < 0.05$).

$$\text{Tamaño de partícula} = +320.19 - 297.68 * A \text{ (A= método de síntesis)}$$

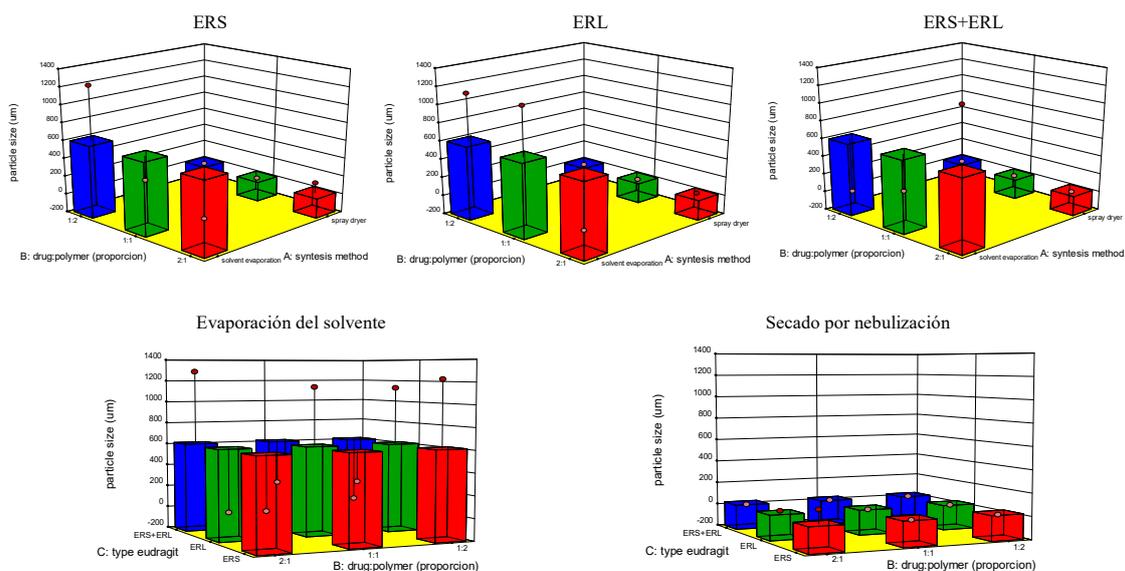


Figura 66: Ecuación y gráficos que describen la influencia de las variables de síntesis sobre el tamaño de partícula.

Porcentaje de fármaco liberado fármaco a las 24h

Tras el estudio estadístico podemos determinar que la ecuación que representa la influencia de las variables de síntesis sobre este parámetro y los gráficos correspondientes, se muestran en la figura 67.

$$\text{Liberación} = + 75.17 - 6.48 * A \text{ (A= método de síntesis)}$$

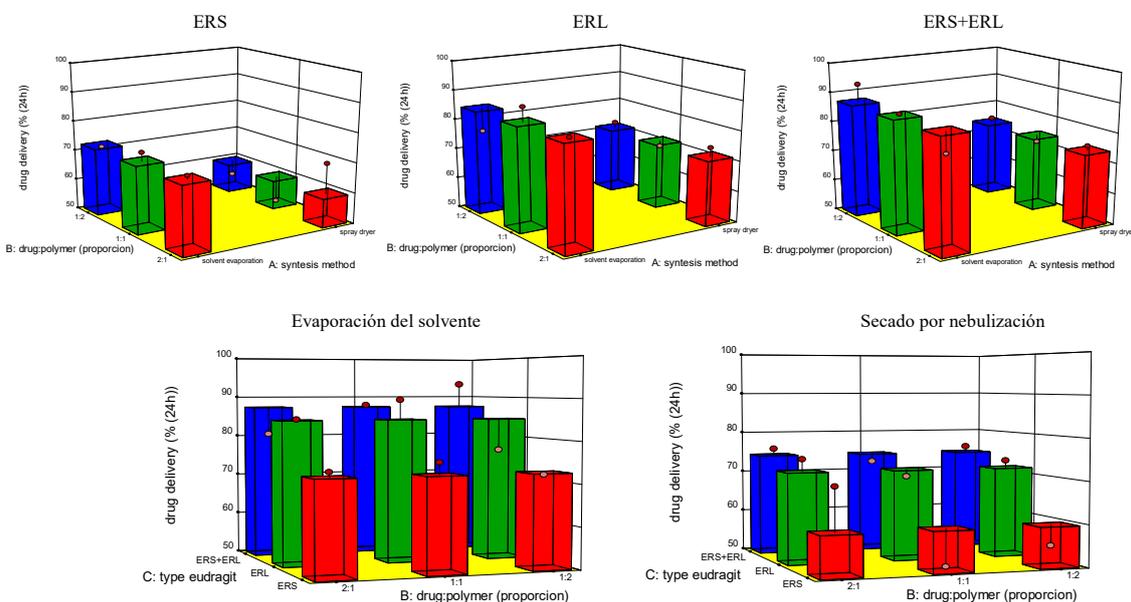


Figura 67: Ecuación y gráficos que describen la influencia de las variables de síntesis sobre el porcentaje de fármaco liberado a las 24 h.

Sea cual sea la proporción fármaco:polímero estudiada, el mayor porcentaje de fármaco liberado a las 24 horas de ensayo de disolución se alcanza cuando tenemos una mezcla de ambos polímeros (ERS+ERL) y las micropartículas se sintetizan por el

método de evaporación del disolvente. Las muestras con ERS elaboradas por secado por nebulización son las que liberan menor porcentaje de fármaco.

Estos resultados se ven apoyados con el estudio ANOVA de los datos ya que tienen un efecto estadísticamente significativo el tipo de polímero utilizado y el método de síntesis utilizado ($p < 0.05$).

2.4. Discusión ensayos preliminares

Con los resultados obtenidos de la caracterización de las micropartículas y el posterior estudio estadístico, podemos seleccionar las variables de síntesis que se ajustan mejor al objetivo de nuestro estudio.

- Se pretende que las micropartículas sean capaces de encapsular un gran porcentaje de fármaco, es decir, que la eficiencia de encapsulación sea lo más alta posible. Por consiguiente, las micropartículas elaboradas con el método de secado por nebulización con proporciones 2:1 pueden ser las más adecuadas. Sin embargo:
- Lo ideal es que además el tamaño de partícula sea el menor posible, por lo que el método de secado por nebulización resulta más adecuado que el de evaporación del disolvente.

De las tres proporciones fármaco:polímero estudiadas, las micropartículas con menor tamaño son las preparadas con las proporciones 1:1 y 1:2. Se considera prioritario que tengan menor tamaño de partícula a que se encuentren más cargadas, por lo que resultan más adecuadas las micropartículas elaboradas por secado por nebulización con proporción fármaco:polímero 1:1 y 1:2.

- También es importante optimizar los perfiles de liberación y el porcentaje de fármaco liberado a las 24 h. El objetivo es conseguir micropartículas de liberación prolongada, por lo que las más adecuadas son las sintetizadas por secado por nebulización, utilizando una proporción fármaco:polímero 1:2 ya que el porcentaje de fármaco liberado a las 24 h es menor que en la proporción 1:1.

Por tanto consideramos que las micropartículas con mejores características son las elaboradas por secado por nebulización con una proporción fármaco:polímero 1:2. De las tres formulaciones (7sp, 8sp y 9sp), se escoge, con un estudio más exhaustivo, la formulación óptima con la que se realizan los estudios in vivo y con la que se realizaran las formas farmacéuticas para su administración oral.

3. Micropartículas finales

Una vez escogidos el método de síntesis y la proporción que mejor perfil de liberación presenta, el método de secado por nebulización con una proporción fármaco:polímero 1:2 (-7sp, 8sp y 9sp-); realizamos un estudio más exhaustivo para determinar cuál de las tres formulaciones es la que más se ajusta a nuestro objetivo, según el tipo de Eudragit® utilizado.

3.1. Estudio térmico

Para evaluar la posible interacción entre los elementos que componen cada formulación, o cambios estructurales, así como cambios en las propiedades físicas y químicas de los componentes que se hayan podido producir en la elaboración de las micropartículas, se realiza el estudio térmico cuyos resultados se exponen a continuación.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

En la figura 68 se representan las curvas de DSC correspondientes a los productos puros (ERS, ERL, y Cipro), además de las muestras analizadas (7sp, 8sp, 9sp).

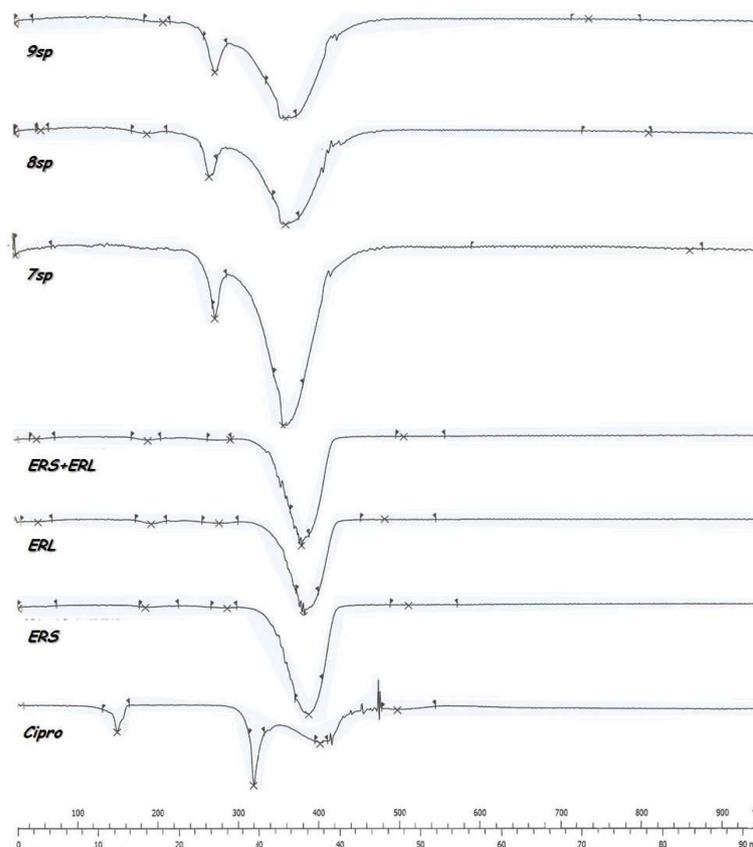


Figura 68: Curvas de DSC de los productos puros y de las formulaciones utilizadas para preparar las micropartículas de Eudragit® estudiadas.

Los resultados de DSC para Cipro ya se han comentado para las micropartículas de quitosano (página 88).

Los Eudragit[®] utilizados en la preparación de las micropartículas, tanto ERS, ERL, como la mezcla física de ambos en proporción 1:1, se comportan como polímeros amorfos. De hecho, no se aprecia ningún evento térmico importante hasta que se alcanzan los 385° C. A esta temperatura se observa un marcado pico endotérmico que podría deberse a una rotura de las cadenas poliméricas y a una volatilización de los monómeros formados en la misma. Como polímeros amorfos, estos compuestos tienen características temperaturas de transición vítrea (Tg), que para el ERS es de 65° C y para el ERL es de 63° C (+/- 5° C). Estos datos Tg concuerdan con los proporcionados por la casa comercial Evonik (28) y con los encontrados por Abbaspour et al. (29) en un estudio realizado con pellets a base de ERS y ERL para elaborar comprimidos.

En los tres tipos de micropartículas, al llevar mayor proporción de polímero que de fármaco, se observan más marcados los picos correspondientes al polímero utilizado en cada caso. El pico endotérmico correspondiente a la fusión del Cipro, queda desplazado hacia la izquierda en torno a una temperatura de 270° C. Este fenómeno es debido, como en las micropartículas de quitosano, a que se forman enlaces más débiles entre los componentes de las micropartículas que los que hay en los cristales de Cipro, como ya vimos para las micropartículas de quitosano. En estas formulaciones no se observa el segundo pico que se debe a la descomposición del antibiótico, ya que queda enmascarado por el polímero, presente en una proporción doble de la suya. En consecuencia, sólo se aprecia el pico endotérmico del polímero pero también desplazado hacia temperaturas inferiores y en los tres casos aparece alrededor de los 365° C.

Análisis termogravimétrico (TG)

Como ya se ha comentado, estos análisis nos permiten corroborar los resultados obtenidos en la calorimetría diferencial de barrido (DSC). Las curvas de TG se muestran en la figura 69, de manera que podemos comparar unas con otras y, además con mayor detalle, podemos ver dichas curvas en el anexo IV, donde se muestran las pérdidas de forma integrada.

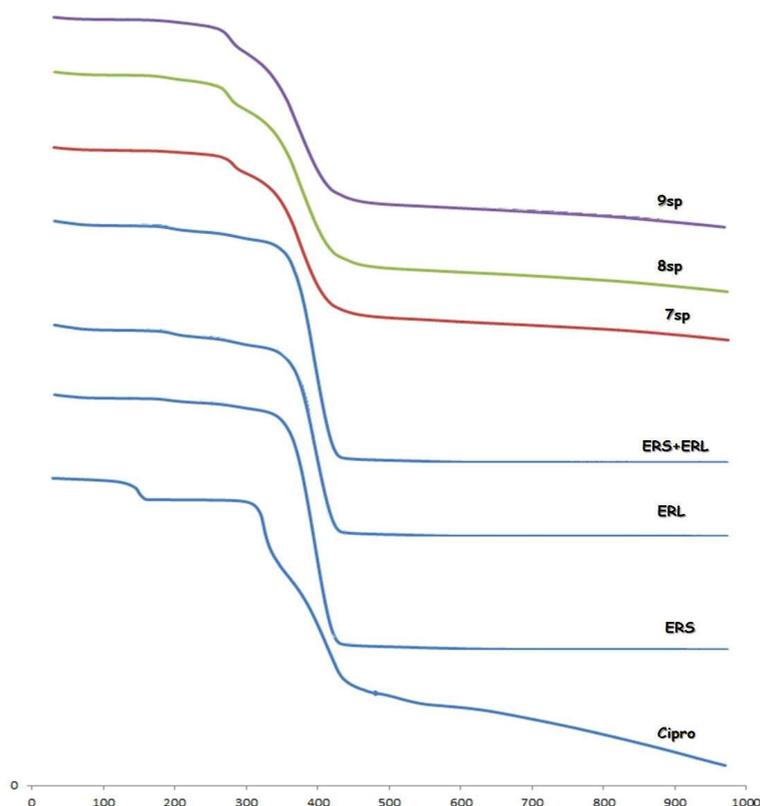


Figura 69: Curvas de TG de los productos puros y de las micropartículas 7sp, 8sp y 9sp finales.

La curva de TG para ciprofloxacino ya se explicó en el apartado de las micropartículas de quitosano (página 90).

Las curvas de los dos polímeros (ERS y ERL) y de su mezcla en proporción 1:1, son prácticamente idénticas, pudiendo dividir las en tres etapas. En la primera, hay una pérdida de masa muy pequeña que comienza a temperaturas muy bajas y acaba en torno a los 300° C, que puede deberse a una volatilización de disolventes o precipitantes que podrían ser restos de la síntesis de los polímeros. En conjunto esto supone una pérdida de no más del 9%. En la segunda etapa, se observa una pérdida de masa muy evidente que comienza a los 300° C y acaba a los 420° C. Dicha pérdida de masa podría deberse a la rotura de las cadenas poliméricas y a la volatilización de los monómeros resultantes. Se produce una pérdida de masa de un 92.6 % para ERS, de un 88.99 % para ERL y de un 90.4 % para la mezcla de ambos (1:1). Finalmente observamos otra etapa en la que se produce la pérdida de masa total del polímero a los 500° C y observamos que la curva se mantiene a 0 hasta el final del estudio térmico.

Estos resultados concuerdan con los encontrados por Zhu et al. (30) en anteriores estudios en los que comprueban que la despolimerización es un proceso libre de radicales y que se inicia al final de la cadena polimérica, que se descomprime rápidamente para formar el monómero. Se observa que a temperaturas superiores a 450° C, la cantidad remanente de ERS es 0, lo que pone de manifiesto que dichos monómeros se corresponden con la parte volátil del polímero metacrílico.

En las curvas de TG de las muestras utilizadas para preparar las micropartículas (7sp, 8sp y 9sp), se aprecia que las tres presentan un comportamiento muy parecido, pudiendo distinguir 4 etapas. La primera de ellas se divide a su vez en dos, correspondiendo la primera a una pérdida de masa muy pequeña, un 1.4 %, a temperaturas próximas a 100° C, atribuible a la pérdida de agua de las muestras; la segunda, con un 2.6 % de pérdida a una temperatura de unos 200° C, se puede deber a la volatilización de restos de productos de síntesis de los polímeros. Sin embargo en la muestra 7sp solo se observa la primera pérdida de masa.

La segunda etapa de la curva, que se corresponde con una pérdida de masa de un 11-12%, tiene lugar entre 200 y 300°C, por lo que podría deberse a la fusión del principio activo.

En la tercera etapa de la curva, se observa una pérdida de masa que comienza a los 300° C y finaliza a los 420-440° C, atribuible a la rotura de las cadenas poliméricas de los Eudragit® y a la volatilización de los monómeros. Al contener mayor proporción de polímero, este proceso enmascara al que ocurriría debido al Cipro (descomposición tras la fusión del mismo). Esta pérdida de masa se corresponde con un 74.7 % para la formulación 7sp, un 71.8 % para la 8sp y un 70.98 % para la 9sp.

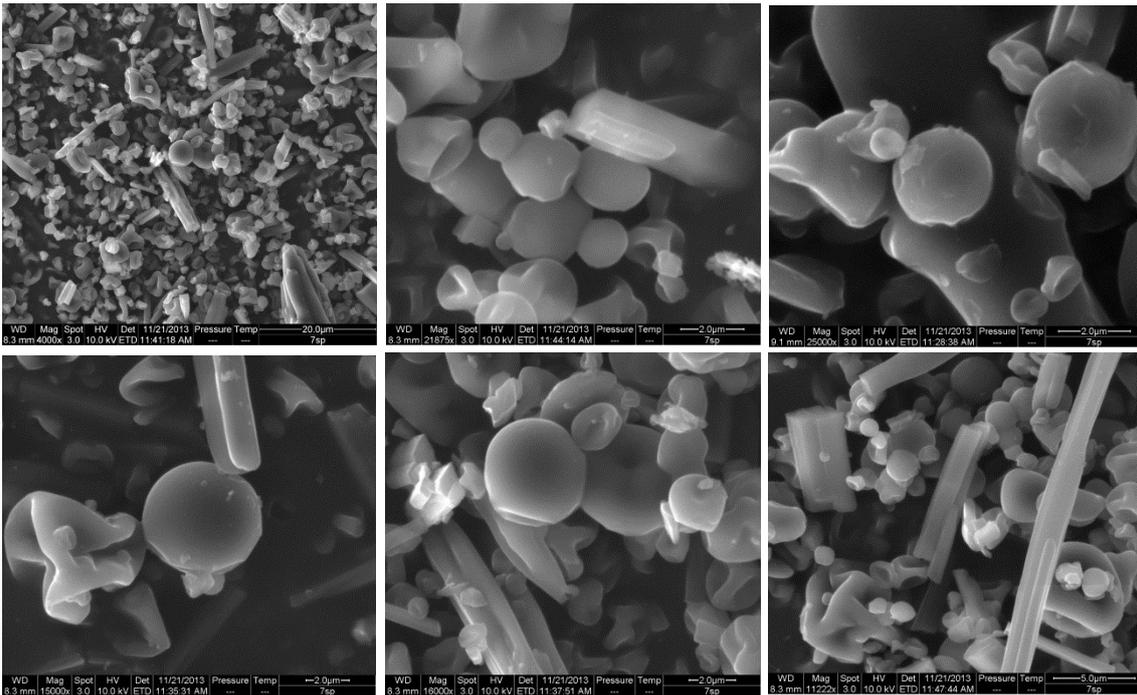
Por último se observa una pérdida de masa de un 10-11 % a temperaturas muy altas, debida probablemente a la descomposición de los restos del principio activo.

3.2. Morfología y tamaño (ESEM)

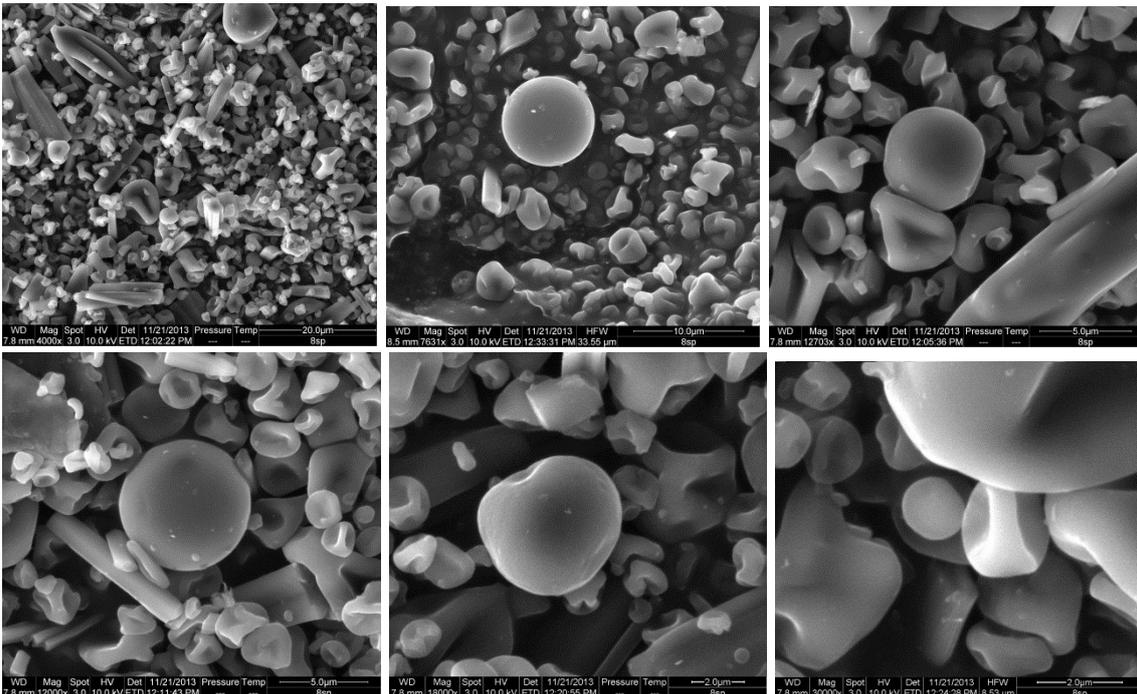
En la figura 70 se muestran las fotografías ESEM de las micropartículas seleccionadas a base de Eudragit®.

En todos los casos se observa que las micropartículas presentan distintos tamaños pudiendo afirmar que presentan una amplia distribución granulométrica. Su diámetro está comprendido entre 5 y 9 µm, lo que indica la polidispersión de las muestras. En general, presentan forma esférica y superficie lisa, pudiendo distinguir algunas partículas de forma alargada, que probablemente sean restos de polímero que quedan tras el proceso de síntesis (26,27).

7sp



8sp



9sp

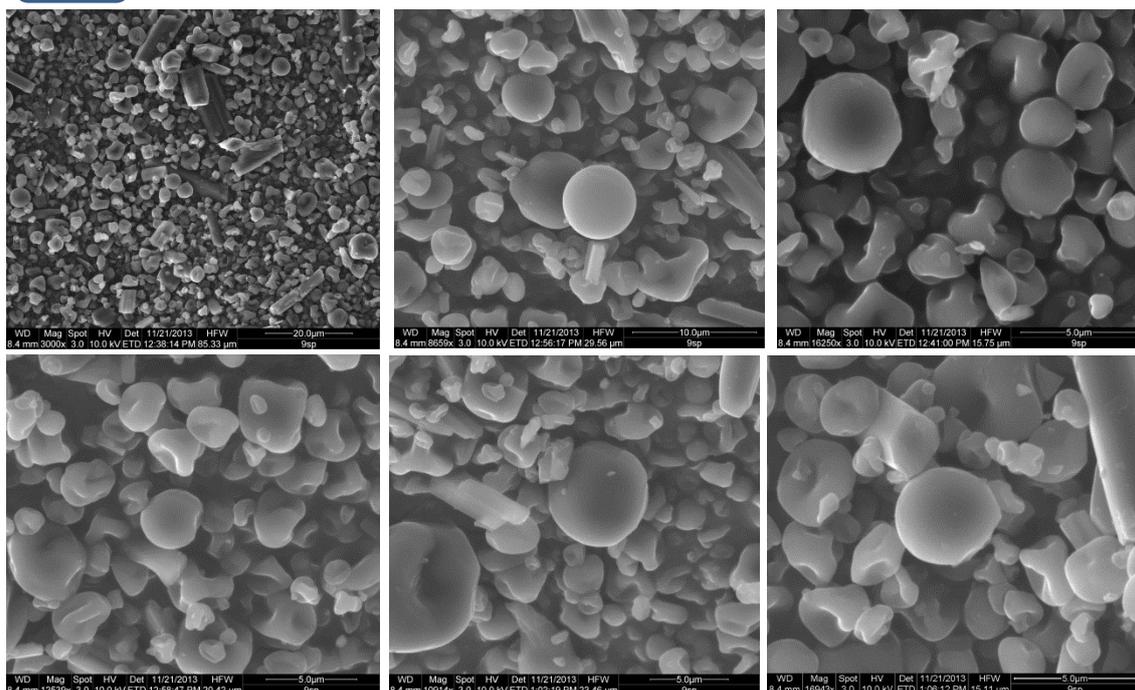


Figura 70: Microfotografía electrónica de barrido ambiental de las muestras 7sp, 8sp y 9sp.

3.3. Ensayos de disolución.

Se realizan ensayos de disolución durante 48 h con un volumen de 1000 ml de solución reguladora (pH 7.4) mostrando los perfiles de liberación en la figura 71.

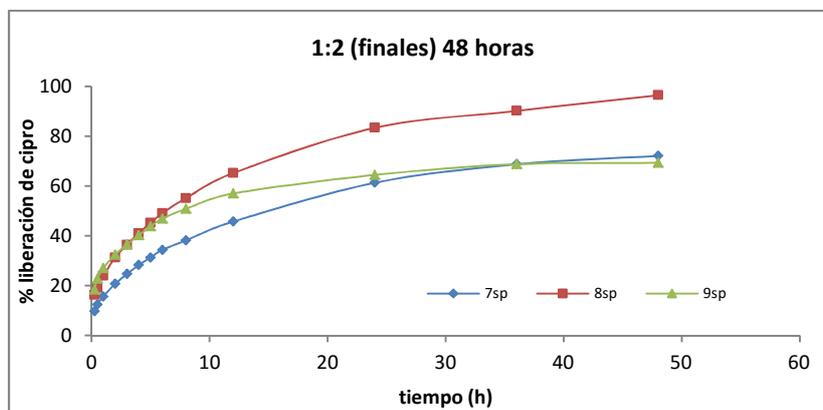


Figura 71: Perfiles de liberación de micropartículas 7sp, 8sp y 9sp durante 48h.

Con los tres tipos de micropartículas se consigue una liberación prolongada, coincidiendo con los estudios de Abbaspour et al., Espósito et al., Garekani et al., Apu et al. y Azarmi et al.(26,27,29,31,32), que elaboran sistemas matriciales a base de Eudragit[®], para la liberación prolongada de distintos fármacos. Las micropartículas de formulación 7sp y 9sp retienen excesivamente al fármaco, ya que a las 24 h han liberado un 60 ± 2.6 % y apenas ceden más antibiótico a las 48 h (70 ± 1.8 %). Las micropartículas de la formulación 8sp liberan un 90 ± 3.13 % a las 24 h y continúan

liberando progresivamente hasta las 48 h alcanzado un 95 ± 3.8 % del fármaco que contienen.

Estos datos también concuerdan con los aportados por Qiao et al. (33) en un estudio que realizan sobre comprimidos recubiertos con ERS y ERL en el que observan que los porcentajes de fármaco liberados alcanzan un 97 % a las 4 horas de ensayo cuando la proporción ERS:ERL es 0:1 mientras que, disminuye a 67 %, 16 % y 6 % cuando dichas proporciones son de 1:2, 1:1 y 2:1 respectivamente.

Oth et al. (34) también corroboran estos hallazgos ya que realizan un estudio de dispersiones sólidas de ERS y ERL para liberación prolongada de indometacina, en el que demuestran que existe una correlación entre la proporción de ERS y ERL utilizada en la preparación y la velocidad de liberación de la sustancia activa. Dicha velocidad aumenta cuando aumenta la cantidad de ERL en las preparaciones. También corroboran dicho comportamiento Joshi et al. (35) en un estudio de microesferas de Eudragit[®], donde afirman que se puede modificar la velocidad de liberación variando las proporciones de ERS y ERL en las preparaciones.

Esto podría tener su explicación en las diferencias estructurales entre ambos polímeros, que determinan que ERS retenga mayor cantidad de fármaco. Así lo demuestran Haznedar y Dortunç (36) en un estudio de microesferas de Eudragit[®] que contienen acetazolamida, donde comprueban que la liberación de principio activo desde microesferas con ERS es más lenta e incompleta. Vachon y Nairm (37) ponen de manifiesto que se debe a una interacción del grupo ácido carboxílico del principio activo y el polímero.

3.4. Estudio cinético.

Tras el ajuste de los datos de disolución obtenidos con los tres tipos de micropartículas a las ecuaciones cinéticas anteriormente indicadas, se obtienen los parámetros cinéticos recogidos en la tabla 11.

Comparando el ajuste de los datos a las ecuaciones cinéticas de orden cero, primer orden, Higuchi, Peppas-Ritger y mixta, el valor de AIC indica que, en términos generales, la cinética a la que mejor se ajustan los datos es a la descrita por Peppas-Ritger. Se puede comprobar que en todos los casos el valor del exponente de liberación (n) es inferior a 0.5, por lo que nos encontramos ante una difusión fickiana del antibiótico a través de la matriz creada por el polímero. Estos resultados difieren de los aportados por Joshi et al. (35) realizaron un estudio de microesferas de ERS 100, ERL 100 y una combinación de ambos y determinan que el valor de n en todas las formulaciones se encuentra comprendido entre 0.5 y 1, indicativo de un mecanismo de liberación no fickiano.

La ecuación correspondiente a la cinética mixta, también explica bien el proceso de disolución en los tres casos. Los valores de k_h frente a los de k_0 corroboran el claro

predominio de la difusión en la liberación de principio activo desde las micropartículas estudiadas.

Oth et al. (34) también realiza un estudio con ERS y ERL en el que constatan que existe una clara relación entre la proporción ERS:ERL y la constante de Higuchi (k_h), siendo la cantidad de ERL en la muestra directamente proporcional a la k_h . Estos datos concuerdan con los obtenidos en el presente trabajo, ya que obtenemos una k_h en la formulación 8sp (contiene ERL) de 11.83, y de 9.28 cuando se utiliza ERL.

Estas deducciones contrastan con las de otros autores como Haznedar et al. (36), que en su estudio de microesferas de Eudragit[®] concluyen que las formulaciones con ERS solo, presentan unos coeficientes de correlación mayores para la cinética de primer orden y las formulaciones con ERL se ajustan peor a dicha ecuación. Cuando se combinan ambos polímeros, los coeficientes de correlación muestran que los datos se ajustan a una cinética de orden 0 hasta las 5 horas.

Tabla 11: Resumen parámetros cinéticos de la liberación de las micropartículas seleccionadas.

Muestra	Orden 0 $C (%) = k_0 \times t_0$				Orden 1 $LnC (%) = LnC_0 \times t$				Higuchi $C (%) = k_h \times t^{1/2}$				Peppas-Ritger $Log C (%) = Log K_p + n \times t$				Mixta $C (%) = k_0 \times t + K_H \times t^{1/2}$					
	k_0	A	r^2	AIC	$Ln C_0$	a	r^2	AIC	K_h	a	r^2	AIC	n	$Log K_p$	r^2	AIC	k_0	K_H	$K_H - k_0$	a	r2	AIC
48h																						
7sp	1.17	19.89	0.873	70.74	-0.02	4.40	0.943	7.16	9.28	7.55	0.983	50.68	0.38	1.20	0.997	-47.99	-0.63	13.88	13.25	2.05	0.997	32.74
8sp	1.48	29.68	0.852	82.62	-0.04	4.31	0.978	8.1	11.83	13.81	0.975	63.37	0.35	1.38	0.995	-70.44	-1.2	19.26	18.06	4.92	0.998	34.55
9sp	0.88	31.16	0.735	66.99	-0.02	4.23	0.821	15.63	7.31	20.94	0.912	57.99	0.26	1.41	0.988	-17.7	-1.27	16.49	15.22	9.95	0.998	17.85

Eficiencia de disolución (ED%).

En la tabla 12 se recogen las ED % de las tres formulaciones ensayadas.

Se comprueba que la formulación que disuelve con mayor eficacia, tanto a las 24 h como a las 48 h es la 8sp.

Tabla 12: Eficacia de disolución de las micropartículas 7sp, 8sp y 9sp finales.

	Eficiencia de disolución (%)		
	7sp	8sp	9sp
24h	29.07	39.44	25.1
48 h	41.35	53.43	37.79

A la vista de los resultados obtenidos, se seleccionan las micropartículas de formulación 8sp, al presentar un perfil de liberación más adecuado a nuestro objetivo.

4. Estudios de absorción “in vivo” y permeabilidad “ex vivo”

4.1. Absorción “in vivo”

Se estudia la velocidad de absorción comparando las concentraciones plasmáticas tras la administración oral del fármaco libre y encapsulado en las micropartículas 8sp.

En la figura 72 se muestran las curvas de los niveles plasmáticos obtenidos hasta 24 h después de la administración de una dosis de 212 mg de Cipro libre y de 500 mg de micropartículas que contienen igual dosis de antibiótico.

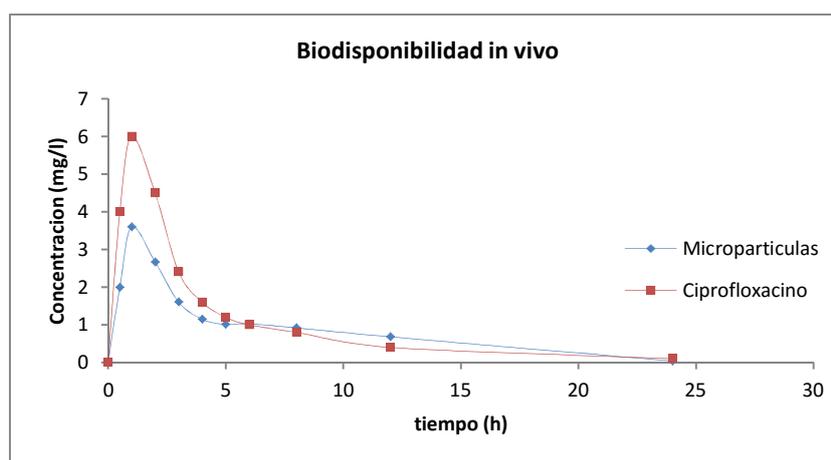


Figure 72: Concentración plasmática de Ciprofloxacino frente al tiempo tras la administración de una dosis de 212 mg de Cipro libre y de 500 mg de micropartículas.

Tras la administración oral del principio activo libre, se observa un aumento relativamente rápido de la concentración plasmática con un valor máximo de 6.1 mg/L en aproximadamente 1 hora.

Por otro lado, al administrar de forma oral las micropartículas, el valor máximo de la curva se produce también tras 1 h de su administración pero se reduce a 3.6 mg/L este valor máximo. Además el área bajo la curva también se reduce de 26.4 mg h/l en el caso de la sustancia activa libre y a 20.52 mg h/l en el caso de las micropartículas. Estos resultados pueden ser atribuidos a una rápida absorción del Cipro libre que produce altos niveles plasmáticos de Cipro en solo una hora. En el caso de las micropartículas, se produce una liberación de la sustancia activa de forma rápida puesto que no se encuentran en una forma recubierta, por lo que se produce una absorción también rápida y una alta biodisponibilidad sistémica, aunque menor que en el caso de Cipro sin microencapsular. Estos perfiles de liberación concuerdan con los perfiles obtenidos por Ubrich et al. (38) en un estudio de nanopartículas de ERS y ERL administradas a conejos.

4.2. Permeabilidad “ex vivo”

En la figura 73 podemos observar la curva obtenida tras un estudio de permeabilidad “ex vivo”.

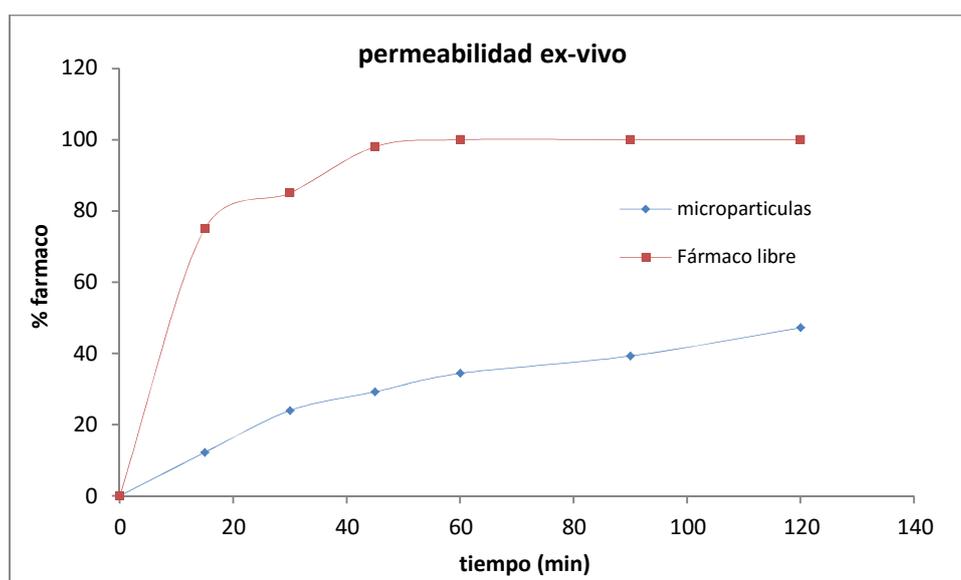


Figure 73: Permeabilidad acumulativa de Cipro libre y Cipro cargado en las micropartículas a través del intestino de rata en medio de solución Ringer a 37° C.

En el caso del fármaco libre se detecta el 100 % al cabo de una hora, en el medio receptor. Sin embargo en el caso de las micropartículas, se detecta sólo un 47.2 % en el medio receptor después de 2 horas. Tras un análisis del homogeneizado al final del experimento, se detectó que más del 40% del Cipro estaba todavía presente dentro del saco intestinal, lo cual significa que tras su paso por el intestino, se transferirá al colon donde realizará su efecto terapéutico.

5. Estudio de los comprimidos

5.1. Selección de los comprimidos constituyentes del núcleo.

Recordemos que estos comprimidos están compuestos por las micropartículas, Na-CMC y estearato magnésico, utilizando distintas presiones (1, 2 y 3 tons) durante un minuto.

Los comprimidos obtenidos son pequeños, de un diámetro medio de 7mm, cilíndricos con caras planas, con buenas características físicas, que no presentan problemas en la compresión: no tienen tendencia a adherirse a los punzones ni a la pared de la cámara de compresión (picking), ni tienden a la laminación o decapado (capping) y, fundamentalmente, con características adecuadas para poderlos recubrir por compresión.

Los comprimidos preparados se han sometido al ensayo de disolución utilizando 1000 ml de solución reguladora a pH 7.4, ya que se pretende que el fármaco se libere a ese pH.

Los ensayos de disolución se han realizado durante 24 h, mostrando en la figura 74 los perfiles de disolución de estos núcleos y de las micropartículas libres, es decir, sin comprimir.

Se puede comprobar que en los comprimidos elaborados a las tres presiones utilizadas, la liberación del Cipro se realiza de manera más lenta que en las micropartículas libres. Aunque no hay diferencia significativa en la cantidad de fármaco liberado al cabo de 24 h, los comprimidos preparados con 3 tons, en las primeras 12 h ceden al fármaco más lentamente. Ya que lo deseable es que una vez alcanzado el colon, el comprimido comience a liberar rápidamente la sustancia activa, se seleccionan para recubrir los núcleos elaborados con 1 ton.

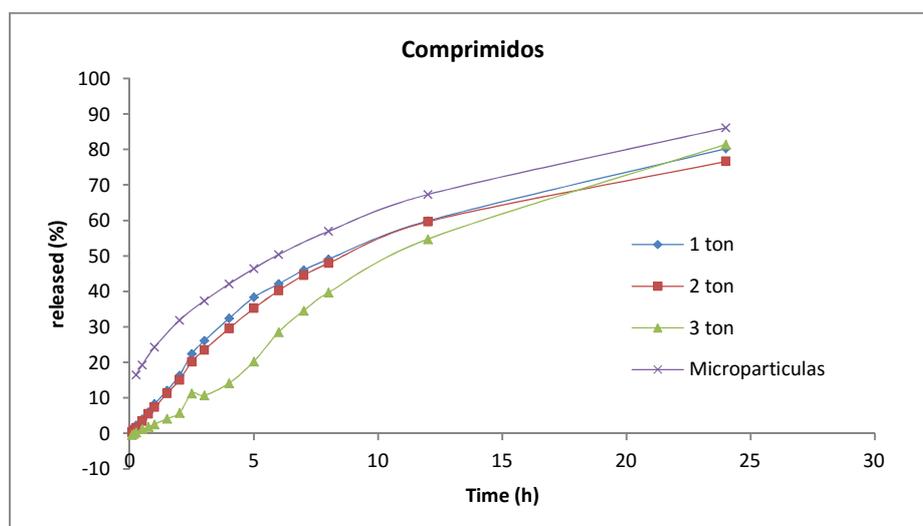


Figura 74: Perfil de liberación de los comprimidos constituyentes del núcleo a diferentes presiones y de las micropartículas libres.

En cuanto al estudio cinético de la liberación de estos núcleos, tras el ajuste de los datos a las ecuaciones cinéticas anteriormente indicadas, se obtienen los parámetros cinéticos recogidos en la tabla 13.

El estudio comparativo de estos resultados muestra que el menor valor del AIC en términos generales, se obtiene para la ecuación cinética descrita por Peppas-Ritger. En todos los casos, el valor del exponente de liberación “n” es cercano a 1, indicativo de que la cinética está cercana al orden cero (caso II). Los valores de AIC correspondientes al ajuste a la cinética de orden 0, son muy bajos, cercanos a los obtenidos en el ajuste a Peppas-Ritger, corroborando lo anteriormente dicho.

A la vista de estos resultados y no habiendo diferencias entre los perfiles de disolución de los tres tipos de comprimidos, se seleccionan para recubrir los núcleos elaborados con 1 ton.

Tabla 13: Parámetros cinéticos de la liberación de Cipro de los comprimidos del núcleo.

Form.	Orden 0 $C = k_0 \times t_0$ (%)				Orden 1 $LnC = LnC_0 \times t$ (%)				Higuchi $C(\%) = k_0 \times t^{1/2}$				Peppas-Ritger $Log C(\%) = Log K_p + n \times t$				Mixta $C(\%) = k_0 \times t + K_H \times t^{1/2}$				
	k0	a	r ²	AIC	Ln C0	a	r ²	AIC	k0	a	r ²	AIC	n	Log K _p	r ²	AIC	k ₀	K _H	a	r ²	AIC
1 ton	3.611	9.802	0.858	-27.746	0.069	4.51	0.981	-29.323	19.007	-7.499	0.985	-25.164	0.878	0.902	0.984	-33.292	-0.726	22.398	-10.213	0.988	-25.139
2 ton	3.52	8.762	0.858		-0.064	4.552	0.971	-30.036	18.509	-8.068	0.983	-25.95	1.018	0.785	0.964	-33.928	-0.667	21.626	-10.562	0.986	-25.267
3 ton	3.738	1.192	0.957	-26.551	-0.071	4.664	0.992	-29.898	18.257	-14.191	0.946	-25.519	1.331	0.352	0.981	-34.971	2.139	8.263	-6.191	0.975	-26.761

5.2. Selección de los comprimidos recubiertos.

Recordemos que la cubierta utilizada para conseguir que los comprimidos definitivos resistan el paso por el estómago e intestino y las micropartículas del núcleo alcancen el colon es de HPMC:Pectina. El recubrimiento se realiza por compresión, utilizando tres presiones (6, 8 y 10 tons), durante 3 min.

Los comprimidos recubiertos son cilíndricos, con caras planas y buenas características físico-mecánicas, no presentando problemas en la compresión: no tienen tendencia a adherirse a los punzones ni a la pared de la cámara de compresión (picking) ni tienden a laminación o decapadao (capping).

Los ensayos de disolución en este caso, se realizan a dos pH distintos ya que lo que se intenta simular el paso de los comprimidos por el tracto gastrointestinal donde permanecerá 2 horas a pH 1.2 (estómago) y 6 horas en el intestino hasta llegar a un pH de 7.4 (un total de 8 horas). Estos ensayos van a permitir seleccionar la presión de compresión utilizada en el recubrimiento.

Los perfiles de liberación se muestran en la figura 75, donde vemos que los resultados de los tres tipos de comprimidos son coincidentes y las curvas se superponen tanto que se podría pensar que se trata de un ensayo único.

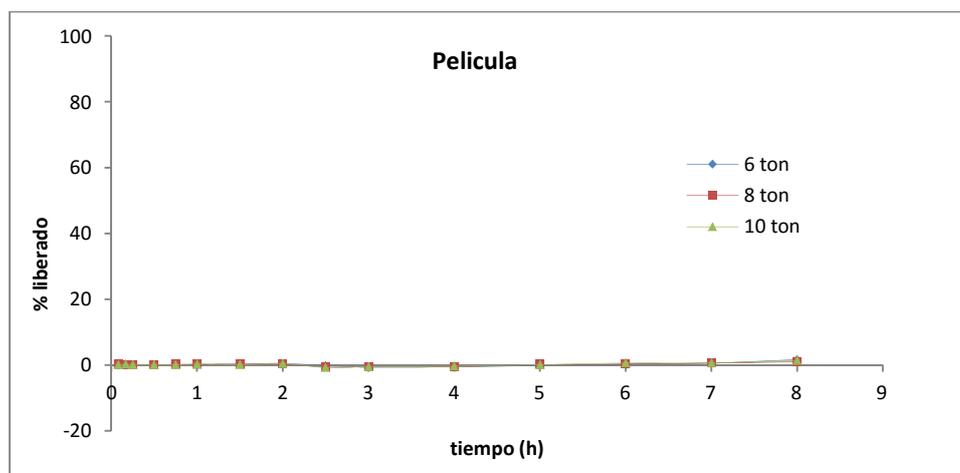


Figura 75: Perfiles de liberación de los comprimidos recubiertos mediante compresión a 6, 8 y 10 tons.

Durante el tiempo que el comprimido permanece a pH 1.2 (dos primeras horas) no se produce apenas liberación de Cipro en ninguno de los tres casos. Al realizar el cambio de pH vemos que, a pesar de que se ve cierta liberación aparente, estos valores no llegan al 1.5 ± 0.33 % a las 8 horas en ningún caso, pudiendo afirmar que la película de HPMC:Pectina es adecuada, sea cual sea la presión utilizada en el recubrimiento tal y como reseñaba Ugurlu et al. en su estudio (39).

Basándonos en estos resultados, se escogen los comprimidos preparados con la presión más baja, 6 tons, ya que el objetivo es que en el momento que alcancen el colon,

las micropartículas queden libres lo más rápidamente posible y comiencen a liberar al antibiótico.

5.3. Estudios finales.

Los estudios finales se realizaron con comprimidos recubiertos seleccionados, cuya composición es:

- Núcleo: comprimidos de 7 mm de diámetro elaborados a base de micropartículas de formulación 8sp, a una presión de 1 Ton durante un minuto.
- Recubrimiento: cubierta de HPMC:Pectina (20:80) utilizando 6 ton de presión durante 3 minutos.

Se realiza un ensayo de disolución utilizando sucesivamente tres medios de disolución. Se simula el paso del comprimido por el tracto gastrointestinal, comenzando por un medio de disolución a pH de 1.2 durante dos horas, seguido de otro a un pH de 7.4 durante seis horas, simulando su paso por el intestino. Pasado ese tiempo se le adiciona Pectinex[®] Ultra SP-L, para simular la llegada del comprimido al colon, donde se encuentran las enzimas pectinasas. Los perfiles de disolución obtenidos se muestran en la figura 76. A título comparativo, se dibuja también el perfil de liberación de las micropartículas desnudas en las condiciones del intestino.

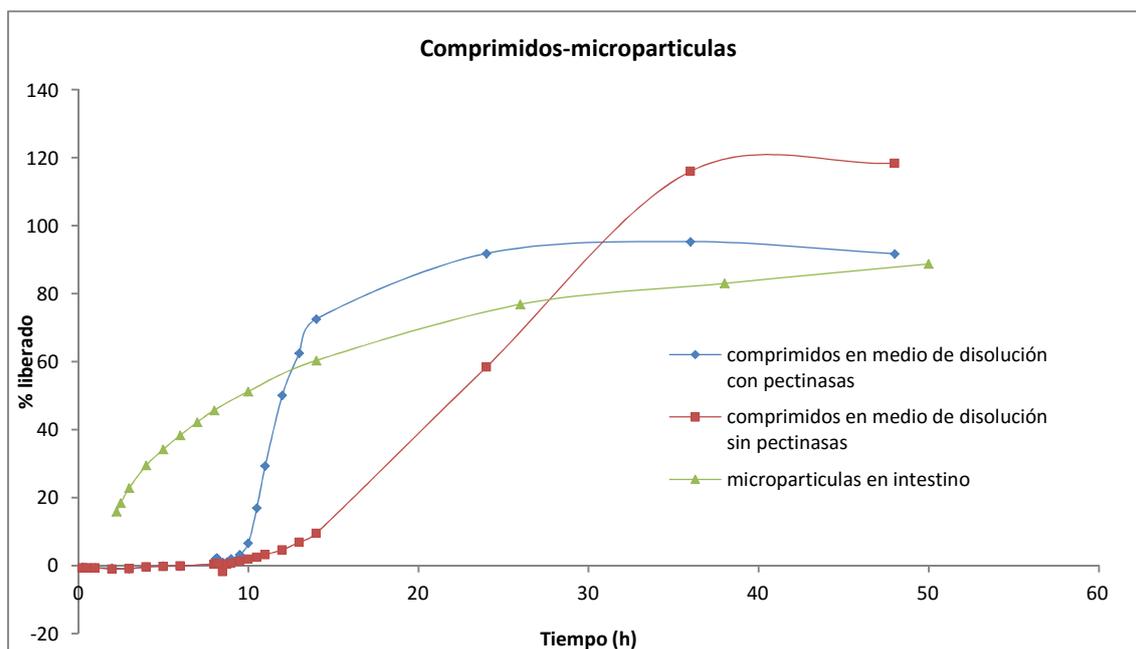


Figura 76: Perfil de liberación de los comprimidos en presencia y en ausencia de enzimas Pectinasas.

El estudio de los perfiles de disolución de los comprimidos permite comprobar que los comprimidos en un medio a pH ácido (dos primeras horas del ensayo) no liberan nada de Cipro al medio de disolución; cuando se encuentran en el medio de disolución a pH 7.4 continúan sin liberar nada, lo que demuestra que la cubierta que llevan las micropartículas del núcleo resulta eficaz para protegerlas del contenido ácido del estómago y del intestino delgado.

A las ocho horas de ensayo, al añadir las pectinasas al medio de disolución (línea azul), los comprimidos comienzan inmediatamente a ceder antibiótico, consiguiendo liberar a las 12 h un 50 % de su contenido y a las 14 h un 72 %. Esta rápida liberación podría deberse a la cantidad de fármaco libre adherido a la superficie de las micropartículas cuando se liberan al medio, como ya se vio al estudiar las micropartículas desnudas (figura 71).

A partir de ese momento la liberación se ralentiza, haciéndose más paulatina, de manera que a las 24 h se alcanza el máximo de Cipro liberado, un 91 % del contenido.

Estos resultados demuestran que la cubierta proporcionada a los comprimidos ha actuado como sistema de recubrimiento combinado, pH dependiente-activados por la microbiota colónica, ya que únicamente al alcanzar la zona donde se encuentran las enzimas, se rompe la cubierta y es cuando comienza la liberación. Estas deducciones concuerdan con las de Orlu et al. (40) sobre comprimidos a base de microesponjas de flurbiprofeno recubiertos por una cubierta de HPMC:Pectina y con las de Turkoglu y Ugurlu (41) que también utilizan dicho recubrimiento para comprimidos de ácido 5 aminosalicílico.

Se puede comprobar por el perfil de liberación de los comprimidos en ausencia de pectinasas (línea roja), que la cubierta permanece prácticamente intacta durante las 10 primeras horas, ya que solo se detecta en el medio de disolución alrededor del 1% de antibiótico que contienen las microcápsulas. A las 16 horas el porcentaje de liberación es de un 18 % y a partir de entonces se puede deducir que la cubierta finalmente acaba por destruirse y es cuando se advierte un aumento de la velocidad de liberación.

El perfil de liberación de las micropartículas desnudas (línea verde) muestra que la liberación comienza en las condiciones del intestino, mucho antes que cuando se comprimen y los comprimidos se recubren. Parte del antibiótico hasta un 50 % se cedería antes de que lleguen al colon.

De estos últimos resultados, podemos deducir que con los comprimidos diseñados y elaborados en este trabajo, se logra una liberación colónica de las micropartículas seleccionadas, llegando al colon prácticamente inalteradas y, una vez allí, enseguida comienzan a liberar gradualmente al medio el Cipro que contienen durante un tiempo prolongado para que pueda ejercer su acción terapéutica.

CONCLUSIONES

Para conseguir el objetivo que se planteó al inicio del presente trabajo, conseguir una forma farmacéutica que permita la administración oral de ciprofloxacino, de manera que éste llegue lo más inalterado al colon y se vaya liberando localmente de forma gradual y durante un periodo de tiempo prolongado, se elaboran micropartículas con distintos polímeros y con distintos métodos de síntesis; con ellas se diseñan y elaboran comprimidos que posteriormente se protegen con una cubierta a base de HPMC y pectina.

Tras el estudio de estas micropartículas y de la forma farmacéutica diseñada, se obtuvieron las siguientes conclusiones.

1. Sobre las micropartículas de quitosano

En las micropartículas a base de quitosano, preparadas por el método de secado por nebulización, se comprueba que al aumentar la concentración de ciprofloxacino y el volumen de secado de las muestras, aumenta la carga, el tamaño de partícula y el rendimiento del proceso. Sin embargo, al aumentar la concentración de quitosano se consigue una disminución de la carga y del tamaño de partícula pero el rendimiento es superior.

El estudio térmico indica que se produce una interacción entre los componentes de las micropartículas, uniéndose entre sí mediante enlaces no convencionales más débiles que los presentes en la estructura cristalina del principio activo.

Los ensayos de disolución de estas micropartículas muestran una liberación que se ajusta poco al objetivo planteado en este trabajo, incluso cuando el quitosano se entrecruza con TPP.

2. Sobre las micropartículas de Eudragit®

Se sintetizan las micropartículas con varios tipos de Eudragit® y tres proporciones fármaco: polímero (2:1, 1:1 y 1:2), constatando que en los dos procedimientos utilizados para elaborarlas, secado por nebulización y evaporación del disolvente, se consiguen micropartículas con mayor carga cuando se aumenta la proporción de fármaco en la síntesis.

También se comprueba que el método de secado por nebulización proporciona micropartículas de menor tamaño que el de secado por evaporación.

Un menor tamaño de partícula y un mejor control de la liberación del antibiótico a las 24 horas del ensayo de disolución, determina la selección de las que tienen una proporción fármaco:polímero 1:2, y que se han elaborado desecando por nebulización.

3. Sobre las micropartículas finales

Para la proporción seleccionada, se obtienen micropartículas esféricas, con superficies lisas y con una distribución granulométrica polidispersa, aunque el tamaño es similar con los tres tipos de polímeros utilizados. La mezcla de ERS y ERL a partes

iguales, es con la que mayor carga se consigue, pero el rendimiento del proceso es superior cuando se utiliza solo ERL.

En estas micropartículas, al igual que en las de quitosano, también se producen interacciones entre sus componentes, estableciéndose uniones más débiles entre ellos que los que hay en la estructura cristalina del fármaco.

Con las tres formulaciones estudiadas se consigue una liberación prolongada del antibiótico, siendo el mecanismo responsable, la difusión.

Los perfiles de cesión son diferentes en función de polímero utilizado. Cuando la formulación contiene ERS, solo o mezclado con ERL, se produce un secuestro del principio activo debido a la interacción entre el grupo carboxílico del ciprofloxacino y el polímero, por lo que a las 48h sólo se libera un 70 % del antibiótico que contienen. Se alcanza una liberación más rápida y prolongada en el tiempo al utilizar ERL(formulación 8sp); con él se consigue un 83% de fármaco liberado a las 24 h y de 96% a las 48h de ensayo.

4. Sobre el estudio “in vivo”y “ex vivo” de las micropartículas de formulación 8sp

Tras la administración oral a conejos de una dosis igual de fármaco en forma libre y encapsulada, se comprueba que en estas últimas, el antibiótico no queda tan disponible para su absorción como en el caso del fármaco libre, ya que el pico de concentración máxima es menor.

El estudio de permeabilidad ex-vivo en las condiciones del intestino delgado, muestra que a las dos horas queda en el saco intestinal sólo un 40% del antibiótico encapsulado. Con ello se evidencia la necesidad de proteger las micropartículas no sólo de las condiciones adversas del estómago, sino también del intestino delgado.

5. Sobre el estudio de los comprimidos a base de micropartículas de fórmula 8sp

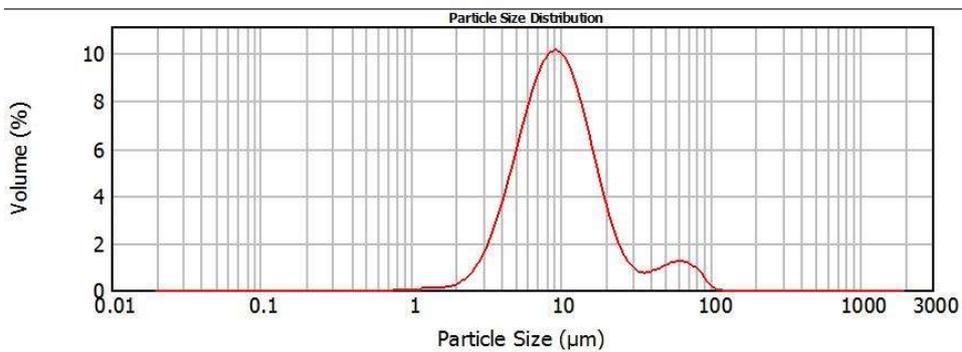
Con las micropartículas seleccionadas se preparan los comprimidos que posteriormente se recubrirán, utilizando varias presiones al comprimir. Se seleccionan los preparados a 1 ton, cuyo ensayo de disolución muestra que la cinética a la que mejor se ajustan los datos es la descrita por Peppas-Ritger, encontrando valores de n cercanos a 1, indicativos de una liberación de orden 0 (caso II).

Tras el recubrimiento del núcleo por compresión, con una mezcla de HPMC:pectina 20:80, se demuestra que el recubrimiento escogido es eficaz para proteger al núcleo de las condiciones degradativas de las porciones anteriores del tracto gastrointestinal y que se desintegra rápidamente al alcanzar el colon, donde se encuentran las enzimas pectinasas.

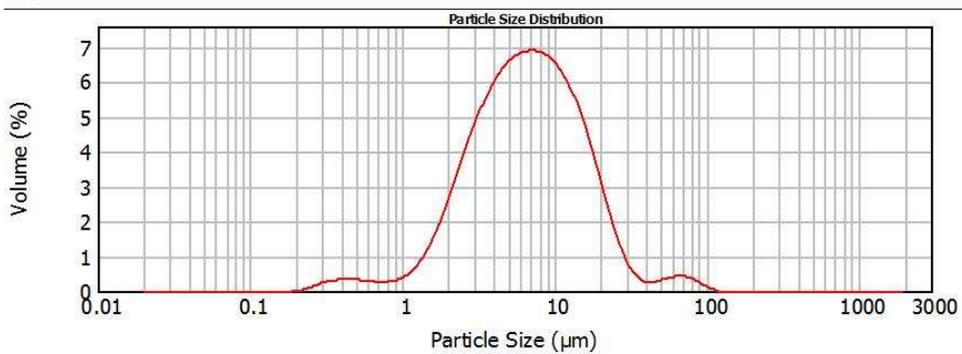
ANEXOS

ANEXO I: Curvas de distribución de los tamaños de partículas de las muestras de quitosano.

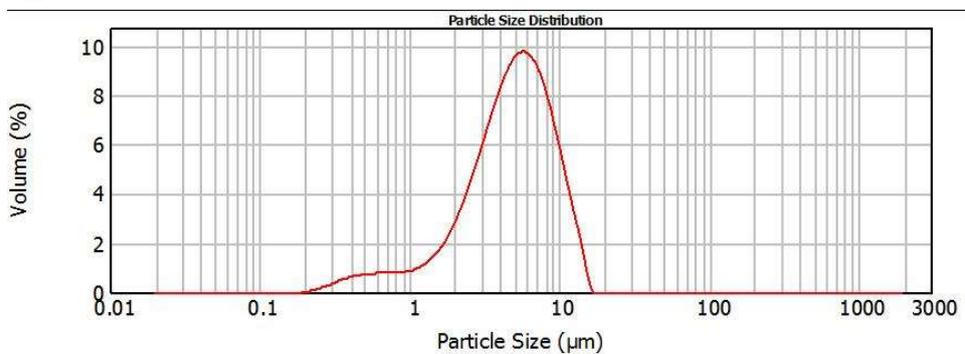
1



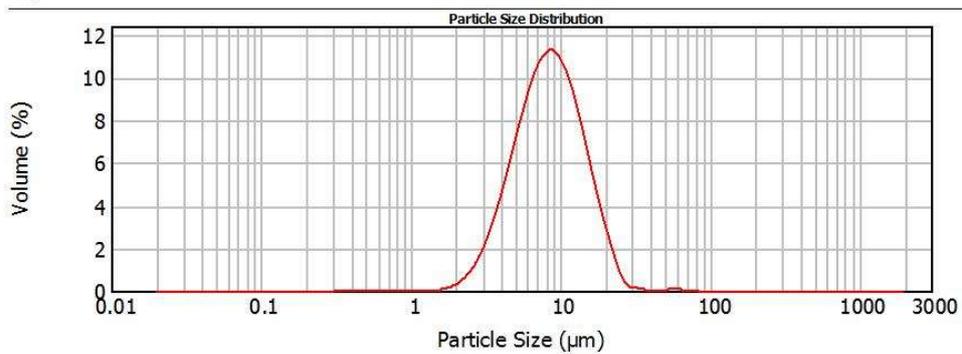
2



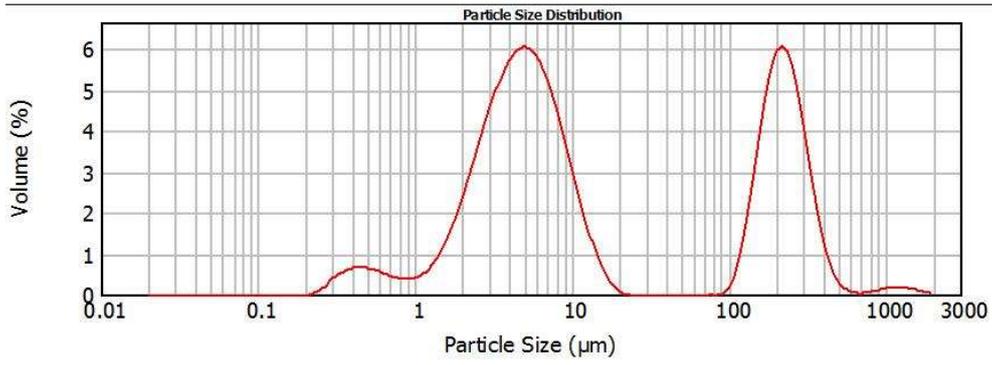
3



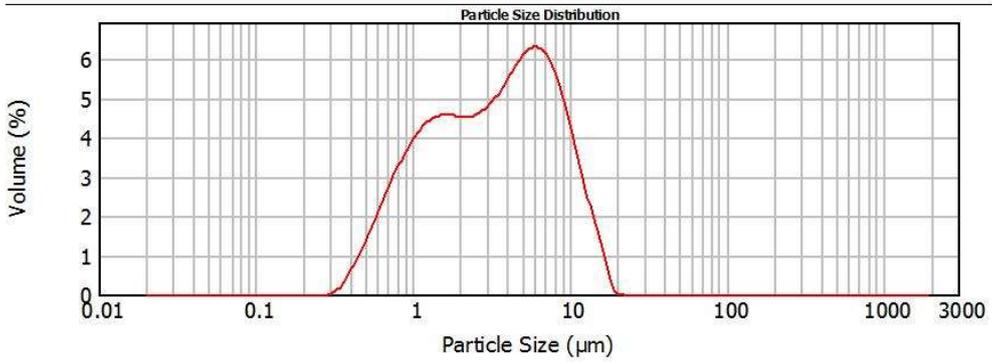
4



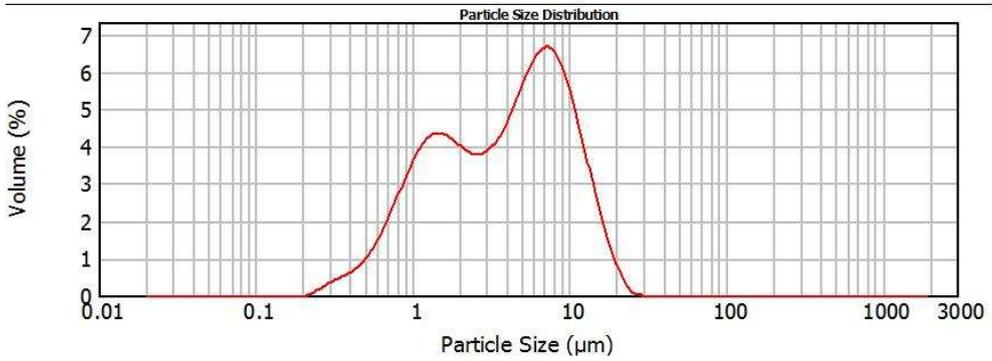
5



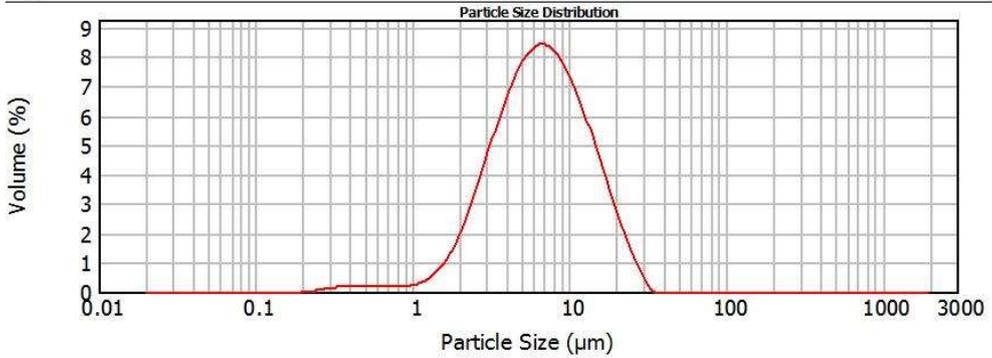
6



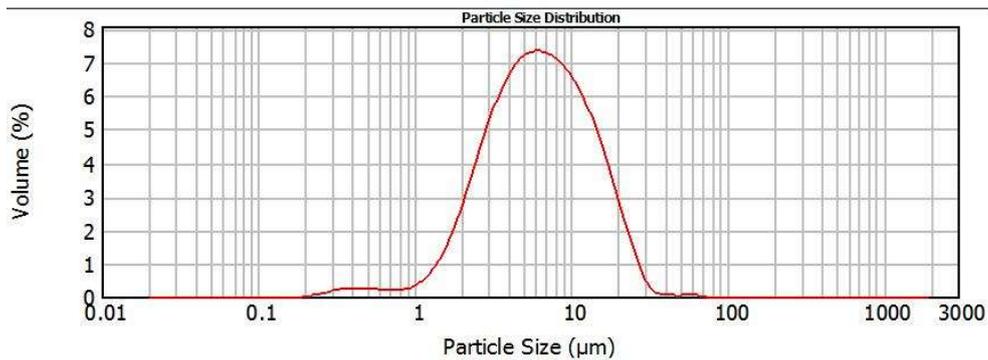
7



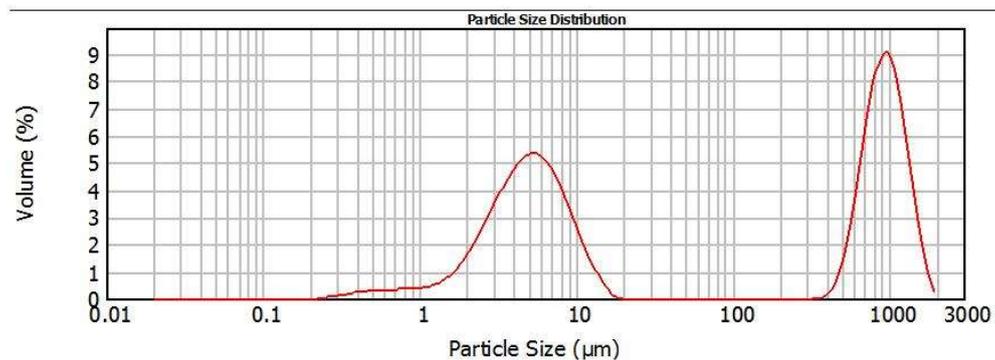
8



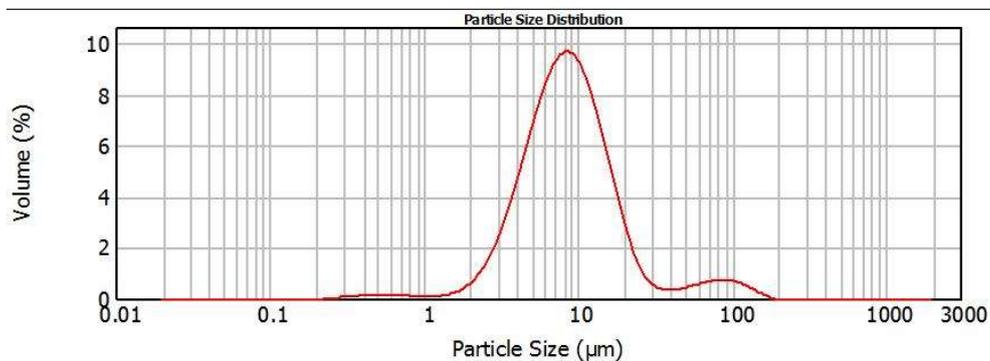
9



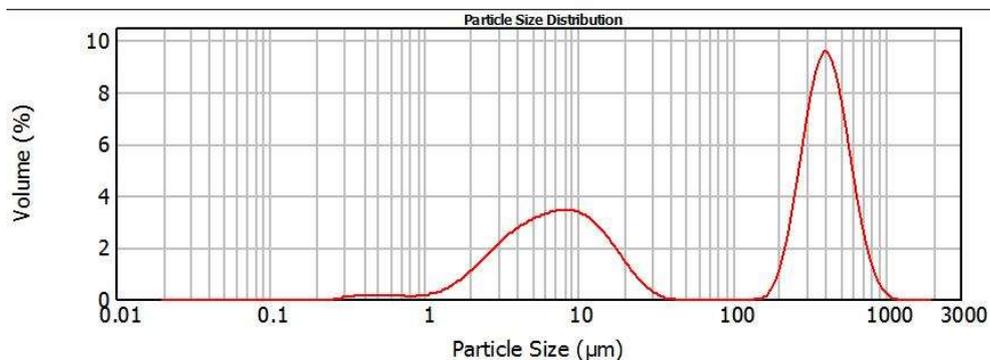
10



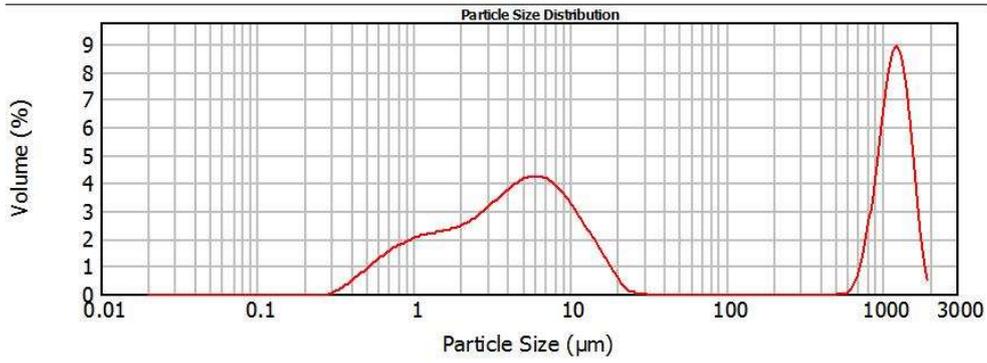
11



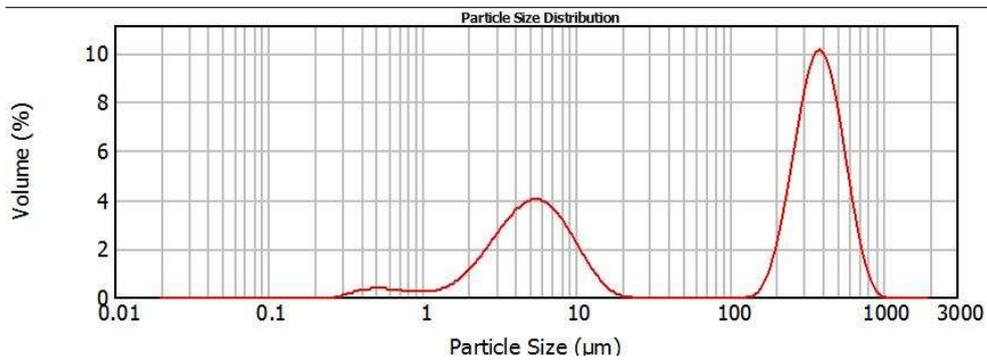
12



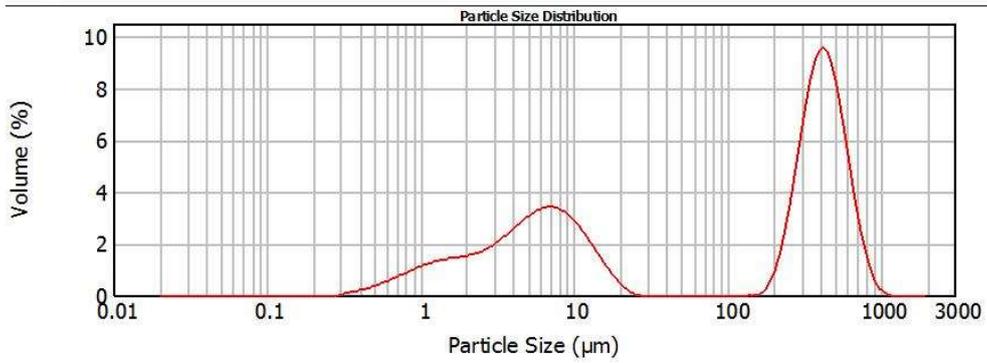
13



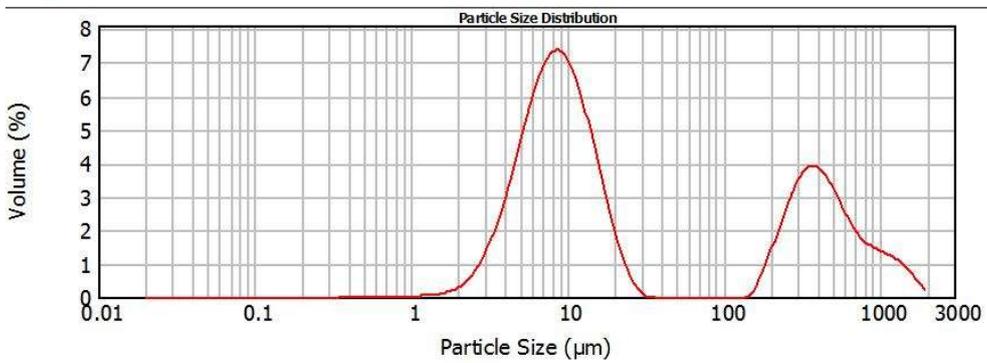
14



15

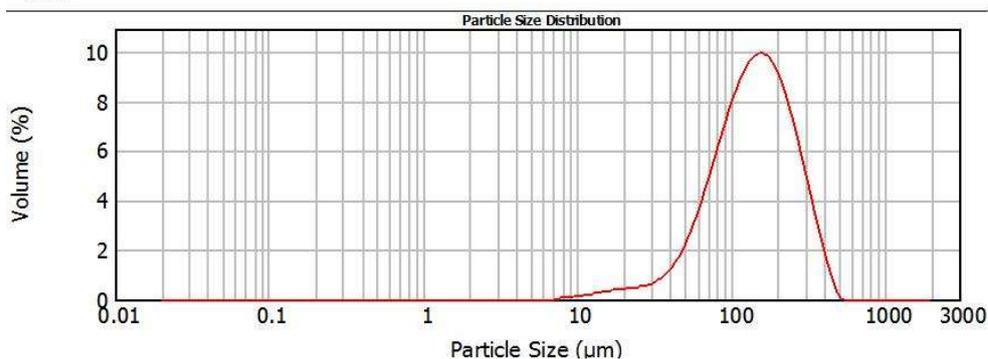


16

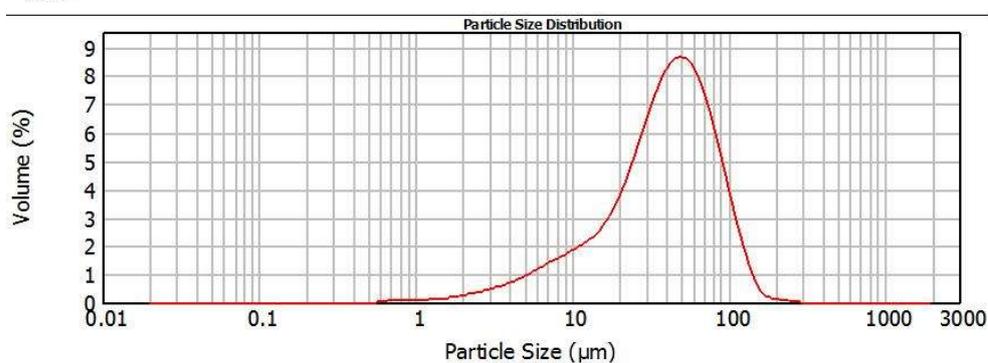


ANEXO II: Curvas de distribución de los tamaños de partículas de muestras de Eudragits®.

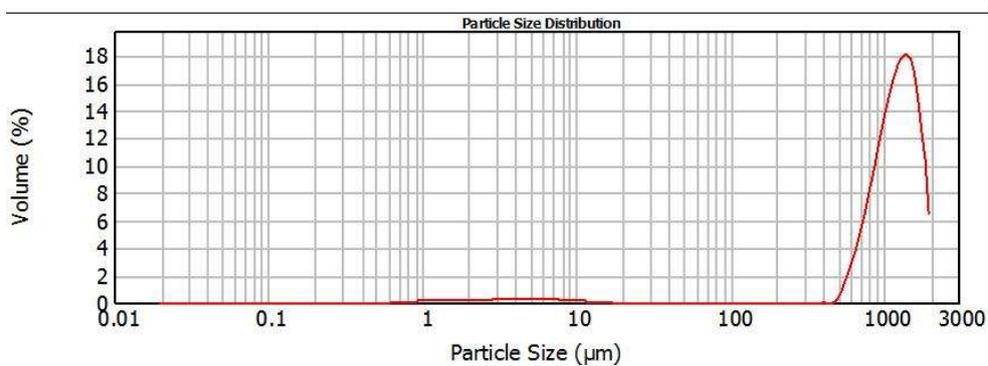
1ev



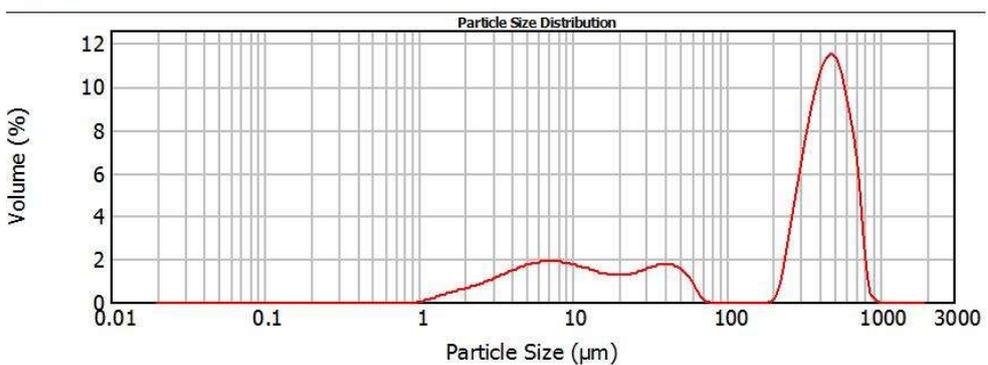
2ev



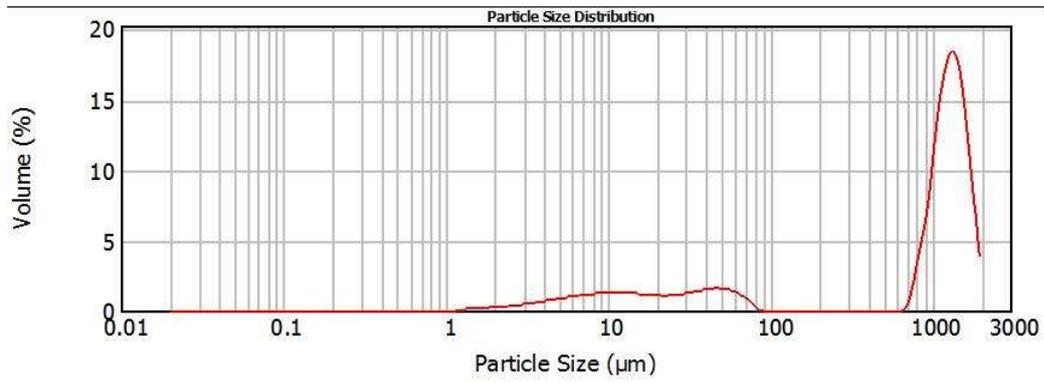
3ev



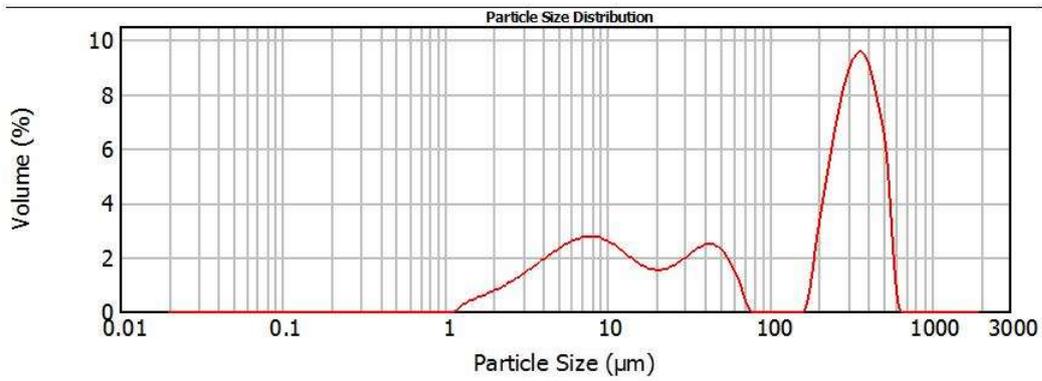
4ev



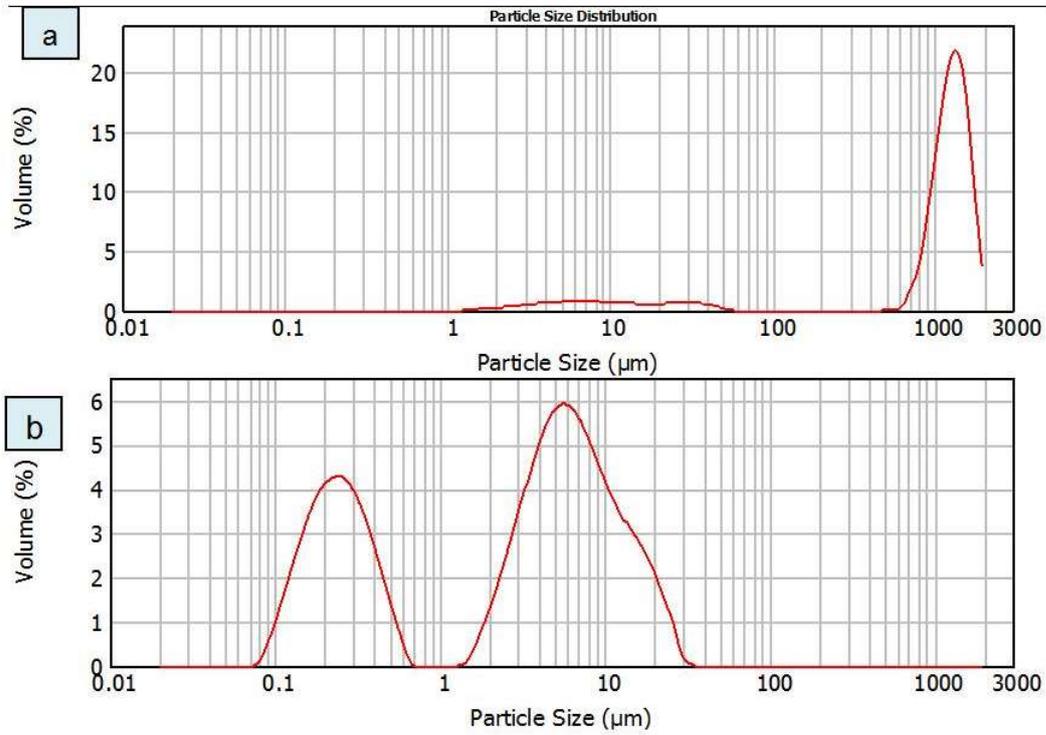
5ev



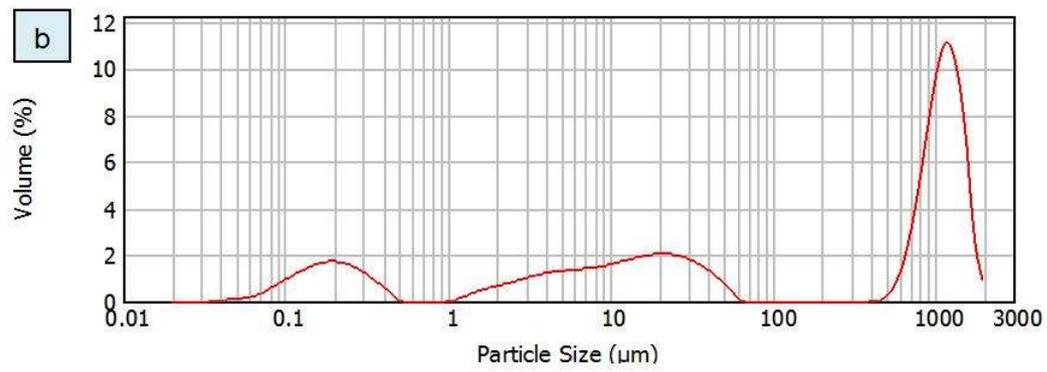
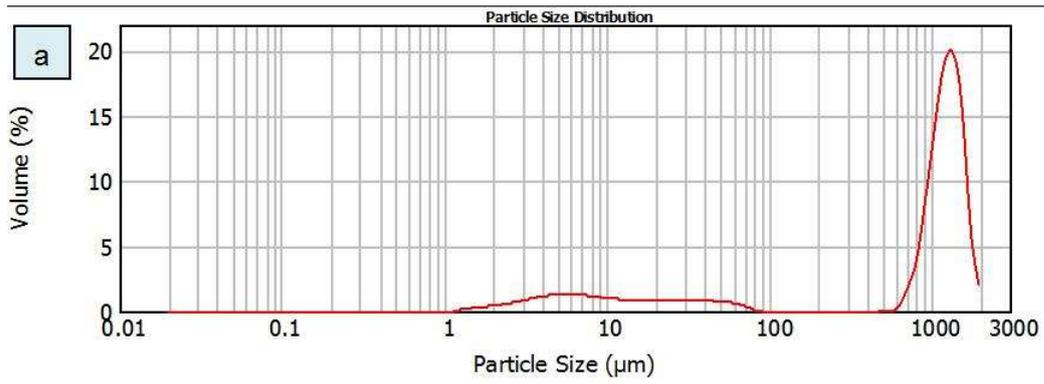
6ev



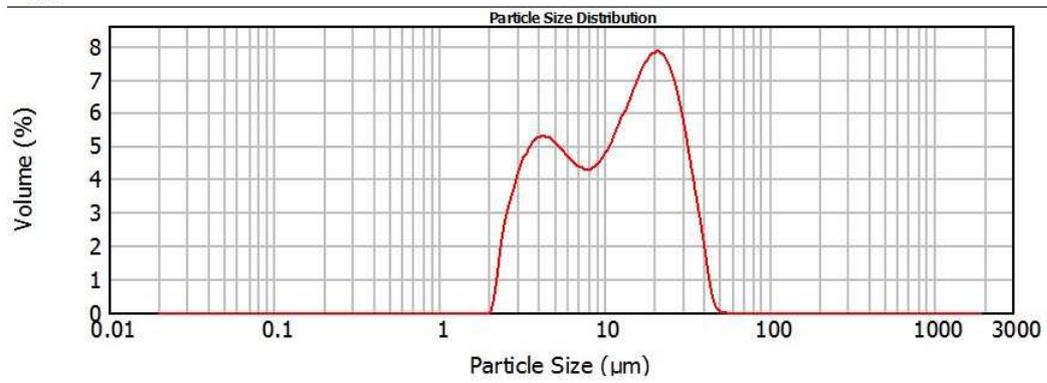
7ev



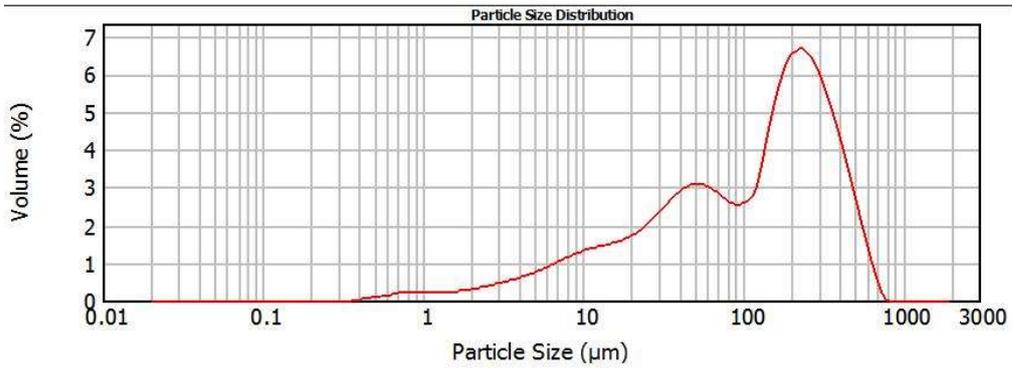
8ev



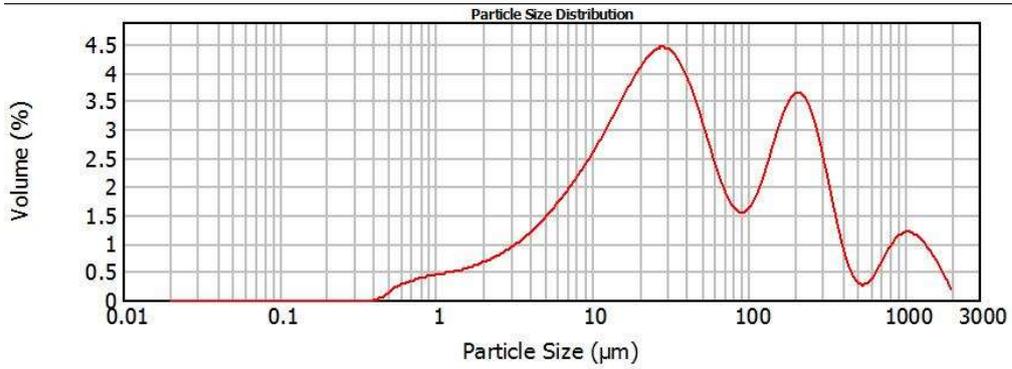
9ev



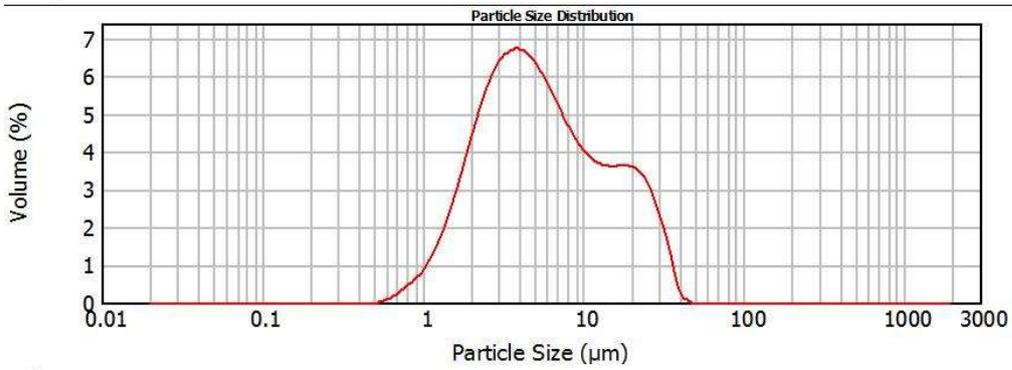
1sp



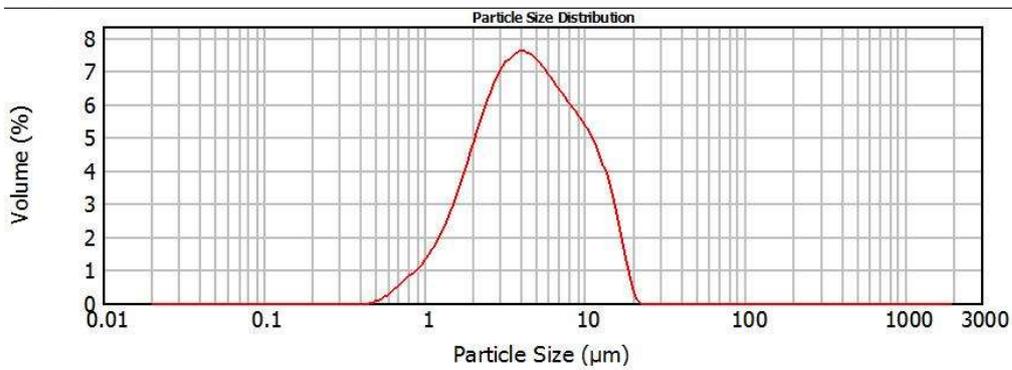
2sp



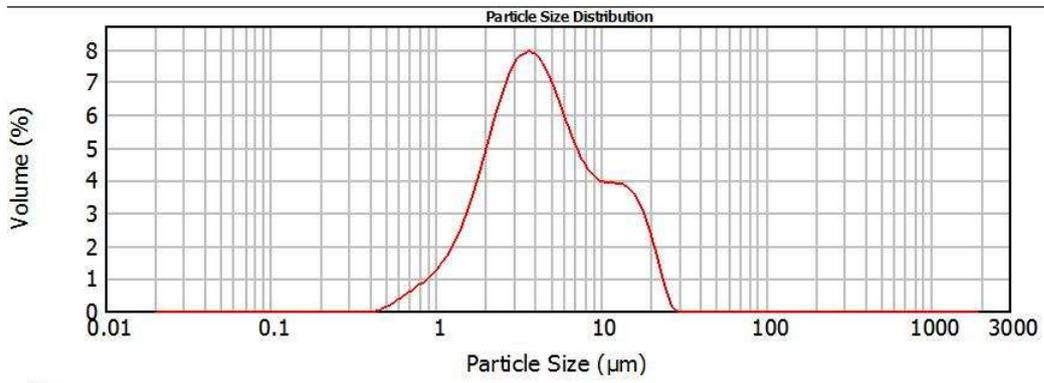
3sp



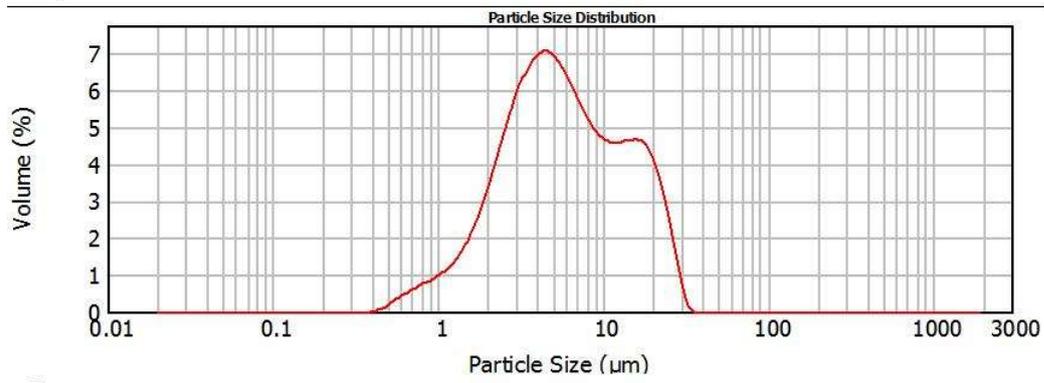
4sp



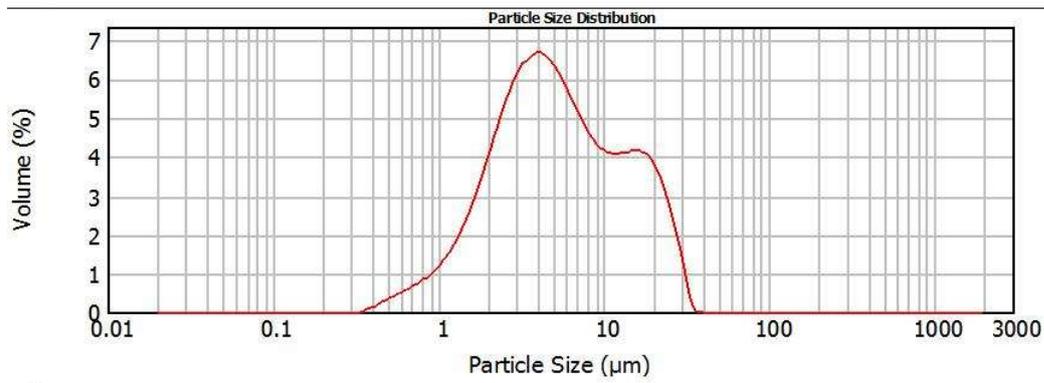
5sp



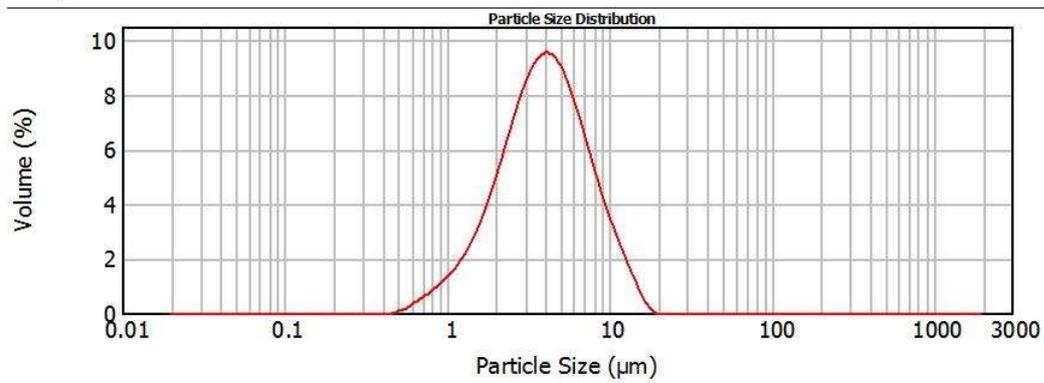
6sp



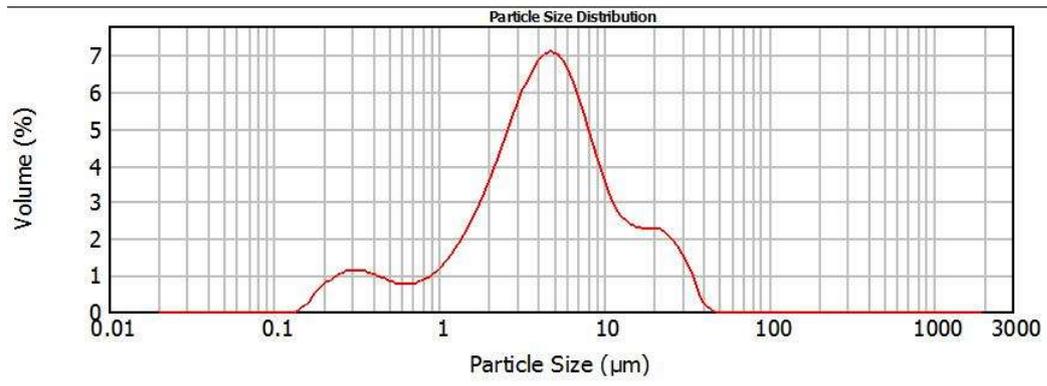
7sp



8sp

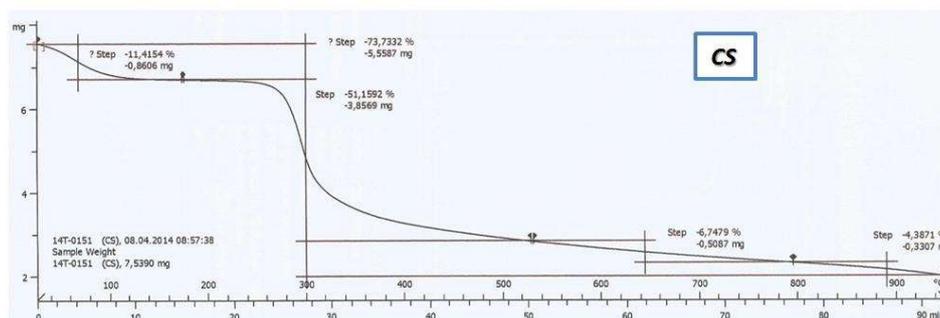
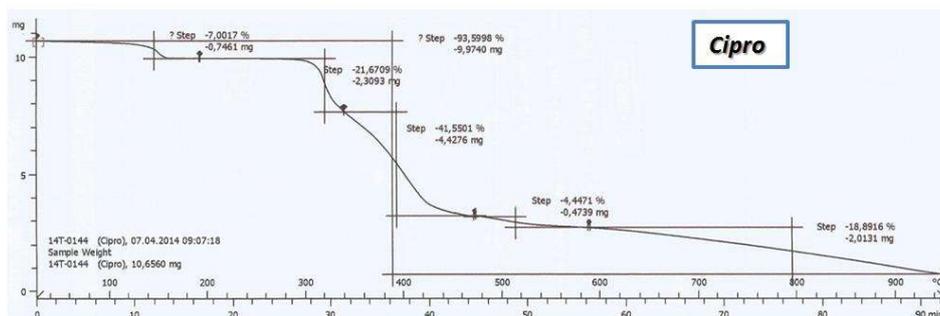


9sp

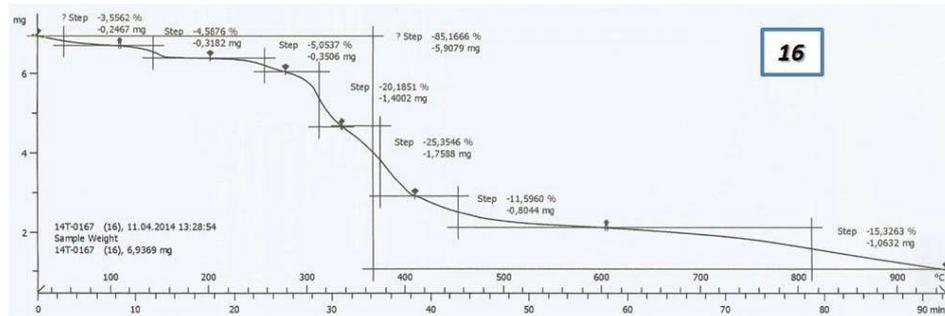
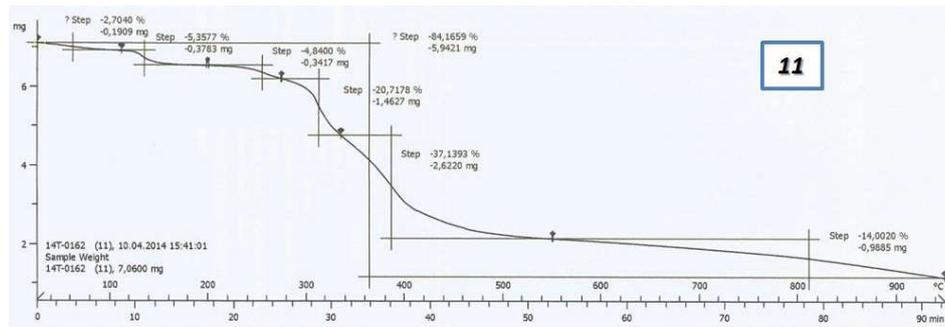
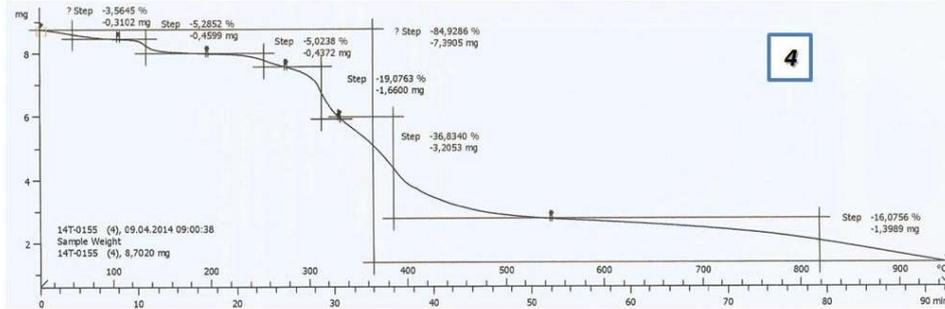
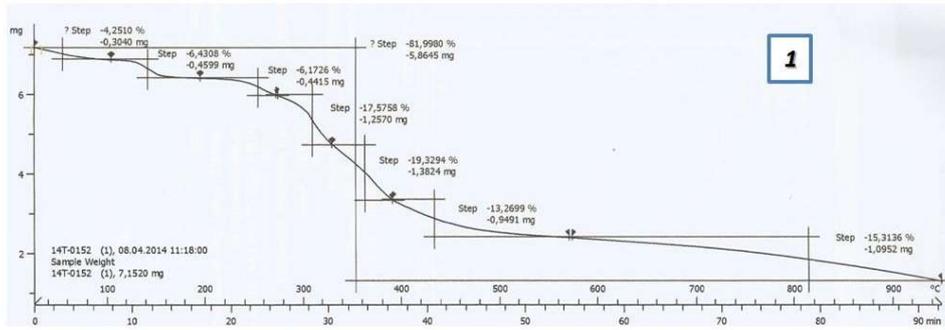


ANEXO III: TG micropartículas de quitosano.

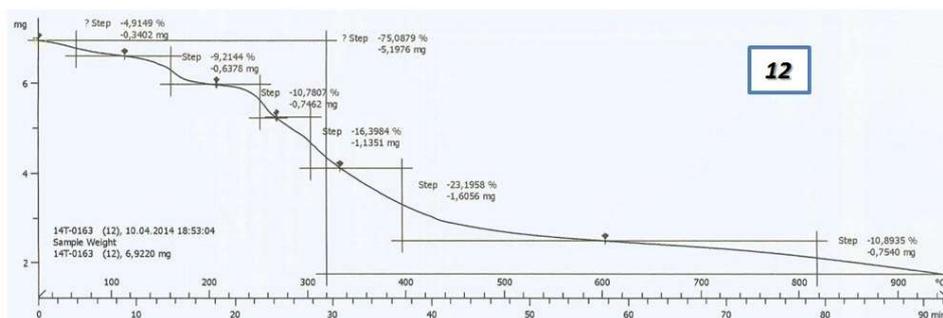
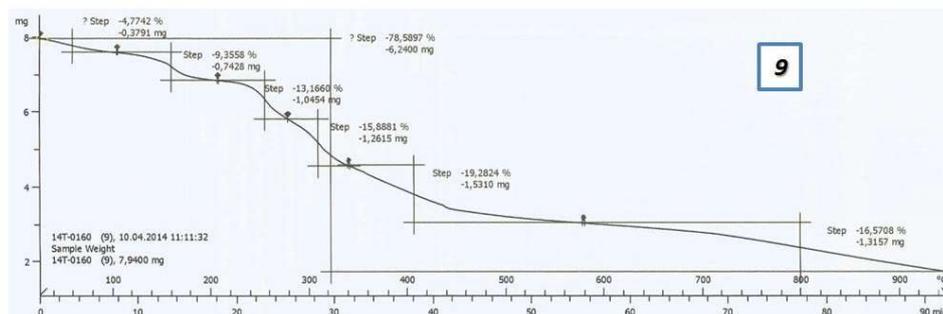
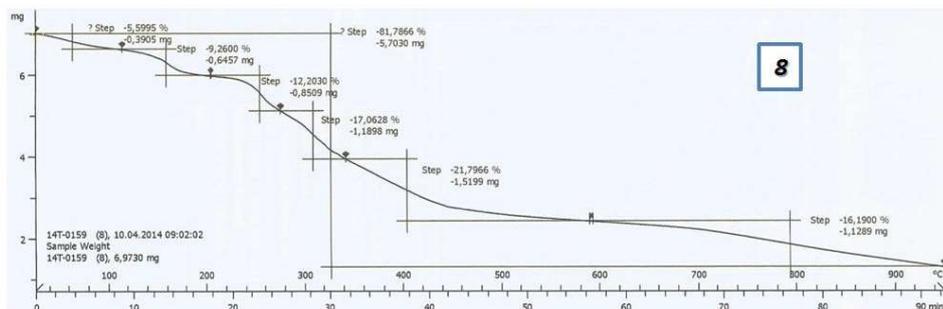
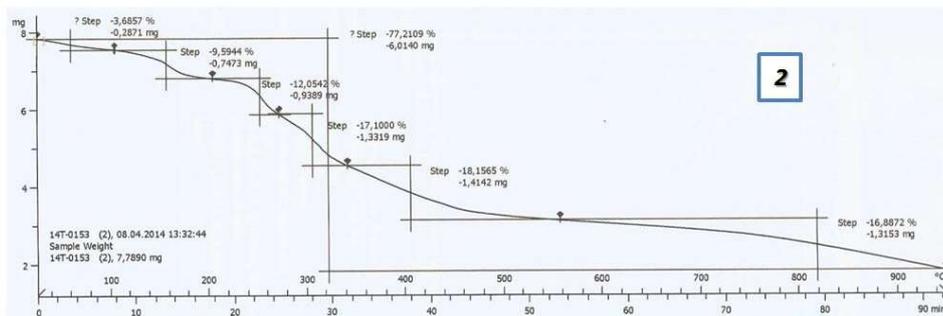
Productos puros.

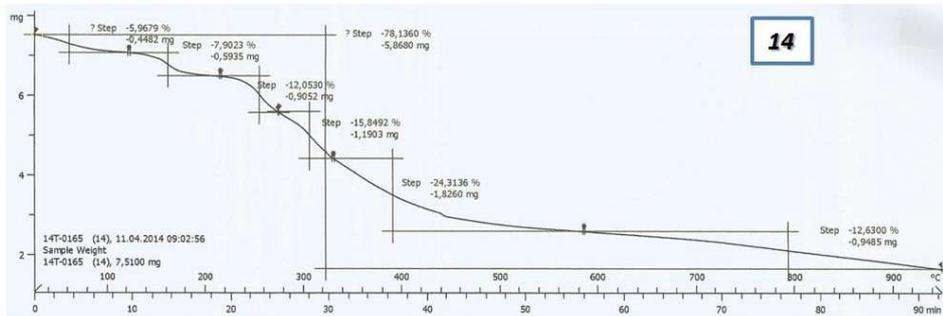
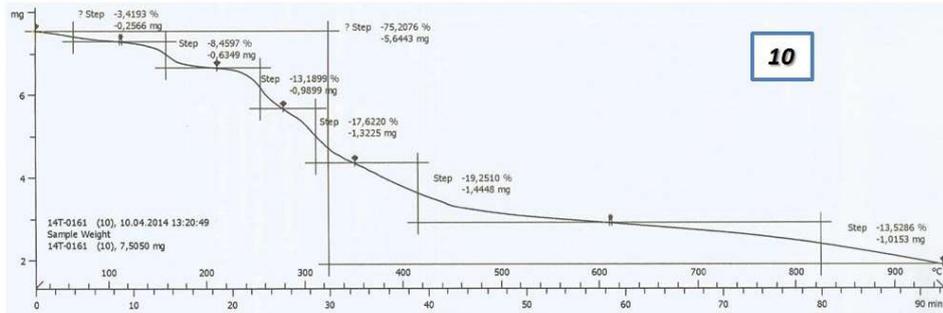
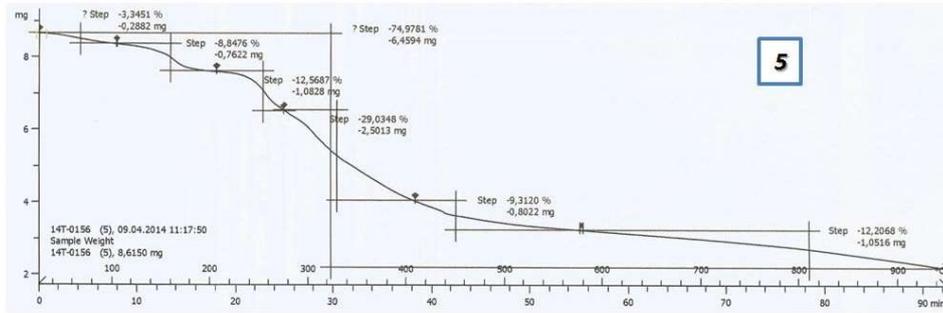
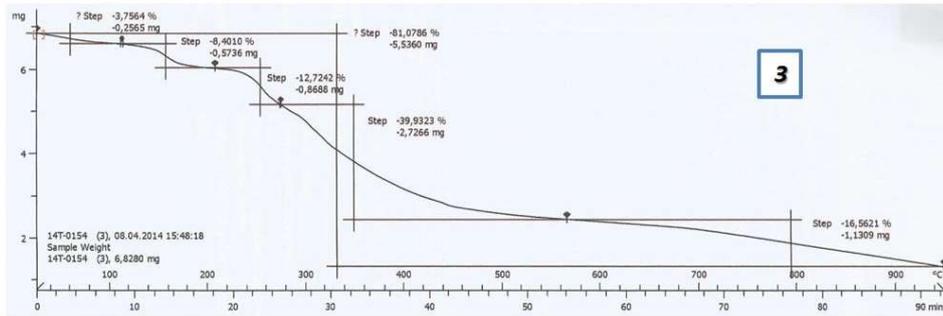


Micropartículas con proporción 8:1

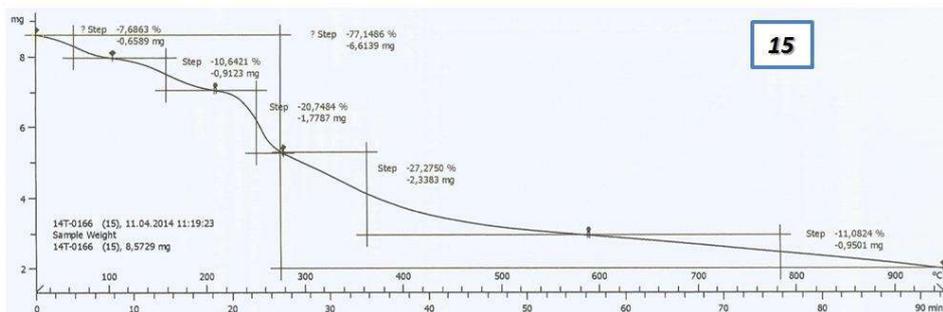
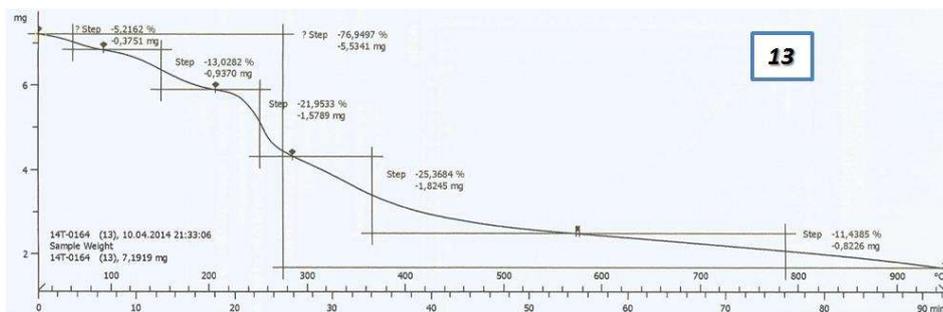
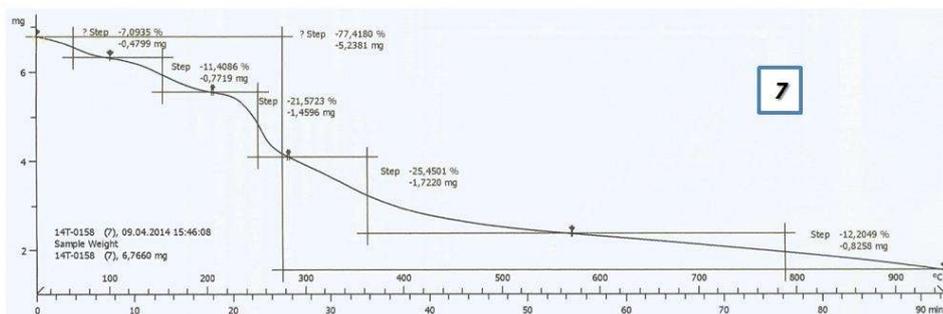
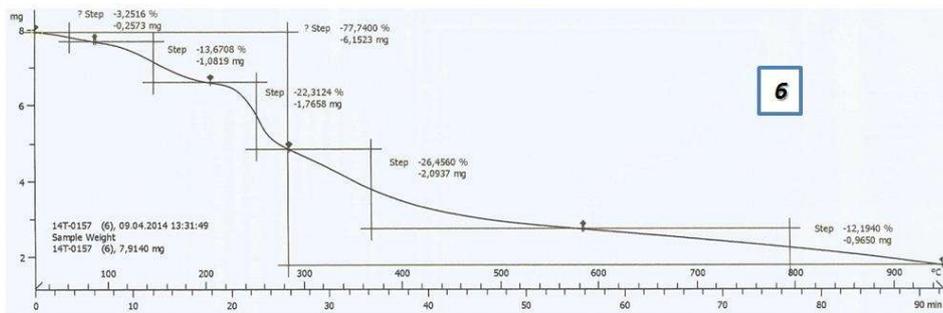


Micropartículas con proporción 2:1.



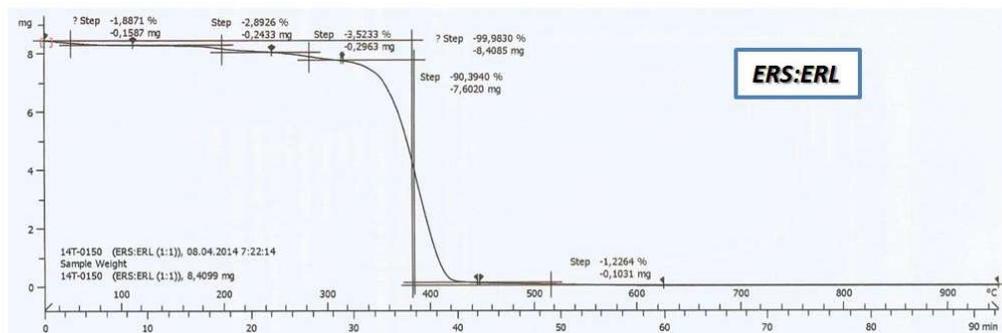
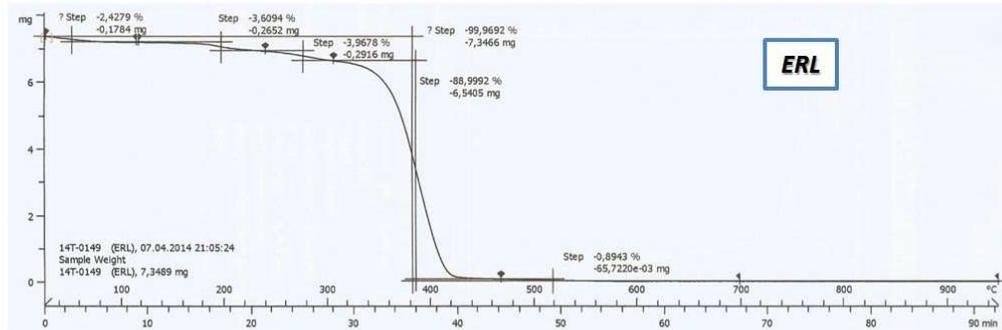
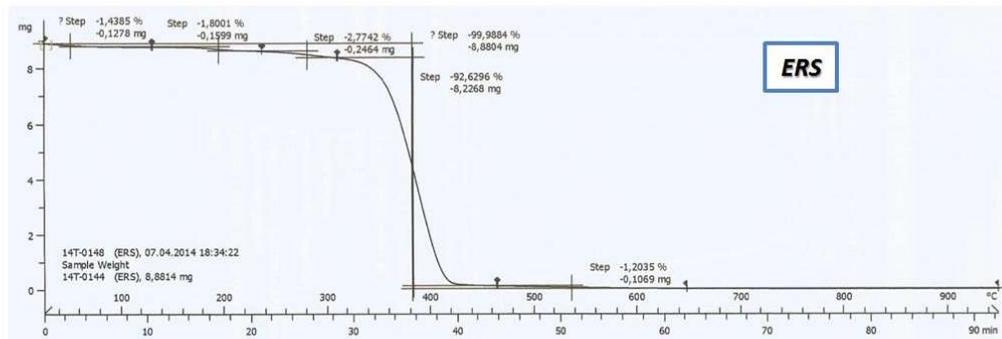
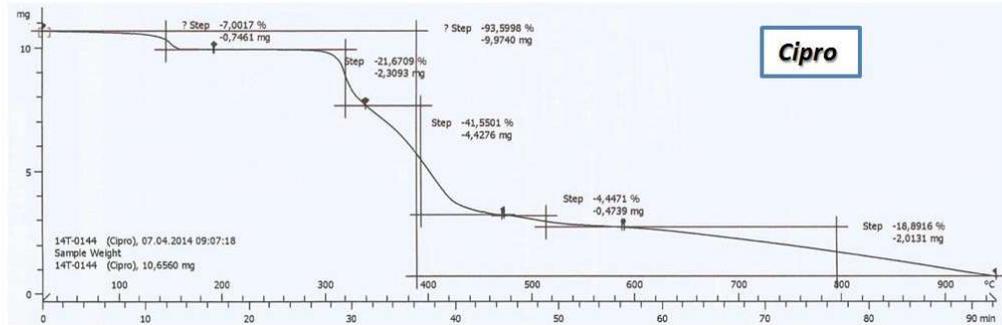


Micropartículas con proporción 1:2

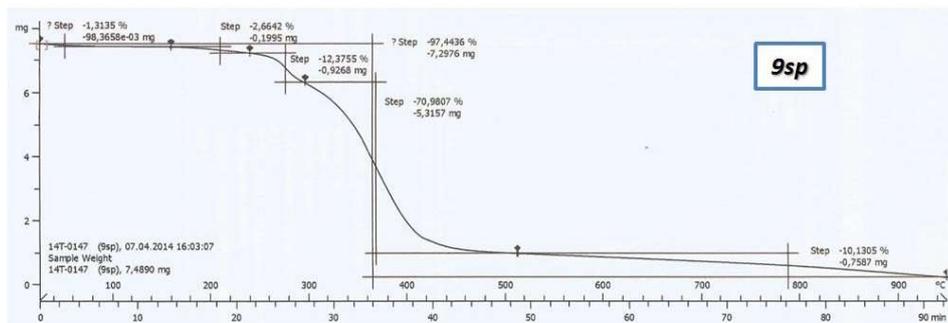
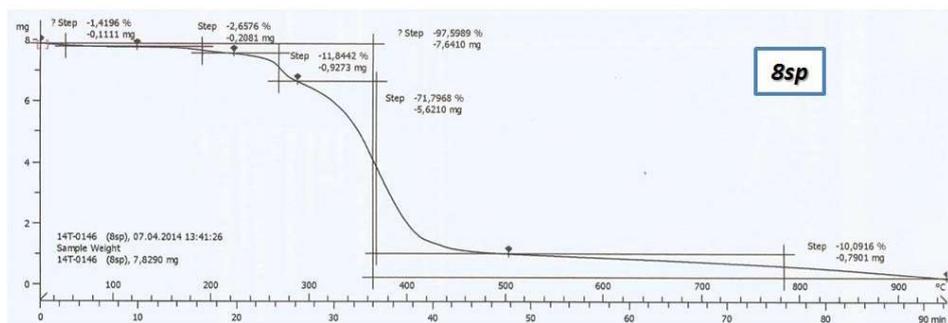
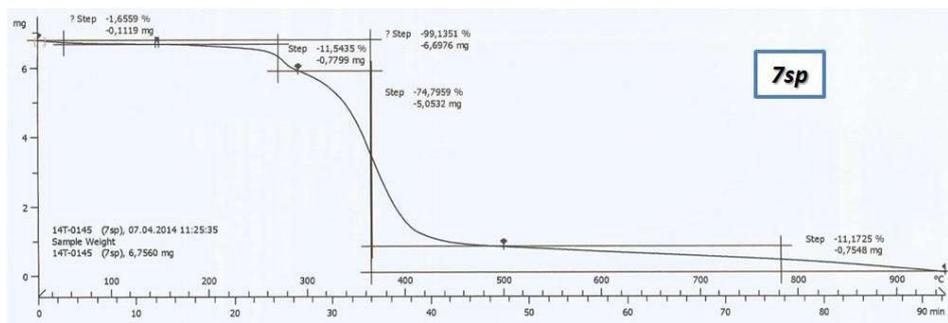


ANEXO IV: TG micropartículas finales de Eudragit®.

Productos puros.



Microparticulas finales



**REFERENCIAS
BIBLIOGRAFICAS**

1. Neuman MG. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *Transl Res.* 2007 Apr;149(4):173–86.
2. Neuman MG, Nanau RM. Inflammatory bowel disease: role of diet, microbiota, life style. *Transl Res.* 2012 Jul;160(1):29–44.
3. Sánchez-Fayos Calabuig P, Martín Relloso MJ, Porres Cubero JC. Etiología multifactorial y parcelas patogénicas de la enfermedad inflamatoria intestinal. *Gastroenterol Hepatol.* 2009 Nov;32(9):633–52.
4. Ordás I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn WJ. Ulcerative colitis. *The Lancet.* 2012 Nov;380(9853):1606–19.
5. Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *The Lancet.* 2012 Nov;380(9853):1590–605.
6. Gassull MÁ, Gomollón F, Hinojosa J. Enfermedad inflamatoria intestinal. 3^a ed. Madrid: Arán; 2007.
7. Gómez Ayala A-E. Enfermedad inflamatoria intestinal. Terapia nutricional. *Farm Prof.* 2008 Apr 1;22(04):48–53.
8. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature.* 2011 Jun 15;474(7351):307–17.
9. Mikhailov TA. A Family Study to Assess Genetic and Environmental Risk Factors in Inflammatory Bowel Disease. Illinois; 2011.
10. Kappelman MD, Moore KR, Allen JK, Cook SF. Recent Trends in the Prevalence of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis in a Commercially Insured US Population. *Dig Dis Sci.* 2013 Feb;58(2):519–25.
11. Han DY, Fraser AG, Dryland P, Ferguson LR. Environmental factors in the development of chronic inflammation: A case-control study on risk factors for Crohn's disease within New Zealand. *Mutat Res Mol Mech Mutagen.* 2010 Agosto;690(1–2):116–22.
12. Loftus Jr EV. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology.* 2004 May;126(6):1504–17.
13. Danese S, Sans M, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun Rev.* 2004 Jul;3(5):394–400.
14. Karlinger K, Györke T, Makö E, Mester Á, Tarján Z. The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur J Radiol.* 2000 Sep;35(3):154–67.
15. Lindberg E, Tysk C, Andersson K, Järnerot G. Smoking and inflammatory bowel disease. A case control study. *Gut.* 1988 Mar 1;29(3):352–7.

16. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *The Lancet*. 2007 May 12;369(9573):1627–40.
17. Koutroubakis IE, Vlachonikolis IG, Kouroumalis EA. Role of appendicitis and appendectomy in the pathogenesis of ulcerative colitis: a critical review. *Inflamm Bowel Dis*. 2002 Jul;8(4):277–86.
18. Corrao G, Tragnone A, Caprilli R, Trallori G, Papi C, Andreoli A, et al. Risk of inflammatory bowel disease attributable to smoking, oral contraception and breastfeeding in Italy: a nationwide case-control study. *Int J Epidemiol*. 1998;27:397–404.
19. Hisamatsu T, Kanai T, Mikami Y, Yoneno K, Matsuoka K, Hibi T. Immune aspects of the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Pharmacol Ther*. 2013 Mar;137(3):283–97.
20. Cassinotti A, Sarzi-Puttini P, Fichera M, Shoenfeld Y, de Franchis R, Ardizzone S. Immunity, autoimmunity and inflammatory bowel disease. *Autoimmun Rev*. 2014 Jan;13(1):1–2.
21. Openshaw PJM, Tregoning JS. Immune Responses and Disease Enhancement during Respiratory Syncytial Virus Infection. *Clin Microbiol Rev*. 2005 Jul;18(3):541–55.
22. Geremia A, Biancheri P, Allan P, Corazza GR, Di Sabatino A. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmun Rev*. 2014 Jan;13(1):3–10.
23. Thachil É, Hugot J, Arbeille B, Paris R, Grodet A, Peuchmaur M, et al. Abnormal Activation of Autophagy-Induced Crinophagy in Paneth Cells From Patients With Crohn's Disease. *Gastroenterology*. 2012 May;142(5):1097–9.e4.
24. García-Mazcorro JF, Garza-González E, Marroquín-Cardona AG, Tamayo JL. Caracterización, influencia y manipulación de la microbiota gastrointestinal en salud y enfermedad. *Gastroenterol Hepatol*. 2015 Agosto;38(7):445–66.
25. Guarner F. Microbiota intestinal y enfermedades inflamatorias del intestino. *Gastroenterol Hepatol*. 2011 Mar;34(3):147–54.
26. Frick J-S, Autenrieth IB. The gut microflora and its variety of roles in health and disease. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;358:273–89.
27. Spencer JFT, Ragout de Spencer AL. *Public health microbiology: methods and protocols*. Totowa, N.J.: Humana Press; 2004.
28. Natividad JMM, Verdu EF. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: Pathological and therapeutic implications. *Pharmacol Res*. 2013 Mar;69(1):42–51.
29. Sansonetti PJ. Host-bacteria homeostasis in the healthy and inflamed gut. *Curr Opin Gastroenterol*. 2008 Jul;24(4):435–9.

30. Reiff C, Kelly D. Inflammatory bowel disease, gut bacteria and probiotic therapy. *Int J Med Microbiol.* 2010 Jan;300(1):25–33.
31. Sokol H, Seksik P. The intestinal microbiota in inflammatory bowel diseases: time to connect with the host: *Curr Opin Gastroenterol.* 2010 Jul;26(4):327–31.
32. Bibiloni R. The bacteriology of biopsies differs between newly diagnosed, untreated, Crohn's disease and ulcerative colitis patients. *J Med Microbiol.* 2006 Aug 1;55(8):1141–9.
33. Rath HC, Schultz M, Freitag R, Dieleman LA, Li F, Linde H-J, et al. Different Subsets of Enteric Bacteria Induce and Perpetuate Experimental Colitis in Rats and Mice. *Infect Immun.* 2001 Apr;69(4):2277–85.
34. Ott SJ, Musfeldt M, Wenderoth DF, Hampe J, Brant O, Fölsch UR, et al. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut.* 2004 May;53(5):685–93.
35. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of Commensal Microflora by Toll-Like Receptors Is Required for Intestinal Homeostasis. *Cell.* 2004 Jul;118(2):229–41.
36. Paul J, Verma AK, Verma R. Role Of Gut Flora In Inflammatory Bowel Disease- A State Of Art. *Commun Curr Res Educ Top Trends Appl Microbiol Méndez-Vilas Ed.* 2007;705–18.
37. Orel R, Kamhi Trop T. Intestinal microbiota, probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20(33):11505.
38. Randall C, Vizuete J, Wendorf G, Ayyar B, Constantine G. Current and emerging strategies in the management of Crohn's disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2012 Oct;26(5):601–10.
39. Kondamudi PK, Malayandi R, Eaga C, Aggarwal D. Drugs as causative agents and therapeutic agents in inflammatory bowel disease. *Acta Pharm Sin B.* 2013 Sep;3(5):289–96.
40. Ravi Kumar MNV. A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym.* 2000 Nov;46(1):1–27.
41. Daraghmeh NH, Chowdhry BZ, Leharne SA, Omari MM Al, Badwan AA. Chitin. In: *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology* [Internet]. Elsevier; 2011 [cited 2014 Jun 23]. p. 35–102. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123876676000026>
42. Jiang T, James R, Kumbar SG, Laurencin CT. Chapter 5 - Chitosan as a Biomaterial: Structure, Properties, and Applications in Tissue Engineering and Drug Delivery. In: *Deng SGKTL, editor. Natural and Synthetic Biomedical Polymers* [Internet]. Oxford: Elsevier; 2014 [cited 2014 Nov 20]. p. 91–113. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123969835000053>

43. Yousef M, Pichyangkura R, Soodvilai S, Chatsudthipong V, Muanprasat C. Chitosan oligosaccharide as potential therapy of inflammatory bowel disease: Therapeutic efficacy and possible mechanisms of action. *Pharmacol Res.* 2012 Jul;66(1):66–79.
44. Andreani SM, Dang HH, Grondona P, Khan AZ, Edwards DP. Rectovaginal Fistula in Crohn's Disease. *Dis Colon Rectum.* 2007 Sep 11;50(12):2215–22.
45. Overstreet A-MC. Impact of antibiotic use, alternative therapies and inflammation on the intestinal microbiota [Graduate Theses and Dissertations]. Ames, Iowa. Iowa State University, United States; 2012.
46. Kale-Pradhan PB, Zhao JJ, Palmer JR, Wilhelm SM. The role of antimicrobials in Crohn's disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013 Mar;7(3):281–8.
47. Rahimi R, Nikfar S, Rezaie A, Abdollahi M. A meta-analysis of broad-spectrum antibiotic therapy in patients with active Crohn's disease. *Clin Ther.* 2006 Dec;28(12):1983–8.
48. Royero HA. Enfermedad inflamatoria intestinal. *Rev Colomb Gastroenterol* [Internet]. 2003;18(1). Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-99572003000100006&script=sci_arttext
49. Arnold GL, Beaves MR, Pryjdun VO, Mook WJ. Preliminary study of ciprofloxacin in active Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2002 Enero;8(1):10–5.
50. Kruis W. Antibiotics and probiotics in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004 Oct 1;20:75–8.
51. West RL, Woude CJ, Endtz HP, Hansen BE, Ouwendijk M, Boelens HAM, et al. Perianal Fistulas in Crohn's Disease Are Predominantly Colonized by Skin Flora: Implications for Antibiotic Treatment? *Dig Dis Sci.* 2005 Jul;50(7):1260–3.
52. Prantera C, Zannoni F, Scribano ML, Berto E, Andreoli A, Kohn A, et al. An antibiotic regimen for the treatment of active Crohn's disease: a randomized, controlled clinical trial of metronidazole plus ciprofloxacin. *Am J Gastroenterol.* 1996 Feb;91(2):328–32.
53. Greenbloom SL, Steinhart AH, Greenberg GR. Combination ciprofloxacin and metronidazole for active Crohn's disease. *Can J Gastroenterol J Can Gastroenterol.* 1998 Feb;12(1):53–6.
54. Lal S, Steinhart AH. Antibiotic therapy for Crohn's disease: A review. *Can J Gastroenterol.* 2006 Oct;20(10):651–5.
55. Peppercorn MA. Is there a role for antibiotics as primary therapy in Crohn's ileitis? *J Clin Gastroenterol.* 1993 Oct;17(3):235–7.

56. Colombel J-F, Lémann M, Cassagnou M, Bouhnik Y, Duclos B, Dupas J-L, et al. A controlled trial comparing ciprofloxacin with mesalazine for the treatment of active Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 1999 Mar;94(3):674–8.
57. Vilar G, Tulla-Puche J, Albericio F. *Polymers and Drug Delivery Systems*. *Curr Drug Deliv*. 2012;9(4):1–28.
58. Lautenschläger C, Schmidt C, Fischer D, Stallmach A. Drug delivery strategies in the therapy of inflammatory bowel disease. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014 May;71:58–76.
59. Reed KK, Wickham R. Review of the Gastrointestinal Tract: From Macro to Micro. *Semin Oncol Nurs*. 2009 Feb;25(1):3–14.
60. DeSesso JM, Jacobson CF. Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc*. 2001 Mar;39(3):209–28.
61. Talaei F, Atyabi F, Azhdarzadeh M, Dinarvand R, Saadatzadeh A. Overcoming therapeutic obstacles in inflammatory bowel diseases: A comprehensive review on novel drug delivery strategies. *Eur J Pharm Sci*. 2013 Jul;49(4):712–22.
62. Chourasia MK, Jain SK. Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems. *J Pharm Pharm Sci Publ Can Soc Pharm Sci Société Can Sci Pharm*. 2003 Apr;6(1):33–66.
63. Quinteros D, Palma S, Allemandi D. Sistemas portadores de fármacos: liberación colónica. *Nuestra Farm*. 2006;46:12–5.
64. Kolte BP, Tele KV, Mundhe VS, Lahoti SS. Colon targeted drug delivery system - a novel perspective. *Asian J Biomed Pharm Sci*. 2012;2(14):21–8.
65. McConnell EL, Fadda HM, Basit AW. Gut instincts: explorations in intestinal physiology and drug delivery. *Int J Pharm*. 2008 Dec 8;364(2):213–26.
66. Wilson CG. The transit of dosage forms through the colon. *Int J Pharm*. 2010 Aug 16;395(1-2):17–25.
67. Yuen K-H. The transit of dosage forms through the small intestine. *Int J Pharm*. 2010 Aug 16;395(1-2):9–16.
68. Kumar M, Akabar K, Prashant S, Abhay K, Vilasrao J. Platform technologies for colon targeted drug delivery system: a review article. *J Pharm Res*. 2010;3(3):543.
69. Madhu EN, Panaganti S, Prabakaran L, Jayveera KN. Novel colon specific drug delivery system: a review. *Int J Pharm Sci Res*. 2011;2:2545–61.
70. Rajguru, Preeti D. Gaikwad, Vidyadhar H. Bankar, Sunil P. Pawar. An overview on colonic drug delivery system. *Int J Pharm Sci Rev Res*. 2011;6(2):197–204.
71. Reddy, K. Malleswari, G. Prasad, G. Pavani. Colon targeted drug delivery system: a review. *Int J Pharm Sci Res*. 2013;4(1):42–54.

72. Sethi S, SL. Harikumar, Nirmala. Review on advances in colon targeted drug delivery system. *Int J Pharm Sci Res.* 2012;3(9):2989–3000.
73. Singh KI, Singh J, Sharma D, Sharma A. Colon specific drug delivery system: review on novel approaches. *Int J Pharm Sci Res.* 2012;3(3):637–47.
74. Verma S, Kumar V, Mishra DN, Singh SK. Colon targeted drug delivery: current and novel perspectives. *Int J Pharm Sci Res.* 2012;3:1274–84.
75. Petrak K. Essential properties of drug-targeting delivery systems. *Drug Discov Today.* 2005 Dec;10(23-24):1667–73.
76. Torchilin VP. Drug targeting. *Eur J Pharm Sci.* 2000;11(suplement 2):S81–91.
77. Hua S, Marks E, Schneider JJ, Keely S. Advances in oral nano-delivery systems for colon targeted drug delivery in inflammatory bowel disease: Selective targeting to diseased versus healthy tissue. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med.* 2015 Jul;11(5):1117–32.
78. Lamprecht A, Yamamoto H, Takeuchi H, Kawashima Y. A pH-sensitive microsphere system for the colon delivery of tacrolimus containing nanoparticles. *J Controlled Release.* 2005 May;104(2):337–46.
79. Lee VHL, Mukherjee SK. Drug Delivery: Oral Colon-Specific. In: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* [Internet]. Third Edition. Taylor & Francis; 2013 [cited 2015 Jun 15]. p. 1228–41. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/E-EPT3-100200029>
80. Makhlof A, Werle M, Tozuka Y, Takeuchi H. A mucoadhesive nanoparticulate system for the simultaneous delivery of macromolecules and permeation enhancers to the intestinal mucosa. *J Controlled Release.* 2011 Jan;149(1):81–8.
81. Orlu M, Cevher E, Araman A. Design and evaluation of colon specific drug delivery system containing flurbiprofen microsponges. *Int J Pharm.* 2006 Aug;318(1-2):103–17.
82. Patel A, Bhatt N, Patel KR, Patel N., Patel MR. Colon targeted drug delivery system: a review system. *J Pharm Sci Biosci Res.* 2011;1(1):37–49.
83. Philip AK, Philip B. Colon Targeted Drug Delivery Systems: A Review on Primary and Novel Approaches. *Oman Med J.* 2010 Apr;25(2):79–87.
84. Rubinstein A. Colonic drug delivery. *Drug Discov Today Technol.* 2005;2(1):33–7.
85. Yang L, Chu JS, Fix JA. Colon-specific drug delivery: new approaches and in vitro/in vivo evaluation. *Int J Pharm.* 2002 Mar 20;235(1–2):1–15.
86. Challa T, Vynala V, Allam KV. Colon specific drug delivery systems: a review on primary and novel approaches. *International Journal of Pharmaceutical Science s Review and Research* [Internet]. 2011;7. Available from: <http://globalresearchonline.net/journalcontents/volume7issue2/Article-031.pdf>

87. Gupta VK, Gnanarajan G, Kothiyal P. A Review Article on Colonic Targeted Drug Delivery System. *Pharma Innov.* 2012;1(7):14–24.
88. Friend DR. New oral delivery systems for treatment of inflammatory bowel disease. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005 Jan;57(2):247–65.
89. Kosaraju SL. Colon targeted delivery systems: review of polysaccharides for encapsulation and delivery. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2005;45(4):251–8.
90. Kumar R, Patil MB, Patil SR, Paschapur MS. Polysaccharides based colon specific drug delivery: a review. *Int J Pharm Thech Res.* 2009;1(2):334–46.
91. Sinha VR, Kumria R. Polysaccharides in colon-specific drug delivery. *Int J Pharm.* 2001 Aug;224(1-2):19–38.
92. Sinha VR, Kumria R. Polysaccharide matrices for microbially triggered drug delivery to the colon. *Drug Dev Ind Pharm.* 2004 Feb;30(2):143–50.
93. Sinha V., Singla A., Wadhawan S, Kaushik R, Kumria R, Bansal K, et al. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *Int J Pharm.* 2004 Apr;274(1-2):1–33.
94. Gentile MS. Development of a colonic targeting nanosphere delivery system for chemotherapeutic agents [Tesis Doctoral]. Pennsylvania State University. United States; 2008.
95. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2010 Enero;75(1):1–18.
96. Lamprecht A, Schäfer U, Lehr C-M. Size-Dependent Bioadhesion of Micro- and Nanoparticulate Carriers to the Inflamed Colonic Mucosa. *Pharm Res.* 2001;18(6):788–93.
97. Collnot E-M, Ali H, Lehr C-M. Nano- and microparticulate drug carriers for targeting of the inflamed intestinal mucosa. *J Controlled Release.* 2012 Jul;161(2):235–46.
98. Cornaggia M, Leutner M, Mescoli C, Sturniolo GC, Gullotta R, Gruppo Italiano Patologi Apparato Digerente (GIPAD), et al. Chronic idiopathic inflammatory bowel diseases: the histology report. *Dig Liver Dis Off J Ital Soc Gastroenterol Ital Assoc Study Liver.* 2011 Mar;43 Suppl 4:S293–303.
99. Moulari B, Pertuit D, Pellequer Y, Lamprecht A. The targeting of surface modified silica nanoparticles to inflamed tissue in experimental colitis. *Biomaterials.* 2008 Dec;29(34):4554–60.
100. Hardy JG, Davis SS, Khosla R, Robertson CS. Gastrointestinal transit of small tablets in patients with ulcerative colitis. *Int J Pharm.* 1988 Diciembre;48(1–3):79–82.
101. Mohanraj VJ, Chen Y. Nanoparticles - A review. *Trop J Pharm Res.* 2006;5(1):561–73.

102. Shimanovich U, Bernardes GJL, Knowles TPJ, Cavaco-Paulo A. Protein micro- and nano-capsules for biomedical applications. *Chemical Soc Rev*. 2014;43(5):1361–71.
103. Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J Controlled Release*. 2004 Nov;100(1):5–28.
104. Nair R, Reddy BH, AshoknKumar CK, Kumar KJ. Application of chitosan microspheres as drug carriers: a review. *J Pharm Sci Res*. 2009;1(2):1–12.
105. Pinto Reis C, Neufeld RJ, Ribeiro, AJ, Veiga F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med*. 2006 Mar;2(1):8–21.
106. Rao JP, Geckeler KE. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Prog Polym Sci*. 2011 Jul;36(7):887–913.
107. Saez V, Hernández JR, Peniche C. Las microesferas como sistemas de liberación controlada de péptidos y proteínas. *Biotecnol Apl*. 2007;24:98–107.
108. Vauthier C, Bouchemal K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharm Res*. 2009 May;26(5):1025–58.
109. Expósito R, Heras Caballero AM, Acosta Contreras FN, e-libro C. Quitosano, un biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos [Internet]. [Madrid]: Universidad Complutense de Madrid; 2010 [cited 2014 Jul 16]. Available from: <http://site.ebrary.com/id/10522685>
110. López Hernández OD, Gómez Carril M. Preparación de microesferas mediante secado por aspersión. *Rev Cuba Farm*. 2008 Dec;42(3):0–0.
111. Vehring R. Pharmaceutical Particle Engineering via Spray Drying. *Pharm Res*. 2008 May;25(5):999–1022.
112. Liu W, Chen XD, Selomulya C. On the spray drying of uniform functional microparticles. *Particuology*. 2015 Oct;22:1–12.
113. Sezer AD, Akbuğa J. Controlled release of piroxicam from chitosan beads. *Int J Pharm*. 1995 Jul 6;121(1):113–6.
114. Mladenovska K, Raicki RS, Janevik EI, Ristoski T, Pavlova MJ, Kavrakovski Z, et al. Colon-specific delivery of 5-aminosalicylic acid from chitosan-Ca-alginate microparticles. *Int J Pharm*. 2007 Sep;342(1-2):124–36.
115. Ramdas M, Dileep KJ, Anitha Y, Paul W, Sharma CP. Alginate encapsulated bioadhesive chitosan microspheres for intestinal drug delivery. *J Biomater Appl*. 1999 Apr;13(4):290–6.
116. Al-Omar MA. Ciprofloxacin: physical profile. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol*. 2005;31:163–78.

117. Real farmacoepa española. 5^a ed. [Madrid]: Ministerio de Sanidad y Consumo, Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios : Ministerio de la Presidencia, Boletín Oficial del Estado; 2015.
118. European Pharmacopoeia. 6^a ed. Strasbourg: Council of Europe. European Directorate for the Quality Medicines and Healthcare; 2007.
119. The United States pharmacopoeia/The National Formulary. USP 37/ NF 32. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention; 2014.
120. Lindenberg M, Kopp S, Dressman JB. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Für Pharm Verfahrenstechnik EV*. 2004 Sep;58(2):265–78.
121. Mao Z, Ma L, Gao C, Shen J. Preformed microcapsules for loading and sustained release of ciprofloxacin hydrochloride. *J Controlled Release*. 2005 May;104(1):193–202.
122. Martindale W. Martindale: The Extra Pharmacopoeia. 29th edition. Reynolds JEF, etc, editors. London: Pharmaceutical Press; 1989. 1984 p.
123. Zhang C-L, Zhao F, Wang Y. Thermodynamics of the solubility of ciprofloxacin in methanol, ethanol, 1-propanol, acetone, and chloroform from 293.15 to 333.15K. *J Mol Liq*. 2010 Sep;156(2-3):191–3.
124. Pillai CKS, Paul W, Sharma CP. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Prog Polym Sci*. 2009 Jul;34(7):641–78.
125. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci*. 2006 Jul;31(7):603–32.
126. Guinesi LS, Cavalheiro ÉTG. The use of DSC curves to determine the acetylation degree of chitin/chitosan samples. *Thermochim Acta*. 2006 May;444(2):128–33.
127. Kubota N, Eguchi Y. Facile Preparation of Water-Soluble N-Acetylated Chitosan and Molecular Weight Dependence of Its Water-Solubility. *Polym J*. 1997 Feb;29(2):123–7.
128. Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog Polym Sci*. 2011 Aug;36(8):981–1014.
129. Peniche C, Argüelles-Monal W, Peniche H, Acosta N. Chitosan: An Attractive Biocompatible Polymer for Microencapsulation. *Macromol Biosci*. 2003;3(10):511–20.
130. Papola Vibhooti, Rajan G, Bisht Seema. Eudragit and chitosan - the two most promising polymers for colon drug delivery. *Int J Pharm Biol Arch*. 2013;4(3):399–410.

131. Hejazi R, Amiji M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 2003 Apr 29;89(2):151–65.
132. Shimono N, Takatori T, Ueda M, Mori M, Higashi Y, Nakamura Y. Chitosan dispersed system for colon-specific drug delivery. *Int J Pharm.* 2002 Oct 1;245(1-2):45–54.
133. Tozaki H, Komoike J, Tada C, Maruyama T, Terabe A, Suzuki T, et al. Chitosan capsules for colon-specific drug delivery: improvement of insulin absorption from the rat colon. *J Pharm Sci.* 1997 Sep;86(9):1016–21.
134. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME, American Pharmacists Association. *Handbook of pharmaceutical excipients*. 6th. edition. London; Chicago; Washington, DC: Pharmaceutical Press ; American Pharmacists Association; 2009.
135. Abbaspour MR, Sadeghi F, Garekani HA. Preparation and characterization of ibuprofen pellets based on Eudragit RS PO and RL PO or their combination. *Int J Pharm.* 2005 Oct;303(1-2):88–94.
136. Abbaspour MR, Sadeghi F, Afrasiabi Garekani H. Thermal treating as a tool to produce plastic pellets based on Eudragit RS PO and RL PO aimed for tableting. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007 Aug;67(1):260–7.
137. Apu AS, Pathan AH, Shrestha D, Kibria G, Jalil R. Investigation of In vitro Release Kinetics of Carbamazepine from Eudragit® RS PO and RL PO Matrix Tablets. *Trop J Pharm Res [Internet].* 2009 [cited 2014 Nov 26];8(2). Available from: <http://www.ajol.info/index.php/tjpr/article/view/44523>
138. Azarmi S, Farid J, Nokhodchi A, Bahari-Saravi SM, Valizadeh H. Thermal treating as a tool for sustained release of indomethacin from Eudragit RS and RL matrices. *Int J Pharm.* 2002 Oct 10;246(1–2):171–7.
139. Pirayavaraporn C, Rades T, Gordon KC, Tucker IG. Quantification of the types of water in Eudragit RLPO polymer and the kinetics of water loss using FTIR. *Int J Pharm.* 2013 Dec;458(1):90–8.
140. eudragit.evonik.com [homepage on the Internet] [Internet]. Evonik Industries AG; 2013. Available from: <http://eudragit.evonik.com/product/eudragit/en/products-services/eudragit-products/sustained-release-formulations/rs-po/pages/default.aspx>, <http://eudragit.evonik.com/product/eudragit/en/products-services/eudragit-products/sustained-release-formulations/rl-po/pages/default.aspx>
141. Ugurlu T, Turkoglu M, Gurer US, Akarsu BG. Colonic delivery of compression coated nisin tablets using pectin/HPMC polymer mixture. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007 Aug;67(1):202–10.
142. Vandamme TF, Lenourry A, Charrueau C, Chaumeil J-C. The use of polysaccharides to target drugs to the colon. *Carbohydr Polym.* 2002 May 15;48(3):219–31.

143. Gummadi SN, Panda T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases—a review. *Process Biochem.* 2003 Feb 28;38(7):987–96.
144. Jayani RS, Saxena S, Gupta R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochem.* 2005 Sep;40(9):2931–44.
145. Kashyap DR, Vohra PK, Chopra S, Tewari R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresour Technol.* 2001 May;77(3):215–27.
146. Caraballo I. Factors affecting drug release from hydroxypropyl methylcellulose matrix systems in the light of classical and percolation theories. *Expert Opin Drug Deliv.* 2010 Nov;7(11):1291–301.
147. Shukla RK, Tiwari A. Carbohydrate polymers: Applications and recent advances in delivering drugs to the colon. *Carbohydr Polym.* 2012 Apr;88(2):399–416.
148. Siepmann J, Karrouf Y, Gehrke M, Penz FK, Siepmann F. Predicting drug release from HPMC/lactose tablets. *Int J Pharm.* 2013 Jan;441(1-2):826–34.
149. Colombo P. Swelling-controlled release in hydrogel matrices for oral route. *Adv Drug Deliv Rev.* 1993 Jul;11(1–2):37–57.
150. Li CL, Martini LG, Ford JL, Roberts M. The use of hypromellose in oral drug delivery. *J Pharm Pharmacol.* 2005 May 1;57(5):533–46.
151. Hodges LA, Connolly SM, Band J, O’Mahony B, Ugurlu T, Turkoglu M, et al. Scintigraphic evaluation of colon targeting pectin–HPMC tablets in healthy volunteers. *Int J Pharm.* 2009 Mar 31;370(1–2):144–50.
152. Turkoglu M, Ugurlu T. In vitro evaluation of pectin–HPMC compression coated 5-aminosalicylic acid tablets for colonic delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2002 Enero;53(1):65–73.
153. Biswal I, Dinda A, Das D, Si S, Chowdary KA. Encapsulation protocol for highly hydrophilic drug using non-biodegradable polymer. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2011;3(2):256–9.
154. El-Hefian EA EE. Characterization of chitosan in acetic acid: Rheological and thermal studies. *Turk J Chem.* 2010;34:47–56.
155. He P, Davis SS, Illum L. Chitosan microspheres prepared by spray drying. *Int J Pharm.* 1999 Sep 30;187(1):53–65.
156. Mi F-L, Wong T-B, Shyu S-S, Chang S-F. Chitosan microspheres: modification of polymeric chem-physical properties of spray-dried microspheres to control the release of antibiotic drug. *J Appl Polym Sci.* 1999 Enero;71(5):747–59.
157. Kašpar O, Tokárová V, Nyanhongo GS, Gübitz G, Štěpánek F. Effect of cross-linking method on the activity of spray-dried chitosan microparticles with immobilized laccase. *Food Bioprod Process.* 2013 Oct;91(4):525–33.

158. Esposito E, Roncarati R, Cortesi R, Cervellati F, Nastruzzi C. Production of Eudragit microparticles by spray-drying technique: influence of experimental parameters on morphological and dimensional characteristics. *Pharm Dev Technol.* 2000;5(2):267–78.
159. Esposito E, Cervellati F, Menegatti E, Nastruzzi C, Cortesi R. Spray dried Eudragit microparticles as encapsulation devices for vitamin C. *Int J Pharm.* 2002 Aug 21;242(1-2):329–34.
160. Garekani HA, Moghaddam ZF, Sadeghi F. Organic solution versus aqueous dispersion of Eudragit RS in preparation of sustained release microparticles of theophylline using spray drying. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2013 Agosto;108:374–9.
161. Kim C-K, Mi-Jung K, Kyoung-Hee O. Preparation and evaluation of sustained release microspheres of terbutaline sulfate. *Int J Pharm.* 1994 Jun 6;106(3):213–9.
162. Li M, Rouaud O, Poncelet D. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *Int J Pharm.* 2008 Nov;363(1-2):26–39.
163. O'Donnell PB, McGinity JW. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Adv Drug Deliv Rev.* 1997 Oct 13;28(1):25–42.
164. Haznedar S, Dortunç B. Preparation and in vitro evaluation of Eudragit microspheres containing acetazolamide. *Int J Pharm.* 2004 Jan;269(1):131–40.
165. Qandil AM, Assaf SM, Ani EA Al, Yassin AE, Obaidat AA. Sustained-release diclofenac potassium orally disintegrating tablet incorporating eudragit ERL/ERS: possibility of specific diclofenac-polymer interaction. *J Pharm Investig.* 2013 Jun;43(3):171–83.
166. Gallagher PK, Brown ME. Principles and practice. In: *Handbook of thermal analysis and calorimetry* [Internet]. Amsterdam; New York: Elsevier; 1998 [cited 2015 Feb 24]. Available from: <http://site.ebrary.com/id/10191563>
167. Stokes DJ. Environmental scanning electron microscopy (ESEM): principles and applications to food microstructures. In: *Food Microstructures* [Internet]. Elsevier; 2013 [cited 2014 Nov 21]. p. 3–26. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780857095251500014>
168. Padhy SK, Sahoo D, Acharya D, Mallick J. Formulation and in-vitro Evaluation of Ciprofloxacin Hydrochloride Sustained Release Tablets using various Viscosity Grades of Hydroxypropyl Methylcellulose. *Am J PharmTech Res.* 2013;3(5):1433–43.
169. Rahman MM, Roy S, Das SC, Jha MK, Ahsan MQ, Shahparan M, et al. Formulation and evaluation of hydroxypropylmethylcellulose based matrix systems as oral sustained release drug delivery systems for ciprofloxacin hydrochloride. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 2011;6(9):34–41.

170. Lorenzo-Lamosa ML, Remuñán-López C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery. *J Controlled Release*. 1998 Mar 2;52(1-2):109-18.
171. Gutierrez Gaitén YI, Miranda Martínez M, Varona Torres N, Tania Rodríguez T. Validación de 2 métodos espectrofotométricos para la cuantificación de taninos y flavonoides (quercetina) en psidium guajaba, L. *Rev Cubana Farm*. 2000;34(1):50-5.
172. Perez Navarro M, Rodriguez Hernández Y, Suárez Pérez Y. Validación del método por espectrofotometría ultravioleta para control de calidad de clorhidrato de ciprofloxacina en tabletas Ciprecu. *Rev Cubana Farm*. 2014;48(2).
173. Mondal N, Singh Y. Development and Validation of Different Spectrophotometric Methods for Estimation of Tenofovir Disoproxil Fumarate from Bulk Drug and Tablets. *Int J Pharm Sci Res*. 2014;5(2):623-9.
174. International Conference on Harmonization (ICH). Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (R1).
175. Aguirre Ortega L, Pérez Cuadrado JA, Pujol Forn M. Validación de métodos analíticos. [Barcelona: Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria; 2001.
176. Siepmann J, Peppas N. Mathematical modeling of drug delivery systems: Fifty years after Takeru Higuchi's models. *Int J Pharm*. 2011 Oct 10;418(1):1-148.
177. Crank J. The mathematics of diffusion. 2. ed., reprint. Oxford: Clarendon Press; 1976. 414 p.
178. Peppas NA, Bures P, Leobandung W, Ichikawa H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Für Pharm Verfahrenstechnik EV*. 2000 Jul;50(1):27-46.
179. Fahmy S, Abu-Gharbieh E. In vitro dissolution and in vivo bioavailability of six brands of ciprofloxacin tablets administered in rabbits and their pharmacokinetic modeling. *BioMed Res Int*. 2014 Jun;2014:1-8.
180. Harder S, Fuhr U, Beermann D, Staib A. Ciprofloxacin absorption in different regions of the human gastrointestinal tract. Investigations with the hf-capsule. *Br J Clin Pharmacol*. 1990 Jul 1;30(1):35-9.
181. Khan MK, Khan MF. Extraction and separation of ciprofloxacin by HPLC from human plasma. *Intl Chem Pharm Med*. 2005;2(2):267-70.
182. Wu S-S, Chein C-Y, Wen Y-H. Analysis of ciprofloxacin by a simple high-performance liquid chromatography method. *J Chromatogr Sci*. 2008;46:490-5.
183. Ruan L-P, Chen S, Yu B-Y, Zhu D-N, Cordell GA, Qiu SX. Prediction of human absorption of natural compounds by the non-everted rat intestinal sac model. *Eur J Med Chem*. 2006 May;41(5):605-10.

184. Shishu N, Kamalpreet N, Maheshwari M. Development and evaluation of novel microemulsion based oral formulations of 5-fluorouracil using non-everted rat intestine sac model. *Drug Dev Ind Pharm.* 2012 Mar;38(3):294–300.
185. Mucha M, Pawlak A. Thermal analysis of chitosan and its blends. *Thermochim Acta.* 2005 Mar;427(1-2):69–76.
186. Ramya R, Sudha PN, Mahalakshmi DJ. Preparation and characterization of chitosan binary blend. *Int J Scienc Resch Publ.* 2012;2(10).
187. Cheung MK, Wan KPY, Yu PH. Miscibility and morphology of chiral semicrystalline poly-(R)-(3-hydroxybutyrate)/chitosan and poly-(R)-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/chitosan blends studied with DSC, ¹H T₁ and T_{1ρ} CRAMPS. *J Appl Polym Sci.* 2002 Oct 31;86(5):1253–8.
188. González V, Guerrero C, Ortiz U. Chemical structure and compatibility of polyamide–chitin and chitosan blends. *J Appl Polym Sci.* 2000 Oct 24;78(4):850–7.
189. Kittur FS, Harish Prashanth KV, Udaya Sankar K, Tharanathan RN. Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry. *Carbohydr Polym.* 2002 Agosto;49(2):185–93.
190. Mahapatra S, Venugopala KN, Guru Row TN. A Device to Crystallize Organic Solids: Structure of Ciprofloxacin, Midazolam, and Ofloxacin as Targets. *Cryst Growth Des.* 2010 Apr 7;10(4):1866–70.
191. Turel I, Bukovec P. Comparison of the thermal stability of ciprofloxacin and its compounds. *Thermochimica Acta.* 1996;287:311–8.
192. Turel I, Bukovec P, Quirós M. Crystal structure of ciprofloxacin hexahydrate and its characterization. *Int J Pharm.* 1997;152:59–65.
193. Turel I, Golobic A. Crystal structure of ciprofloxacin hydrochloride 1.34-hydrate. *Anal Sci Int J Jpn Soc Anal Chem.* 2003 Feb;19(2):329–30.
194. Dillen K, Vandervoort J, Van den Mooter G, Verheyden L, Ludwig A. Factorial design, physicochemical characterisation and activity of ciprofloxacin-PLGA nanoparticles. *Int J Pharm.* 2004 May;275(1-2):171–87.
195. Turel I, Leban I, Bukovec N. Synthesis, characterization, and crystal structure of a copper (II) complex with quinolone family member (ciprofloxacin): Bis(1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-piperazin-1ylquinoline-3-carboxylate) copper (II) chloride hexahydrate. *J Org Biochem.* 1994;56:273–82.
196. Turel I, Gruber K, Leban I, Bukovec N. Synthesis, Crystal Structure, and Characterization of Three Novel Compounds of the Quinolone Family Member (Norfloxacin). *J Inorg Biochem.* 1996;61:197–212.
197. Tan Z, Tan F, Zhao L, Li J. The Synthesis, Characterization and Application of Ciprofloxacin Complexes and Its Coordination with Copper, Manganese and Zirconium Ions. *J Cryst Process Technol.* 2012;02(02):55–63.

198. Zupančič M, Korošec RC, Bukovec P. The thermal stability of ciprofloxacin complexes with magnesium (II), Zinc (II) and Cobalt (II). *J Therm Anal Calorim.* 2001;63:787–95.
199. Liu Y, Wang J, Yin Q. The crystal habit of ciprofloxacin hydrochloride monohydrate crystal. *J Cryst Growth.* 2005 Mar;276(1-2):237–42.
200. Refat MS, El-Hawary WF, Moussa MAA. IR, ¹H NMR, mass, XRD and TGA/DTA investigations on the ciprofloxacin/iodine charge-transfer complex. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2011 May;78(5):1356–63.
201. Silva-Júnior AA, Scarpa MV, Pestana KC, Mercuri LP, de Matos JR, de Oliveira AG. Thermal analysis of biodegradable microparticles containing ciprofloxacin hydrochloride obtained by spray drying technique. *Thermochim Acta.* 2008 Jan;467(1-2):91–8.
202. Pawlak A, Mucha M. Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends. *Thermochim Acta.* 2003 Feb 5;396(1):153–66.
203. Sakurai K, Maegawa T, Takahashi T. Glass transition temperature of chitosan and miscibility of chitosan/poly(N-vinyl pyrrolidone) blends. *Polymer.* 2000 Sep;41(19):7051–6.
204. Zhu Y. Properties of polymeric drug delivery systems prepared by hot-melt extrusion. 2002 [cited 2015 Feb 23]; Available from: <http://repositories2.lib.utexas.edu/handle/2152/1092>
205. Qiao M, Luo Y, Zhang L, Ma Y, Stephenson TS, Zhu J. Sustained release coating of tablets with Eudragit® RS/RL using a novel electrostatic dry powder coating process. *Int J Pharm.* 2010 Oct 31;399(1–2):37–43.
206. Oth MP, Moës AJ. Sustained release solid dispersions of indomethacin with Eudragit RS and RL. *Int J Pharm.* 1989 Oct 15;55(2–3):157–64.
207. Joshi AS, Patil CC, Shiralashetti SS, Kalyane NV. Design, characterization and evaluation of Eudragit microspheres containing glipizide. *Drug Invent Today.* 2013 Sep;5(3):229–34.
208. Vachon MG, Nairn JG. Physico-chemical evaluation of acetylsalicylic acid-Eudragit RS100 microspheres prepared using a solvent-partition method. *J Microencapsul.* 1995 Jun;12(3):287–305.
209. Ubrich N, Schmidt C, Bodmeier R, Hoffman M, Maincent P. Oral evaluation in rabbits of cyclosporin-loaded Eudragit RS or RL nanoparticles. *Int J Pharm.* 2005 Jan;288(1):169–75.