

2009

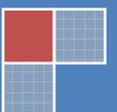
ESTUDIOS DE LIBERACION CONTROLADA DE QUINOLONAS EMPLEANDO BIOPOLIMEROS

Trabajo de Tesis de Licenciatura en
Biotecnología y Biología Molecular

Facultad de Ciencias Exactas
Universidad Nacional de La Plata



German Abel Islan



*El presente trabajo ha
sido realizado en el
Centro de Investigación
y Desarrollo en
Fermentaciones
Industriales y
Biotecnología
(CINDEFI),
CONICET-UNLP*

*bajo la dirección del
Dr. Guillermo R. Castro*

Agradecimientos

- ❖ *A mis padres*, por la educación recibida, su amor y apoyo incondicional
- ❖ *A mi familia*, por mimarme (tías/os, primos/as y abuela)
- ❖ *A Guiye*, por confiar en mi y brindarme tranquilidad, por su enseñanza y su amistad.
- ❖ *A las chicas: Vale, Mari, Yani, Lore y Luciana*, gracias por su apoyo y predisposición para ayudarme, por compartir momentos tan lindos, que hicieron posible nuestra amistad.
- ❖ *A Edgardo Donati*, por abrirme las puertas del CINDEFI.
- ❖ *A la Facultad de Ciencias Exactas*, por todo el conocimiento brindado
- ❖ *A Ro*, por bancarme y darme su cariño
- ❖ *A la banda facultativa (los viejitos)*, por estar siempre
- ❖ *A los tenistas químicos*, por ayudarme a reír y sus concejos
- ❖ *A mis amigos de toda la vida*, que son como hermanos
- ❖ *A Alejandro*, por su ayuda con la Ciprofloxacina
- ❖ *A la gente del CINDEFI*, por compartir charlas de pasillo
- ❖ *Al jurado: Jorge Güida, Flavia Luna y Francisco Sánchez*, por su buena predisposición para la lectura y evaluación de este trabajo

INDICE GENERAL

<u>CAPITULO I: INTRODUCCION</u>	1
1.1. Los biopolímeros como materiales para el desarrollo de productos con aplicaciones farmacéuticas y de uso biomédico.....	2
1.2. Alginato como matriz polimérica.....	3
1.3. Ciprofloxacina.....	6
1.4. Liberación controlada de fármacos.....	9
1.5. Objetivos.....	10
<u>CAPITULO II: MATERIALES Y METODOS</u>	11
2.1. Materiales.....	12
2.2. Procedimiento Experimental.....	12
2.2.1. Curvas de calibración y preparación de soluciones estándar de Ciprofloxacina.....	12
2.2.2. Extracción de Ciprofloxacina de monodiscos.....	13
2.2.3. Preparación de una solución Alginato 2 % conteniendo Ciprofloxacina.....	14
2.2.4. Producción de las microesferas.....	14
2.2.5. Soluciones buffer utilizadas.....	15
2.2.6. Observación macroscópica de las microesferas.....	15
2.2.7. Determinación del grado de hinchamiento de las microesferas...	16
2.2.8. Observación microscópica de las microesferas.....	16
2.2.9. Optimización de las condiciones de encapsulamiento de Ciprofloxacina a diferentes pH.....	17
2.2.10. Maduración de las microesferas.....	17
2.2.11. Ensayos de Liberación de Ciprofloxacina.....	18
2.2.11.1. Efecto del pH en la liberación.....	19
2.2.11.2. Efecto de la fuerza iónica sobre la liberación.....	19

<u>CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSION</u>	20
3.1. Extracción de Ciprofloxacina de Monodiscos.....	21
3.1.1. Extracción con Acetona.....	21
3.1.2. Extracción con Agua Destilada.....	22
3.1.3. Cálculo de la eficiencia de extracción.....	23
3.2. Encapsulación de Ciprofloxacina.....	24
3.2.1. Encapsulación con buffer AcNa/AcH pH=4.0 y pH=5.0.....	24
3.2.2. Encapsulación con buffer MES/NaOH a pH=6.2.....	26
3.2.3. Encapsulación con buffer pH=7.5.....	27
3.2.4. Conclusiones: Encapsulación bajo diferentes condiciones experimentales de pH.....	27
3.2.5. Efecto del calentamiento sobre soluciones buffers conteniendo Ciprofloxacina.....	29
3.2.6. Efecto del pH en la encapsulación.....	29
3.2.7. Elección de las condiciones de encapsulamiento para posteriores ensayos de liberación.....	30
3.3. Obervación macro- y microscópica de las microesferas.....	31
3.3.1. Fotografías de las microesferas.....	31
3.3.2. Grado de hinchamiento de las microesferas.....	32
3.3.3. Microscopía Optica.....	32
3.4. Ensayos de Liberación de Ciprofloxacina.....	35
3.4.1. Liberación en buffer pH=1.20.....	35
3.4.2. Liberación en buffer pH=7.40.....	36
3.4.3. Efecto de la fuerza iónica sobre la liberación.....	38
3.4.3.1. Efecto del agregado de NaCl.....	38
3.4.3.2. Efecto de la fuerza iónica sobre el tiempo de liberación media (T₅₀).....	39

<u>CAPITULO IV: CONCLUSIONES</u>	41
4.1. Conclusiones.....	42
4.2. Perspectivas.....	43
<u>ANEXO</u>	44
A1. Curvas de calibración.....	45
A1.1. Curva de calibración de Cip en agua destilada.....	45
A1.2. Curva de calibración de Cip en buffer AcNa/AcH 200 mM pH=4.00.....	46
A1.3. Curva de calibración de Cip en buffer AcNa/AcH 200 mM pH=5.00.....	47
A1.4. Curva de calibración de Cip en buffer MES/NaOH 100 mM pH=6.20.....	48
A1.5. Curva de calibración de Cip en buffer KCl/HCl 100 mM pH=1.20.....	49
A1.6. Curva de calibración de Cip en buffer Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ 100 mM pH=7.40.....	50
A1.7. Desplazamiento batocrómico del máximo de absorción de la Cip, al disminuir el pH.....	51
A2. Test T para determinación de diferencias significativas entre muestras independientes.....	52
<u>REFERENCIAS</u>	54

INDICE FIGURAS

CAPITULO I: INTRODUCCION

Figura 1: Estructura del Alginato en presencia de iones calcio(II).....	3
Figura 2: Efecto de la concentración del polímero sobre la red del hidrogel.....	4
Figura 3: Mecanismos de liberación de moléculas.....	4
Figura 4: Estructura Ciprofloxacina.....	6
Figura 5: Equilibrios de ionización de la molécula de Ciprofloxacina en solución acuosa.....	7
Figura 6: Sistemas tradicionales de liberación y sistemas de liberación controlada de fármacos.....	9
Figura 7: Trayecto de las microesferas suministradas por vía oral.....	9

CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSION

Figura 8: Barrido Espectral de Absorción de la fracción acetónica.....	21
Figura 9: Espectro de absorción de la ciprofloxacina en agua destilada.....	22
Figura 10: Efecto de la concentración del ión Ca(II) en la encapsulación de Cip a pH=4.0.....	24
Figura 11: Efecto de la encapsulación de Cip en función de la concentración de CaCl ₂ a pH=5.0.....	25
Figura 12: Efecto del pH en el encapsulamiento de Cip.....	29
Figura 13: Fotografía de la distribución de tamaño de las microesferas generadas por la técnica de goteo.....	31
Figura 14: Fotografía de microesferas en dos condiciones: <i>deshidratadas y húmedas</i>	31
Figura 15: Microscopía óptica (100X) de microesferas.....	33
Figura 16: Curva de liberación de ciprofloxacina en buffer pH=1.20.....	35
Figura 17: Cinética de liberación de Cip en buffer fosfato pH=7.40 a distintas concentraciones.....	37
Figura 18: Efecto del aumento de la concentración de buffer	

fosfato pH=7.40 sobre el T ₅₀ de la Cip.....	37
Figura 19: Cinética de liberación de Cip en buffer fosfato (10 mM,pH=7.40) bajo diferentes condiciones de fuerza iónica (NaCl).....	39
Figura 20: Efecto de la fuerza iónica sobre el tiempo en alcanzar una liberación de ciprofloxacina del 50 % (T ₅₀).....	40

ANEXO

Figura 21: Barrido Espectral de Absorción de la Cip en agua destilada.....	45
Figura A1.1: Curva de calibración de Cip en agua destilada.....	45
Figura 22: Barrido Espectral de Absorción de la Cip en Buffer acetato/acético pH=4.00.....	46
Figura A1.2: Curva de calibración de Cip en buffer AcNa/AcH 200 mM pH=4.00.....	46
Figura 23: Barrido Espectral de Absorción de la Cip en Buffer acetato/acético pH=5.00.....	47
Figura A1.3: Curva de calibración de Cip en buffer AcNa/AcH 200 mM pH=5.00.....	47
Figura 24: Barrido Espectral de Absorción de la Cip en Buffer MES/NaOH pH=6.20.....	48
Figura A1.4: Curva de calibración Ciprofloxacina en buffer MES/NaOH 100 mM pH=6.20.....	48
Figura 25: Barrido Espectral de Absorción de la Cip en Buffer KCl/HCl pH=1.20.....	49
Figura A1.5: Curva de calibración Cip en buffer KCl/HCl (“Clark and Lubs”) 100 mM pH=1.20.....	49
Figura 26: Barrido Espectral de Absorción de la Cip en Buffer Fosfato pH=7.40.....	50
Figura A1.6: Curva de calibración Cip en buffer Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ 100 mM pH=7.40.....	50
Figura 27: Máximo de absorción de la Cipro en función del pH.....	51

INDICE TABLAS

CAPITULO I: INTRODUCCION

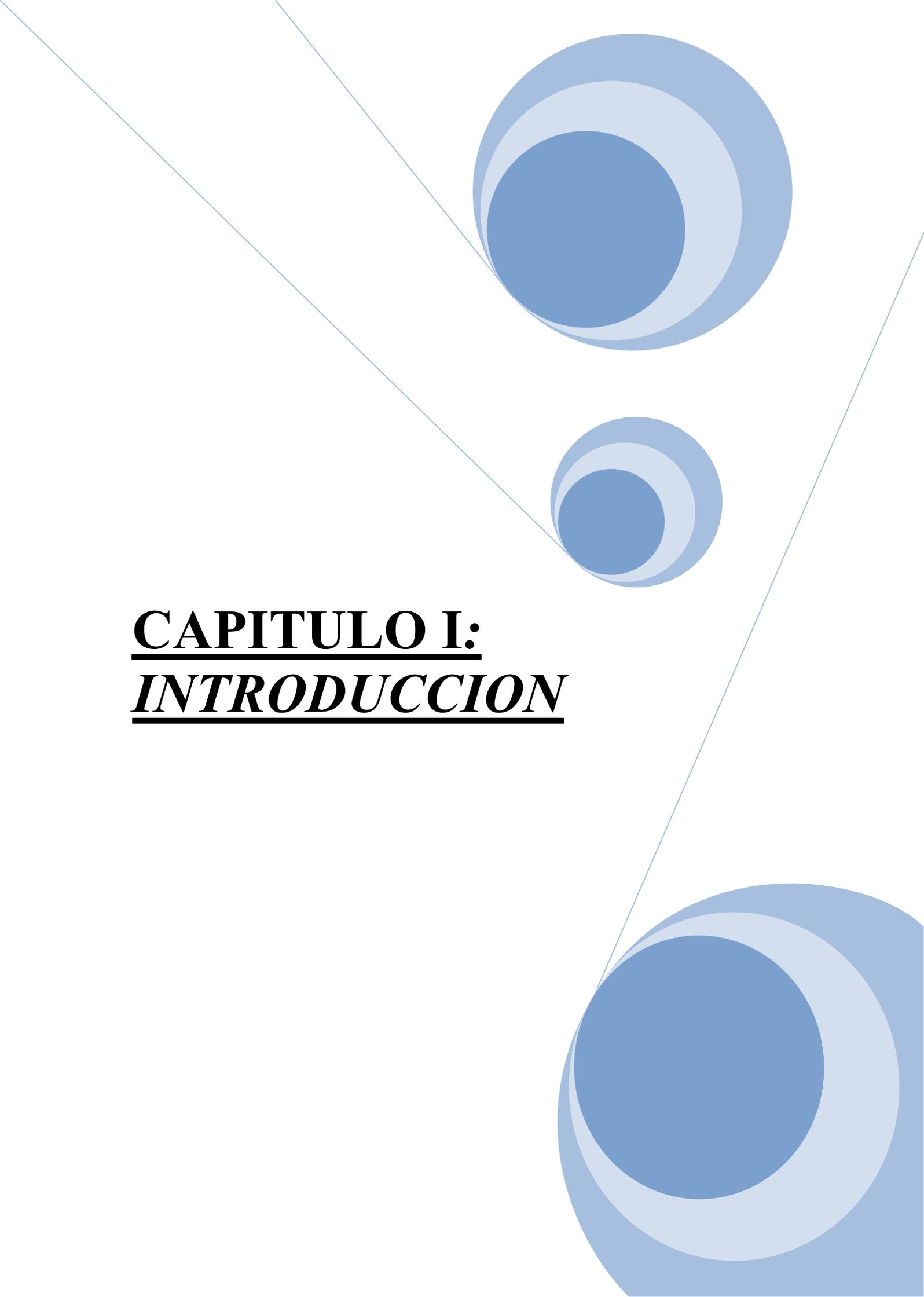
Tabla 1: Características de los polímeros sintetizados químicamente y biopolímeros naturales.....	5
--	---

CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSION

Tabla 2: Porcentaje de encapsulación a pH 4 y 5 en función de la concentración de Ca(II).....	24
Tabla 3: Porcentaje de encapsulamiento a dos concentraciones de Cipro y [Ca(II)]=500 mM.....	26
Tabla 4: Encapsulación bajo diferentes condiciones de pH.....	28
Tabla 5: Efecto del calentamiento sobre la Cip.....	29
Tabla 6: Porcentaje de Encapsulamiento vs pH.....	29
Tabla 7: Valores de pesada de microesferas en diferentes condiciones de hidratación.....	32
Tabla 8: Porcentaje de hinchamiento de microesferas.....	32
Tabla 9: Porcentaje de liberación de Cip a pH=1.20.....	35
Tabla 10: Porcentaje de liberación de Cip a pH=7.40 y diferente concentración de buffer fosfato.....	36
Tabla 11: Cinéticas de liberación de Ciprofloxacina en presencia de diversas concentraciones de NaCl.....	38
Tabla 12: Efecto de la fuerza iónica sobre el T ₅₀ de Cip en buffer fosfato 10 mM (pH= 7.40).....	40

ANEXO

Tabla A1.1: Concentración de Cip vs A_{271}	45
Tabla A1.2: Concentración de Cip vs A_{277}	46
Tabla A1.3: Concentración de Cip vs A_{277}	47
Tabla A1.4: Concentración de Cip vs A_{273}	48
Tabla A1.5: Concentración de Cip vs A_{277}	49
Tabla A1.6: Concentración de Cip vs A_{270}	50
Tabla 13: Efecto batocrómico del λ max de Cip con el pH.....	51
Tabla 14: Cálculo de los valores estadísticos del <i>Test T</i>	52

The background features a decorative graphic consisting of three blue circles of varying sizes, each with a lighter blue ring around its center. These circles are arranged in a vertical line, with the largest at the top and bottom, and a smaller one in the middle. Two thin, light blue lines intersect at the top left, forming a large 'V' shape that frames the central text and circles.

CAPITULO I:
INTRODUCCION

1.1. Los biopolímeros como materiales para el desarrollo de productos con aplicaciones farmacéuticas y de uso biomédico

Los biopolímeros son compuestos sintetizados por organismos vivos, constituidos por unidades repetitivas de moléculas orgánicas unidas por enlaces covalentes.

Desde su inclusión en el campo de la salud humana en el año 1980, las aplicaciones de los biopolímeros constituyen uno de los campos de mayor interés por su utilización en dispositivos terapéuticos cardiovasculares, ortopédicos, oftalmológicos, dentales, sustitutos de la piel, sistemas de liberación controlada de fármacos, y sensores para propósitos de diagnóstico.

El desarrollo y descubrimiento de nuevos biopolímeros, así como las nuevas tecnologías de síntesis, purificación y modificación, han permitido grandes avances en la liberación modificada de principios activos, localización a dianas farmacológicas, sobrepaso de barreras fisiológicas, protección de principios activos frente a condiciones fisiológicas, entre otros.

Algunos polímeros han recibido la denominación de “inteligentes” por su rápida respuesta frente a modificaciones de las condiciones fisicoquímicas ambientales, que involucran cambios pronunciados en sus propiedades. Los estímulos a los que responden los polímeros pueden ser:

- Físicos: como la temperatura, la fuerza iónica, los solventes, radiaciones, campos eléctricos, estrés mecánico, presión, radiaciones sónicas y campos magnéticos;
- Químicos: como el pH, iones específicos y agentes químicos;
- Bioquímicos: como sustratos de enzimas, ligandos afines y otros agentes biológicos.

1.2. Alginato como matriz polimérica

Los alginatos son biopolímeros lineales compuestos de ácido β -manurónico (unidades M) y ácido α -gulurónico (unidades G) unidos por enlaces 1-4.

El alginato puede ser obtenido de algas y algunas especies microbianas, y su importancia tecnológica radica en su capacidad para formar hidrogeles. Ha sido utilizado exitosamente para numerosas aplicaciones en salud humana, incluyendo implantes de tejido, inmovilización de células. Además, muchos productos comerciales conteniendo alginatos de tipo ultrapuro son frecuentemente usados como excipientes en la industria farmacéutica (Dornish *et al.*, 2001).

El alginato como hidrogel, posee la capacidad de absorber grandes cantidades de agua y, en presencia de iones multivalentes (e.g. calcio, zinc y otros) constituye una red polimérica, proceso que se denomina *gelación iónica*. En el caso del alginato, la red polimérica está compuesta de moléculas lineales conectadas entre sí por interacciones iónicas dando lugar a entrecruzamientos denominados comúnmente “caja de huevos” (*egg shell*) (**Fig. 1**)

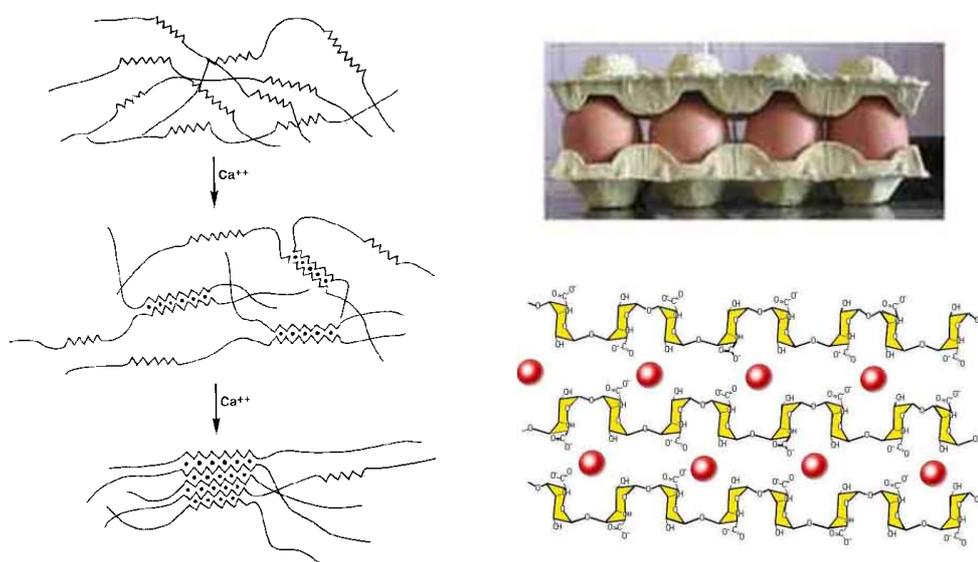


Figura 1: En ausencia de iones divalentes (e.g. calcio), el alginato se pliega formando, cada uno de los bloques constituyentes, hélices mantenidas por puentes de hidrógeno. En presencia de calcio, el alginato puede formar una estructura conocida como "caja de huevos". En esta estructura, los iones de calcio se sitúan como puentes entre los grupos con carga negativa del ácido gulurónico.

El grado de entrecruzamiento del gel de alginato está determinado por el cation multivalente, por la composición y la concentración del polímero. A bajas concentraciones del polímero la red se debilita, mientras que a altas concentraciones la reticulación es mayor (**Fig. 2**)



Figura 2: Efecto de la concentración del polímero sobre la red del hidrogel.
Izquierda: baja concentración.
Derecha: alta concentración
(Neeves K, *Student`s*

Existen dos maneras en que un fármaco inmerso en un gel pueda ser liberado de un polímero, a saber:

1. Mediante un mecanismo difusional a través de la matriz y hacia el medio de externo a la matriz sin que se altere la estructura del gel.
2. Mediante un mecanismo de degradación de la red polimérica debido a la presencia de enzimas, agua, concentraciones de ácido/base, sales, fuerza iónica; acoplado este con un mecanismo de difusión (**Fig. 3**).

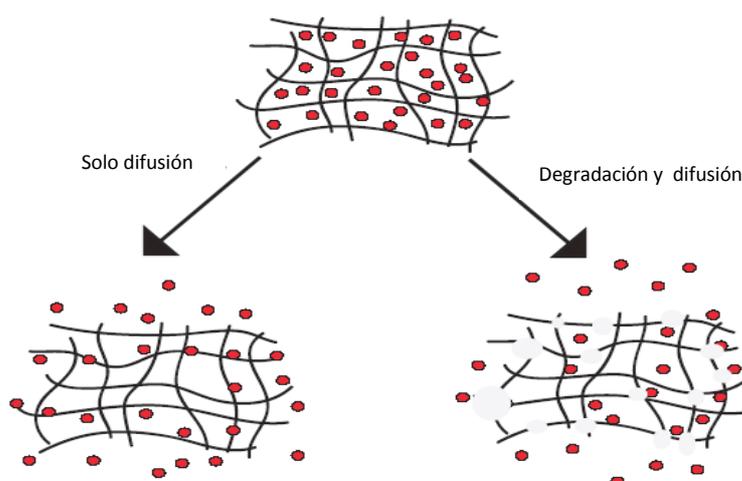


Figura 3: Mecanismos de liberación de moléculas.(Neeves K, *Student`s Guide*)

Algunos sistemas de liberación controlada de moléculas han sido diseñados para que no puedan ser degradados en condiciones fisiológicas, y que la liberación sólo sea controlada por un mecanismo difusional. Sin embargo, estos sistemas pueden presentar dificultades y ciertos grados toxicidad al momento de eliminar del organismo la matriz, efectos que son indeseables. Los sistemas biodegradables poseen la ventaja de ser degradados en condiciones fisiológicas por el organismo, lo cual es una de las ventajas principales de los geles constituidos por alginato. De manera general podemos destacar las principales propiedades de los geles de alginato:

- **Biocompatibilidad**
- **Biodegradabilidad**
- **No Inmunogénico**
- **Ausencia de toxicidad**

Además, son de destacar sus propiedades fisicoquímicas, como su estructura porosa y la rápida disolución a pH intestinal (área donde son asimilados la mayor parte de los antibióticos), y relativa estabilidad a bajos pH (estomacal).

Entre las ventajas de los sistemas de liberación controlada basados en biopolímeros y en relación con polímeros sintetizados químicamente se pueden enumerar (**Tabla 1**):

Propiedades	Polímeros de síntesis química	Biopolímeros
Medio de síntesis	acuoso	orgánico
Catálisis	inorgánica (tóxica)	biocatálisis (no tóxica)
Síntesis	inespecífica	específica (centro quiral)
Parámetros ambientales de síntesis	extremas	suaves
Producto estereo específico	bajo	alto
Peso molecular promedio	variable	rango restringido
Actividad biológica	inespecífica	altamente específica
Escalado	extremadamente costoso	costoso
Purificación	muy costoso	costoso
Productos de la biodegradación	pueden ser tóxicos	biocompatible

Tabla1: Características de los polímeros sintetizados químicamente (izq) y biopolímeros naturales (der)

De esta forma, el atractivo de los polímeros naturales radica principalmente en su fácil disponibilidad, su bajo costo, su maneabilidad (capacidad para realizarle numerosas modificaciones) y su potencial degradabilidad y compatibilidad dado su origen.

1.3. Ciprofloxacina (Cip)

Se denomina Ciprofloxacina (Cip) al ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-quinolin-3-carboxílico (**Fig. 4**) el cual pertenece a la familia de las *quinolonas*. La unidad central estructural es un anillo quinolónico con un átomo de fluor en la posición 6, un grupo piperazina en la posición 7, un anillo ciclopropilo en la posición 1 y un grupo carboxilo en la posición 3.

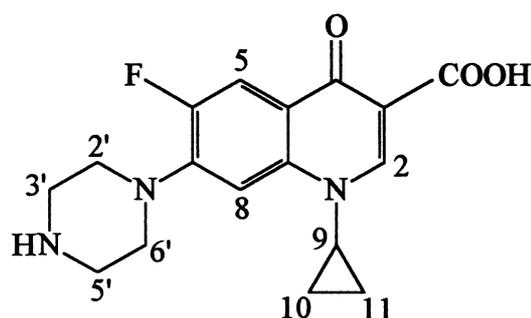


Figura 4: Estructura Ciprofloxacina

La molécula de Cip posee características anfotéricas debido a la presencia de los grupos carboxilo y amino (nitrógeno 4'), cuyos valores de pK, son 6.0, y 8.8 respectivamente y su punto isoeléctrico a pH=7.4. Es bien sabido, que mediante el sistema C3 y C4 de la molécula, la Cip es capaz de formar complejos con ciertos cationes multivalentes (Eboka and Okeri, 2005), de acuerdo al grado de ionización y a la prevalencia de ciertas variantes químicas de la misma, presentes en la solución acuosa. (**Fig. 5**)

La Cip un antibiótico de amplio espectro, empleado tanto contra bacterias Gram(+) y como Gram(-), incluyendo patógenos entéricos, *Pseudomonas* y *Serratia marcescens*. Es un bacteriostático: su modo de acción se basa en bloquear la replicación bacteriana por unión a la *topoisomerasa II* (también conocida como *ADN girasa*), la cual es necesaria para separar el ADN replicado.

Es frecuentemente utilizada para tratar infecciones del tracto urinario, infecciones osteoarticulares, ginecológicas, respiratorias, de oído medio, sinusitis, de tejidos blandos, vías urinarias, de los órganos genitales, fiebre tifoidea, shigellosis y cualquier proceso infeccioso bacteriano producido por gérmenes sensibles. A su vez, tiene un potencial uso para la prevención enfermedades peligrosas que se hayan dispersado en forma intencional, como la peste bubónica, la tularemia y el ántrax de la piel o la boca.

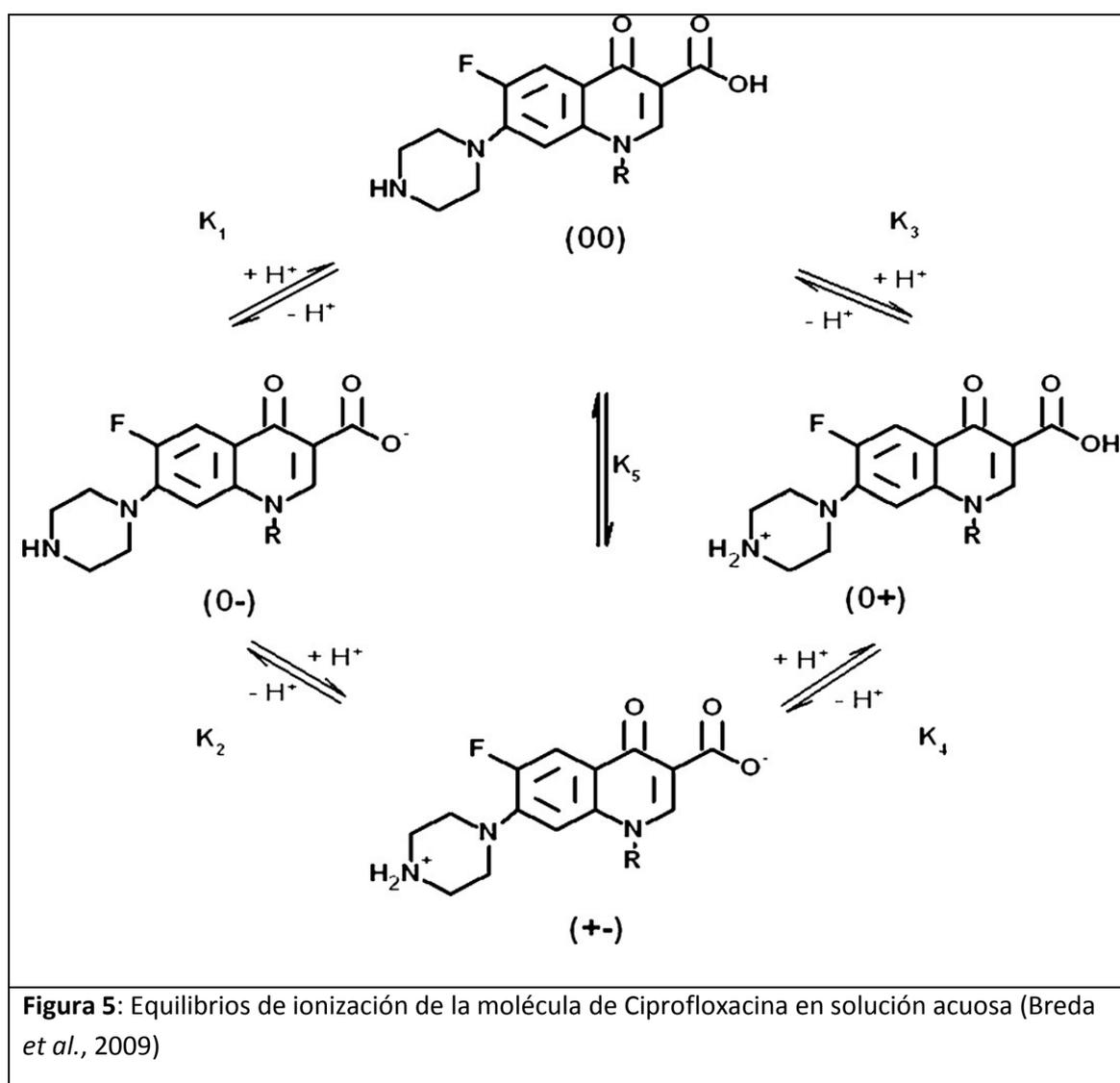


Figura 5: Equilibrios de ionización de la molécula de Ciprofloxacina en solución acuosa (Breda *et al.*, 2009)

El estudio de la encapsulación de Ciprofloxacina en microesferas resulta interesante por dos motivos:

- Su ingestión oral (por vía directa, sin el recubrimiento de una matriz polimérica) genera irritación gastrointestinal (Alós, 2009) y una baja biodisponibilidad, debido a que se degrada a pH ácido y a que es metabolizada en gran parte en el tracto gastrointestinal (Zhao *et al.*, 2009).
- La tendencia de la molécula a agregarse y formar apilamientos entre sí en solución acuosa (Maurer *et al.*, 1998). Este hecho genera problemas de solubilidad y de biodisponibilidad.

Ambos problemas planteados no han sido resueltos a la fecha, lo que ha limitado la aplicación del antibiótico para el tratamiento de infecciones bacterianas.

La gran demanda por el uso de la Ciprofloxacina como método para prevenir el ántrax, principalmente en EE.UU. a partir del año 2001, ha llevado a las grandes farmacéuticas productoras de medicamentos genéricos a establecer debates acerca de las patentes vigentes sobre el uso de la Cip (cuya propietaria es Bayer), ante la necesidad de atender una demanda de alrededor de 50 a 60 millones de píldoras por mes, solo en EE.UU. (Diane West (2001), *Generic cipro waits in the wings*. Drug Store News, Nov 19).

1.4. Liberación controlada de fármacos

La liberación controlada de fármacos es una nueva modalidad para tratar patologías de diverso tipo y características. El término de liberación controlada se refiere a la capacidad de un sistema de administrar una droga durante un período prolongado de tiempo a una tasa controlada, ofreciendo una atractiva alternativa para conseguir niveles constantes de fármaco en el organismo, y a su vez reduciendo los posibles efectos tóxicos del mismo (Fig 6). En los últimos 20 años, se ha vuelto más popular la investigación en este campo como una forma de tratar enfermedades tales como el cáncer y la diabetes.

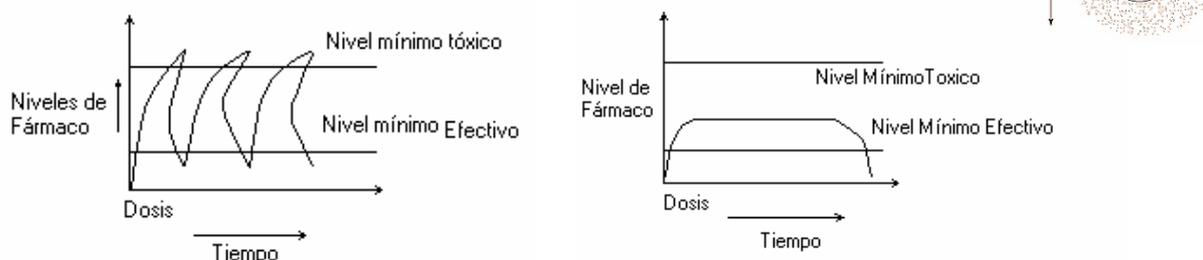
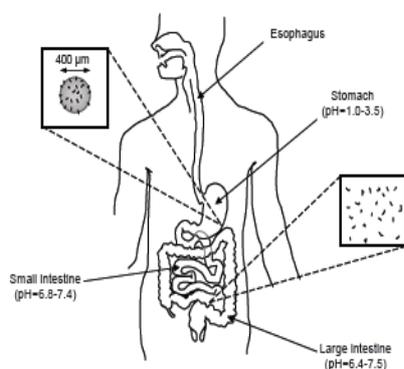


Figura 6: Sistemas tradicionales de liberación (figura izquierda) y sistemas de liberación controlada de fármacos (figura derecha) (Escobar *et al.*, 2002)

La liberación controlada por vía oral es una forma atractiva de administración de fármacos, dadas sus evidentes ventajas:



- Blanco específico
- Matriz biocompatible
- Ausencia de efectos secundarios
- Dosis terapéutica
- Cinética de liberación establecida

Figura 7: Trayecto de las microesferas suministradas por vía oral (Castro y col., 2007).

1.5. Objetivos:

El objetivo del presente trabajo es estudiar el encapsulamiento de ciprofloxacina en matrices de alginato y su liberación empleando diversas condiciones experimentales.

En particular:

1) Estudiar las condiciones ambientales de encapsulamiento de ciprofloxacina, a través de la modificación de los principales efectores: pH y calcio(II).

2) Caracterización morfológica de las microesferas de alginato conteniendo la ciprofloxacina.

3) Estudiar las características de liberación controlada de ciprofloxacina en las siguientes condiciones experimentales, a saber:

- pH estomacal (1.2) y pH intestinal (7.4)
- temperatura (30 °C)
- fuerza iónica (10 a 200 mM NaCl)

The background features a decorative graphic consisting of three blue circles of varying sizes, each with a lighter blue inner ring. These circles are arranged vertically on the right side of the page. Two thin, light blue lines intersect at the top left and extend diagonally across the page, framing the central text.

CAPITULO II:
MATERIALES Y
METODOS

- **2.1. Materiales:**

Fueron utilizados los siguientes reactivos: Ciprofloxacina (Cip) de alta pureza (grado USP, aproximadamente 98 % Sigma, Mo, EE.UU.), alginato de sodio (grado industrial, *Monsanto*, EE.UU.), cloruro de calcio dihidratado, ácido acético glacial, acetato de sodio anhidro, Tris sódico, fosfato monobásico de sodio dihidratado, fosfato dibásico de sodio heptahidratado, el cloruro de sodio y el cloruro de potasio utilizados fueron provistos por *Anedra (Buenos Aires, Argentina)*. El ácido clorhídrico, acetona e hidróxido de sodio (lentejas pro análisis) fueron adquiridos a *Cicarelli (Buenos Aires, Argentina)*. Las soluciones reguladoras de MES y el HEPES fueron adquiridas a *Sigma (Mo, EE.UU.)*.

Además fueron utilizados monodiscos ciprofloxacina (vial de 50 discos para antibiograma) provistos por *Laboratorios Britania S.A. (Buenos Aires, Argentina)*.

- **2.2. Procedimiento Experimental:**

2.2.1. Curvas de calibración y preparación de soluciones estándar de ciprofloxacina

Se preparó una solución patrón de Cip en un buffer seleccionado para determinar la relación entre absorbancia y concentración.

Para el caso de soluciones buffer en las cuales Cip no presentó problemas de solubilidad se partió de una solución patrón de 10.0 mg/ml de ciprofloxacina y a partir de la misma fueron realizadas diluciones sucesivas hasta llegar a una concentración de 1.0 µg/ml. Previamente fue realizado un barrido espectral de las soluciones a baja concentración del antibiótico (típicamente 5.0 µg/ml) para determinar su longitud de onda de máxima absorción de la ciprofloxacina patrón en el buffer. Posteriormente, se procedió a la medición de la absorbancia (a la long de onda max) de las distintas muestras. Se analizó el intervalo de linealidad de las mismas y se calculó el coeficiente de correlación (r) para determinar el ajuste a la regresión lineal.

En el caso de pHs en los cuales se observaron dificultades de solubilidad para Cip (tal como ocurrió con Cip en buffer MES/NaOH pH=6.2 o en buffer Fosfato pH=7.4) para la realización de la curva de calibración se partió de una solución patrón de Cip de 100.0 µg/ml. Debido a las dificultades para la solubilización de la misma se procedió a calentar la solución durante 5 minutos a 65 °C. En razón de ello, se realizó un control sobre el efecto de la temperatura, a fin de ver la influencia del calentamiento sobre los grupos cromóforos de la molécula de la ciprofloxacina. Para lo cual, se partió de dos soluciones patrones de 100 µg/ml de cipro en agua destilada: a una de ellas se le aplicó el tratamiento térmico, mientras que la otra fue conservada a temperatura ambiente. A ambas muestras, se les determinó la absorbancia a 271 nm (máximo de absorción de Cip en agua destilada), luego de realizada una dilución 1/10, y se evaluó el efecto del calentamiento.

2.2.2. Extracción de Ciprofloxacina de Monodiscos:

Se utilizaron 150 monodiscos (3 viales) conteniendo 5 µg de ciprofloxacina cada uno. Los mismos fueron colocados en un tubo de 50 ml, y le fueron agregados 20 ml de acetona pura. La extracción se realizó bajo agitación constante a 50 rpm a temperatura ambiente por 12 horas.

Los monodiscos fueron separados de la solución de acetona y secados a temperatura ambiente. A la fracción de acetona se le realizó un barrido espectral a fin de detectar la presencia de Cip a longitudes de onda (λ_{\max}) en el rango 271-277 nm en un espectrofotómetro UV-Vis *Beckman DU640* (Patel *et al.*, 2006).

En una segunda etapa de extracción se empleó agua destilada, teniendo en cuenta que la solubilidad de Cip es mayor en solventes polares (Varanda *et al.*, 2006). Se lo dejó 12 horas con agitación (50 rpm) a temperatura ambiente (25°C) en un volumen final de 13.5 ml. Transcurrido el lapso de incubación, se procedió a filtrar el solvente a fin de eliminar los restos de celulosa. A continuación, se realizó un barrido espectral a fin de evidenciar la presencia de Cip en la solución mediante diluciones apropiadas hasta alcanzar el intervalo de linealidad de absorbancia (271-277 nm). (Patel *et al.*, 2006).

La eficiencia de la extracción (EE%) fue calculada empleando la siguiente fórmula:

$$EE\% = \frac{Q_{cip} * (1/F) * 13.5 \text{ ml}}{(5 \mu\text{g/monodisco}) * Q_m} * 100$$

Donde:

Q_{cip} = concentración de Cip experimental en la muestra, obtenida a partir de la medida de la absorbancia de la misma mediante la curva de calibración “concentración de Cip vs. absorbancia”(ver Anexo A1.1.)

F = factor de dilución de la solución empleada para extracción

Q_m = cantidad de monodiscos

2.2.3. Preparación de una solución alginato 2 % conteniendo ciprofloxacina:

Se pesó una cantidad requerida de alginato de sodio y se lo disolvió en una solución acuosa de pH regulado (buffer), a la que previamente se le había adicionado solución patrón de Cip, de forma tal que la concentración final de la misma fuera de 36.0 $\mu\text{g/ml}$. La suspensión resultante fue dejada 12 horas con agitación magnética (Magnetic Stirrer Tianjin Taisite Instrument Co.,Ltd) a 500 rpm a temperatura ambiente hasta disolución total.

2.2.4. Producción de microesferas

Se gotearon 2 ml de una solución de alginato/Cip, sobre 10 ml de una solución conteniendo cloruro de calcio (100 a 750 mM) preparada en el correspondiente buffer, en un lapso de 20 minutos, y con agitación suave (100 rpm) en baño de hielo (0 °C). Las

microesferas formadas fueron filtradas utilizando una placa filtrante de porcelana. Al filtrado se le determinó el volumen y el valor de absorbancia a la longitud de onda a la cual se halla el máximo de absorción de la ciprofloxacina al respectivo pH (el cual varia en el rango de 270 a 277 nm). Mediante una curva de calibración fue posible establecer la relación entre absorbancia y concentración de Cip. De esta manera, fue posible determinar la cantidad de antibiótico remanente que no había sido encapsulado y se determinó el porcentaje de encapsulación:

$$\%Enc = \frac{Q_0 - (C_r * v)}{Q_0} * 100$$

Donde:

Q_0 = Cantidad inicial de Cip= 36.0 $\mu\text{g/ml}$ * 2 ml = 72.0 μg

C_r = Concentración de Cip remanente en la solución filtrada

V = Volumen de la solución filtrada = aprox. 10 ml

2.2.5. Soluciones buffer utilizadas

Se realizó la encapsulación de la ciprofloxacina a diferentes pH:

- pH= 4.0-5.0: buffer acetato/ácido acético 200 mM.
- pH= 6.2: buffer MES-NaOH 100 mM
- pH= 7.5: Tris-HCl 100 mM o buffer HEPES-NaOH 100 mM

2.2.6. Observación macroscópica de las microesferas

Se observó la homogeneidad y distribución de tamaño de las microesferas obtenidas por la técnica de goteo. Se tomaron fotos de las mismas con cámara digital (Nikon Coolpix S560) en dos condiciones experimentales: hidratadas y deshidratadas.

2.2.7. Determinación del grado de hinchamiento de las microesferas

Las microesferas fueron secadas 5 minutos a temperatura ambiente, sobre papel de celulosa limpio (Whatman nº 1) y pesadas en balanza analítica (Adventurer OHAUS).

Posteriormente fueron secadas a temperatura ambiente durante dos horas, bajo una leve aireación, y vueltas a pesar.

Finalmente fueron rehidratadas en agua destilada 15 minutos, y secadas 5 minutos a temperatura ambiente, para su pesada definitiva.

El grado de hinchamiento (dado por la capacidad de absorber agua en los intersticios de las microesferas) se determinó de la siguiente manera:

- $(M_h - M_s)/M_h * 100$ reflejaría el grado de deshinchamiento (deshidratación)
- $(M_r - M_s)/M_s * 100$ reflejaría el grado de rehinchamiento (rehidratación)

Donde:

M_h =Peso microesferas húmedas

M_s =Peso microesferas deshidratadas (secas)

M_r =Peso microesferas rehidratadas

2.2.8 Observación microscópica de las microesferas

Se preparó una muestra de microesferas sobre un portaobjeto y se procedió a la observación de las características morfológicas de las mismas en un Microscopio Óptico (Leica DM 2500) a una resolución de 100X. Las mismas fueron observadas en sus diferentes condiciones: húmedas (nativas), deshidratadas y re-hidratadas.

2.2.9. Optimización de las condiciones de encapsulamiento de Cip a diferentes pH

Se estudió la formación de microesferas ajustando el pH de la solución de dropeo (mezcla alginato/Cip) en el buffer seleccionado, y goteando la misma sobre una solución 500 mM de cloruro de calcio preparada en el mismo buffer o bien, con otro de diferente pH.

Las combinaciones utilizadas se detallan a continuación:

Solución de goteo (alginato 2%/Cip)	Solución de 500 mM CaCl ₂ en
buffer AcNa/AcH 200 mM pH=4.0	AcNa/AcH 200 mM pH=4.0
buffer AcNa/AcH 200 mM pH=5.0	AcNa/AcH 200 mM pH=5.0
agua destilada (Cip 36 µg/ml)	Tris/HCl 100 mM pH=7.5
agua destilada (Cip 100 µg/ml)	Tris/HCl 100 mM pH=7.5
buffer MES/NaOH 100 mM pH=6.2 (Cip 36 µg/ml)	MES/NaOH 100 mM pH=6.2
buffer MES/NaOH 100 mM pH=6.2 (Cip 100 µg/ml)	MES/NaOH 100 mM pH=6.2
buffer MES/NaOH 100 mM pH=7 (Cip 100 µg/ml)	MES/NaOH 100 mM pH=6.2
buffer MES/NaOH 100 mM pH=7 (Cip 100 µg/ml)	AcNa/AcH 200 mM pH=5.0

2.2.10. Maduración de las microesferas

Las microesferas obtenidas fueron filtradas y lavadas con agua destilada, a fin de remover el exceso de antibiótico adsorbido. Posteriormente se procedió a su maduración, colocándolas 2 minutos en una solución de cloruro de calcio 500 mM. Nuevamente fueron lavadas con agua destilada (para remover el exceso de cloruro de calcio) y filtradas, para ser secadas a temperatura ambiente sobre papel de celulosa limpio (Whatman n° 1) durante 5 minutos.

2.2.11. Ensayos de liberación de Ciprofloxacina

Se pesaron 400.0 mg de microesferas maduras y húmedas en balanza analítica (Adventurer OHAUS) de alta precisión (0.1 mg) y fueron colocadas en un recipiente de 5 ml de capacidad, con el agregado de 2.0 mililitros de solución buffer, momento a partir del cual se comienza a cronometrar el tiempo de liberación. La muestra fue incubada en estufa a 30 °C con una agitación de 100 rpm. A determinados intervalos de tiempo se tomó una muestra de 1.0 ml de la fase líquida y se reemplazó el mismo volumen con medio fresco. La solución buffer utilizada para la liberación, así como los recipientes conteniendo las microesferas fueron previamente termostatizados a 30 °C. A la fracción extraída se le determinó la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción de la ciprofloxacina en el buffer indicado. En los casos necesarios se procedió a centrifugar la muestra a fin de obtener un sobrenadante límpido, libre de microesferas o restos de polímero que pudieran interferir con la determinación espectrofotométrica.

Se realizaron controles, a fin de cuantificar la cantidad de Cip encapsulada en cada ensayo. Para ello se pesaron 100.0 mg de microesferas y fueron puestas en contacto con 2.0 ml de una solución de buffer fosfato 100 mM, bajo agitación constante de 500 rpm durante una hora. La muestra fue centrifugada en microcentrífuga (10.000xg – 10 minutos), y se determinó la absorbancia del sobrenadante a 270 nm. Si la muestra presentase opalescencia, se procedió a colocarla en freezer por 12 horas (a fin de disminuir la solubilidad de las sustancias interfirientes), descongelarla, agitarla y centrifugarla nuevamente, analizando el sobrenadante como se mencionara previamente.

Utilizando las respectivas curvas de calibración de concentración de Cip vs absorbancia y, conociendo la cantidad de Cip liberada en función del tiempo con respecto a la Cip total encapsulada (controles), fue posible establecer las cinéticas de liberación del antibiótico en las diferentes condiciones estudiadas.

2.2.11.1. Efecto del pH en la liberación

Las cinéticas de liberación de Cip se estudiaron en las siguientes condiciones experimentales:

- Solución buffer Clark and Lubs (KCl/HCl) 100 mM, pH=1.20. Cuyo pH es similar al encontrado en el estómago.
- Solución buffer $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH=7.40 en el rango de concentraciones de 10 mM a 100 mM. El cual semejaría el pH fisiológico de la primera porción del intestino delgado, donde la Cip es principalmente absorbida.

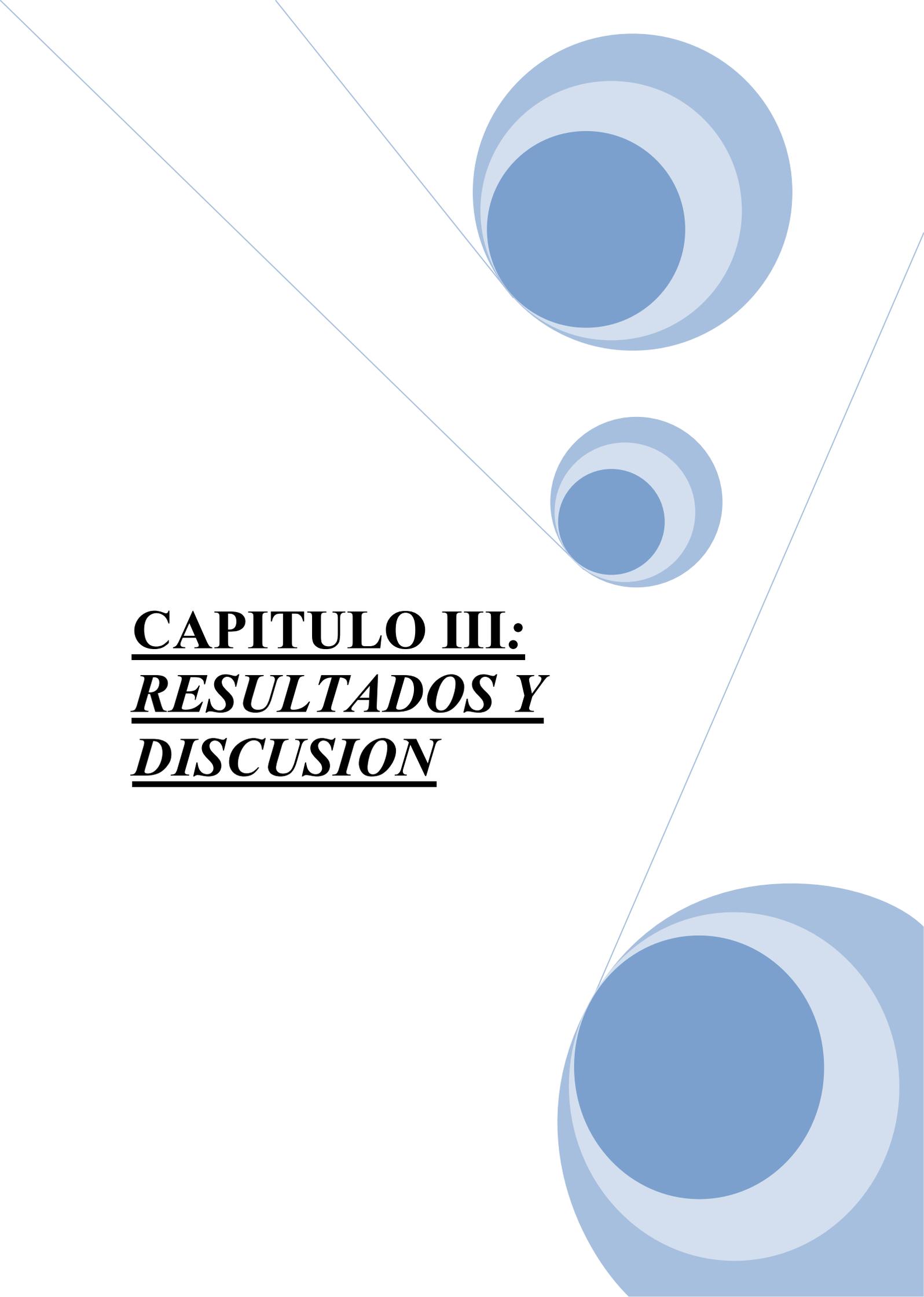
2.2.11.2. Efecto de la fuerza iónica sobre la liberación

Se utilizaron diversas soluciones de NaCl en buffer fosfato 10 mM, a saber:

- Sin agregado de NaCl
- 50 mM NaCl
- 100 mM NaCl
- 200 mM NaCl

Se determinó el porcentaje de liberación de la Cip siguiendo el protocolo anteriormente mencionado.

Con el objeto de establecer la fuerza iónica de las diferentes soluciones utilizadas se determinó la conductividad y se las relacionó linealmente con su respectiva fuerza iónica (utilizando una solución patrón de KCl 10 mM, cuya conductividad fue de 1.413 miliS/cm). A partir de ello se evaluó el efecto de las mismas sobre el T_{50} (tiempo al que se produce un 50 % de liberación de la Cip inicialmente encapsulada)

The page features a decorative graphic on the right side consisting of three blue circles of varying sizes, each with a lighter blue ring around its center. Two thin blue lines intersect at the top right, forming a large triangle that frames the circles. The text is positioned on the left side of the page.

CAPITULO III:
RESULTADOS Y
DISCUSION

3.1 Extracción de Ciprofloxacina de Monodiscos

3.1.1. Extracción con Acetona

La primera extracción de los monodiscos se realizó con acetona (99,5 %) con la finalidad de extraer las impurezas de menor polaridad. Para ello, los 150 monodiscos fueron puestos en contacto con 20 ml de acetona a temperatura ambiente.

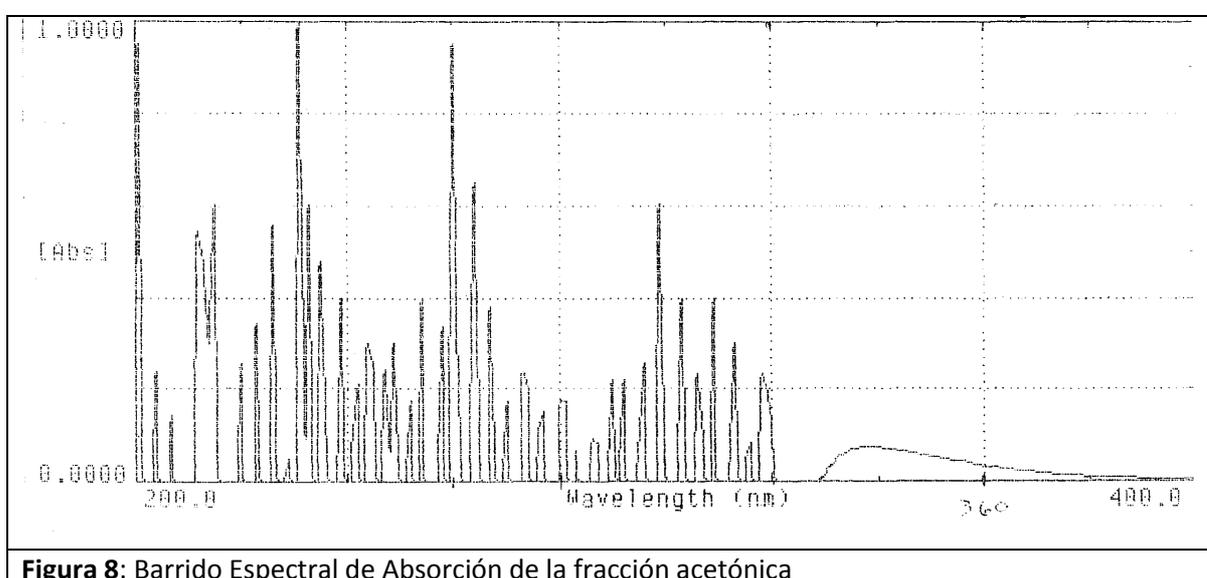


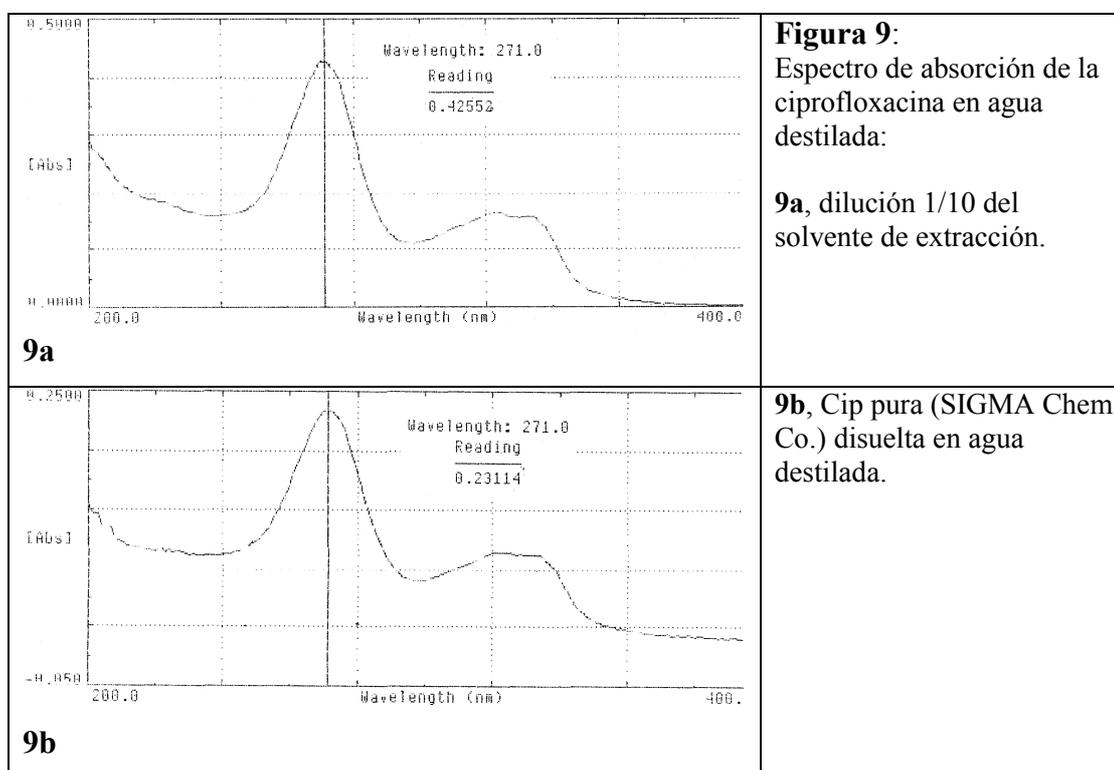
Figura 8: Barrido Espectral de Absorción de la fracción acetónica

En la figura 8, no fue observado el máximo de absorbancia característico de la Cip, que debía observarse en el rango de 270 a 277 nm. Por otro lado, se detectaron otros máximos, correspondientes a impurezas presentes en los monodiscos conteniendo el antibiótico.

3.1.2. Extracción con Agua destilada

En una segunda extracción, realizada con agua destilada pudo observarse luego de una dilución 1/10 del solvente la presencia de la ciprofloxacina en la solución con elevada pureza (**Fig.9a**).

Los barridos espectrales de la Cip pura comercial (Sigma Chem. Co.) y de la muestra extraída de los monodiscos muestran el máximo de absorbanza característico de la Cip a una longitud de onda de 271 nm (**Fig. 9a y b**). (Patel *et al.*,2006).



A su vez, no fue observada la presencia de otros compuestos en el barrido espectral, lo cual indicaría que las posibles impurezas en los monodiscos no se encuentran presentes o su concentración es muy baja y por lo tanto no detectable espectrofotométricamente en nuestras condiciones experimentales.

3.1.3. Cálculo de la eficiencia de extracción

Teniendo en cuenta que a 271 nm se obtuvo una absorbancia de 0.426 y usando una curva de calibración (ver curva de calibración en agua destilada en Anexo A1.1.), se pudo determinar que la concentración de ciprofloxacina en la muestra diluída es 4.4 µg/ml. Esto ha permitido evaluar la eficiencia de extracción de la siguiente manera:

- Cantidad extraída (CE):

CE= Conc medida * (1/factor de dilución) * volúmen de solvente

$$= 4.4 \mu\text{g/ml} * 10 * 13.5 \text{ ml} = 594 \mu\text{g}$$

- Cantidad de Cip teórico en los monodiscos (CET):

CET= Cantidad Cip en monodisco * número de monodiscos

$$= 5.0 \mu\text{g} * 150 = 750 \mu\text{g}$$

$$\text{Eficiencia de extracción} = \text{CE/CET} = 594/750 * 100 =$$

$$79.2 \%$$

3.2. Encapsulación de Ciprofloxacina

Fue estudiada la encapsulación de Cip empleando concentraciones variables de cloruro de calcio a diferentes pHs, a saber:

3.2.1. Encapsulación con buffer AcNa/AcH pH= 4.0 y pH= 5.0

Tabla 2: Porcentaje de encapsulación a pH 4 y 5 en función de la concentración de Ca(II)

[CaCl ₂] (mM)	Encapsulación (%)	
	pH= 4.0	pH= 5.0
100	42.0 ± 0.6	44.8 ± 0.9
250	45.3 ± 3.1	42.1 ± 2.0
500	46,4 ± 1.7	42.9 ± 2.9
750	46,8 ± 2.5	42.1 ± 1.8

Nota: el error fue estimado mediante el cálculo de la desviación estándar sobre un total de 3 experimentos

En la **Tabla 2** se observa que a pH= 4.0, se produce un aumento del porcentaje de encapsulación proporcional al incremento de la concentración de cloruro de calcio sobre la que se goteó la solución de alginato/Cip hasta alcanzar 500 mM. A mayores concentraciones de ion divalente se alcanzó una saturación demostrado a través de un *plateau* indicando la saturación de los grupos carboxilato del guluronato, responsable del entrecruzamiento iónico en las condiciones experimentales del ensayo (**Fig. 10**).

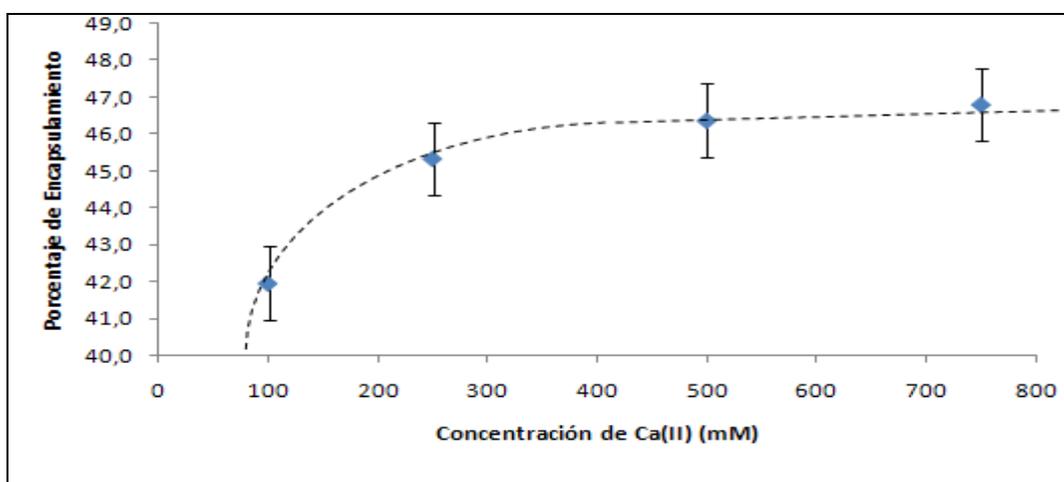
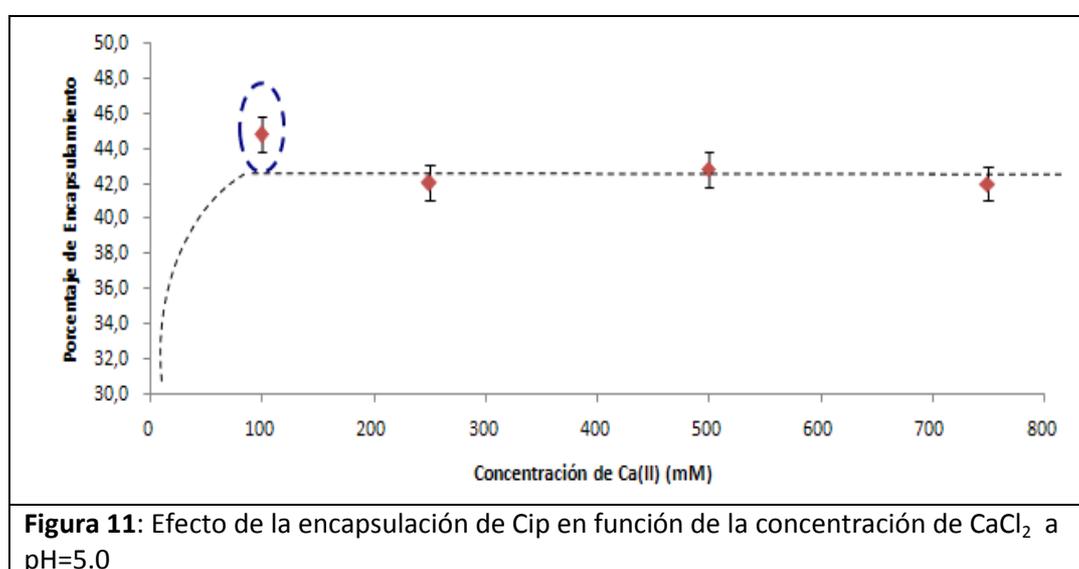


Figura 10: Efecto de la concentración del ión Ca(II) en la encapsulación de Cip a pH=4.0

A pH 5.0 se ha observado un porcentaje de encapsulamiento casi constante al incrementar la concentración de cloruro de calcio de 250 a 750 mM. Si bien las diferencias no fueron significativas entre dichos valores, si lo fue para 100 mM de CaCl_2 ; y fue demostrado mediante un *Test T* para la hipótesis: diferencias significativas entre porcentajes de encapsulamiento (Véase Anexo 2). Esto indicó un porcentaje de encapsulamiento de Cip inversamente proporcional al incremento de la concentración de cloruro de calcio de 100 a 250 mM (Fig. 11).



El comportamiento de encapsulación de la Cip a pH=5.0 podría deberse a una mayor disponibilidad de grupos carboxilato de la Cip respecto de pH=4.0, incrementando las formas de la molécula con carga negativa neta (ver Fig.5, Capítulo I), que dada su carga, puedan interaccionar con el ión calcio (II) y favorecer procesos de agregación o apilamiento entre propias moléculas de ciprofloxacina (Maurer y col., 1998). De esta manera la Cip se excluye de la matriz del gel disminuyendo el encapsulamiento.

3.2.2. Encapsulación con buffer MES/NaOH a pH= 6.2

Tabla 3: Porcentaje de encapsulamiento a dos concentraciones de Cip y [Ca(II)]500 mM

[CaCl ₂] (mM)	[Cip] (µg/ml)	Encapsulamiento (%)
500	36	32.8 ± 0.6
	100	31.2 ± 1.4

Nota: el error fue estimado mediante el cálculo de la desviación estándar sobre un total de 2 experimentos.

Al preparar una solución estándar de Cip (10.00 mg/ml) en buffer MES/NaOH (pH= 6.2) se observó la aparición de un precipitado. Por ende, se procedió a la preparación de la mezcla de goteo (alginato/Cip) mediante el agregado de la ciprofloxacina en polvo a un volumen de buffer tal que la concentración sea inferior a 100 µg/ml, límite de solubilidad de Cip en las condiciones experimentales de trabajo (Varanda *et al.*, 2006). Se trabajó por lo tanto, con una concentración de 36 µg/ml, y se obtuvo un porcentaje de encapsulamiento de 33 % en las condiciones experimentales mencionadas.

A fin de incrementar la concentración del antibiótico en el proceso de encapsulación, se trabajó con 100 µg/ml de muestra (valor cercano al límite de solubilidad), no observándose diferencias significativas con respecto al ensayo anterior (ver **Tabla 3**).

Si bien el pKa del grupo carboxilo de la molécula de ciprofloxacina es 6.09 y considerando que el pH de trabajo fue de 6.20, se podría esperar que el grupo carboxilato pudiese interaccionar con el ión Ca(II) en la red matricial. Sin embargo, los resultados experimentales no permitieron soportar esta hipótesis, por el contrario no se incrementó el porcentaje de Cip encapsulada mediante esta técnica (**Tabla 3**). La posible explicación para este tipo de resultados se puede atribuir a procesos de agregación y “apilamiento” de la molécula de Cip (Maurer *et al.*, 1998), los cuales podrían prevalecer en las condiciones experimentales estudiadas disminuyendo su encapsulamiento en la matriz de alginato.

3.2.3. Encapsulación con buffer pH= 7.5

No fue realizada por dos motivos principales:

- La ciprofloxacina (10.00 mg/ml) precipitó cuando se la preparo en buffer Tris/HCl y HEPES/NaOH a pHs cercanos a 7.5.
- Los geles de alginato tienden a ser inestables a pH alcalino, con lo cual su estructura tridimensional se modifica y pierde su capacidad de encapsular eficientemente.

El primer caso se aplicó en los siguientes ensayos a fin de precipitar la Cip en el interior de las microesferas generadas y de esa forma poder aumentar el porcentaje de encapsulación.

3.2.4. Conclusiones: Encapsulación bajo diferentes condiciones experimentales de pH

Considerando que la Cip es una molécula anfifílica con un pKa para el grupo carboxílico de 6.09, y 8.74 para el grupo amino del anillo piperazínico, el punto isoelectrico del zwitterion es 7.4 (Troniainen y cols., 1996) se procedió a desarrollar diferentes experimentos considerando como variables los pH de disolución de la Cip y los de encapsulado.

Los resultados de la combinación del preparado de la solución de goteo (alginato + ciprofloxacina) en buffer, y el posterior goteo de la misma sobre una solución 500 mM de CaCl₂ preparada en un buffer similar u otro a diferente pH, los cuales son detallados en la **Tabla 4**:

Tabla 4: Encapsulación bajo diferentes condiciones de pH

Solución de goteo (alg/Cip)	[CaCl ₂] (500 mM) en buffer	Encaps. (%)
Buffer AcNa/AcH 200 mM pH=4.0		46
Buffer AcNa/AcH 200 mM pH=5.0		43
Agua destilada pH=5.9 (Cip 36 µg/ml)	Tris/HCl 100 mM pH=7.5	40
Agua destilada pH=5.9 (Cip 100 µg/ml)		33
Buffer MES/NaOH 100 mM pH=6.2 (Cip 36 µg/ml)	MES/NaOH 100 mM pH=6.2	33
Buffer MES/NaOH 100 mM pH=6.2 (Cip 100 µg/ml)		31
Buffer MES/NaOH 100 mM pH=7.0 (Cip 100 µg/ml)		28
	AcNa/AcH 200 mM pH=5.0	35

Tal como se evidencia en la **Tabla 4**, el aumento de la concentración de Cip (36.0 y 100.0 µg/ml) en agua destilada (pH=5.9) se realizó con la finalidad de producir un acercamiento al valor de solubilidad máxima (Breda *et al.*, 2009) a fin de precipitar el antibiótico una vez goteado sobre el buffer Tris/HCl. No obstante, no fue observado experimentalmente, sino que el aumento de la cantidad de ciprofloxacina produjo una interferencia en el proceso de polimerización de alginato en presencia de Ca(II), con lo cual el porcentaje de encapsulación disminuyó. Un hecho similar fue observado a pH 6.2, y aun con menor porcentaje de encapsulamiento de Cip en relación a la realizada con agua destilada (pH=5.9).

En las dos últimas experiencias se buscó llevar el pH del buffer cercano a 7.0, a fin de ionizar el grupo carboxilo de la ciprofloxacina a carboxilato, y que el mismo pueda interactuar con el complejo calcio-alginato. No obstante, el resultado mostró un porcentaje de encapsulación cercano al 35 %, inferior al observado en otras experiencias.

3.2.5. Efecto del calentamiento sobre soluciones buffers conteniendo ciprofloxacina (100 µg/ml).

Tabla 5: Efecto del calentamiento sobre la Cip

Ciprofloxacina (100 µg/ml)	A ₂₇₁ (dilucion 1/10)
Temperatura ambiente (26 °C)	1,097
Calentada 5' a 65 °C	1,018

Tal como se muestra en la **Tabla 5**, no se observó efecto significativo del calentamiento sobre los grupos cromóforos de la ciprofloxacina, lo cual permitiría especular que la estructura de la molécula no fue afectada con el calentamiento.

3.2.6. Efecto del pH en la encapsulación

De los resultados anteriores, se pudo observar la tendencia del porcentaje de encapsulamiento al modificar el pH al cual se realiza, que indicó que a medida que se aumentó el pH, disminuyó el porcentaje de encapsulamiento, tal como se refleja en la **Tabla 6** y la **Figura 12**.

Tabla 6: %Encapsulam vs pH

pH	Encapsulam* (%)
4.0	46,4 ± 1.7
5.0	42,9 ± 2.9
6.2	32,8 ± 0.6

*[CaCl₂] = 500 mM

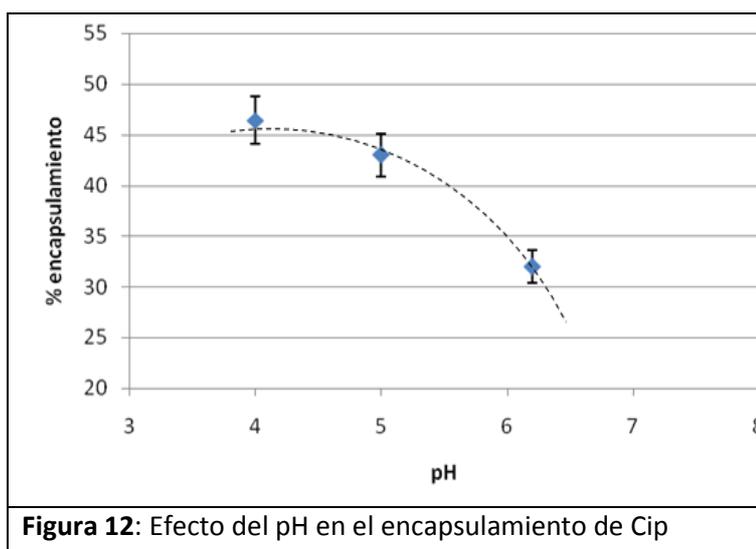


Figura 12: Efecto del pH en el encapsulamiento de Cip

Los resultados obtenidos sustentan la hipótesis que el aumento del pH conlleva a un aumento de los procesos de agregación entre las moléculas de Cip, disminuyendo así su integración en la matriz polimérica.

De acuerdo con la **Tabla 4**, el encapsulamiento de la Cip aumentaría al pasar de pH=6.2 a pH=7.5 (33 % a 40 % respectivamente). Dicha variación podría deberse al acercamiento de la molécula de Cip a su punto isoeléctrico (a pH=7.4), y a la menor solubilidad de la misma a dicho pH, lo cual por un lado, minimizaría los procesos de agregación, y por otro, disminuiría la difusión de la Cip hacia fuera de la matriz de alginato.

3.2.7. Elección de las condiciones de encapsulamiento para posteriores ensayos de liberación

Finalmente, y en base a todos los resultados anteriores, se optó por elegir la encapsulación en buffer AcNa/AcH pH=4.0 (y una concentración de cloruro de calcio de 500 mM) para la generación de microesferas, a ser utilizadas en los posteriores ensayos de liberación. Este hecho se sustentó por un lado, a la mayor estabilidad de la estructura del gel de la matriz (Castro y col., 2008), y por otro, debido a que la ciprofloxacina presenta una mayor estabilidad, dada principalmente por la resistencia a la fotodegradación, a dicho pH (Torniainen *et al.*, 1996) y en dicho buffer (Casanovas Soler *et al.*, 2008).

A su vez, se obtuvo el mayor porcentaje de encapsulamiento de Cip en geles de alginato-calcio, respecto al reportado en otras publicaciones, que fue del 3 % (Dochibhotla and Robinson, 2001).

3.3. Observación macro- y microscópica de las microesferas

3.3.1. Fotografías de las microesferas

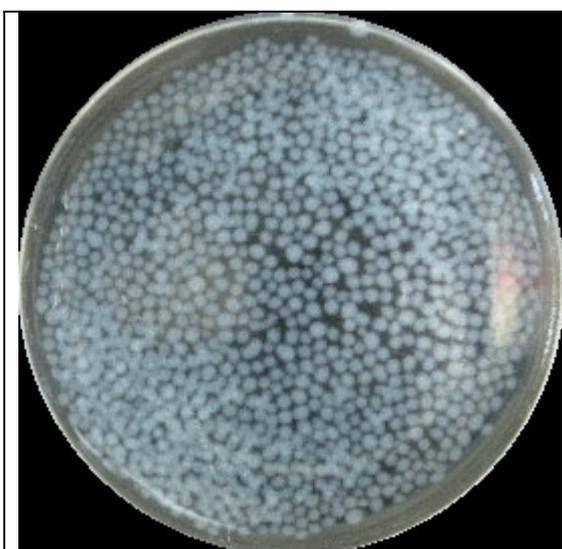


Figura 13: Fotografía de la distribución de tamaño de las microesferas generadas por la

Las fotografías revelaron una distribución relativamente homogénea del tamaño de las microesferas formadas por la técnica de goteo (**Fig. 13**)

A su vez, se observó la diferencia de tamaño de las mismas en sus condiciones de húmedas (nativas) y deshidratadas, demostrando el efecto de deshidratación (deshinchamiento) por pérdida de agua durante el proceso de secado (**Fig. 14**).

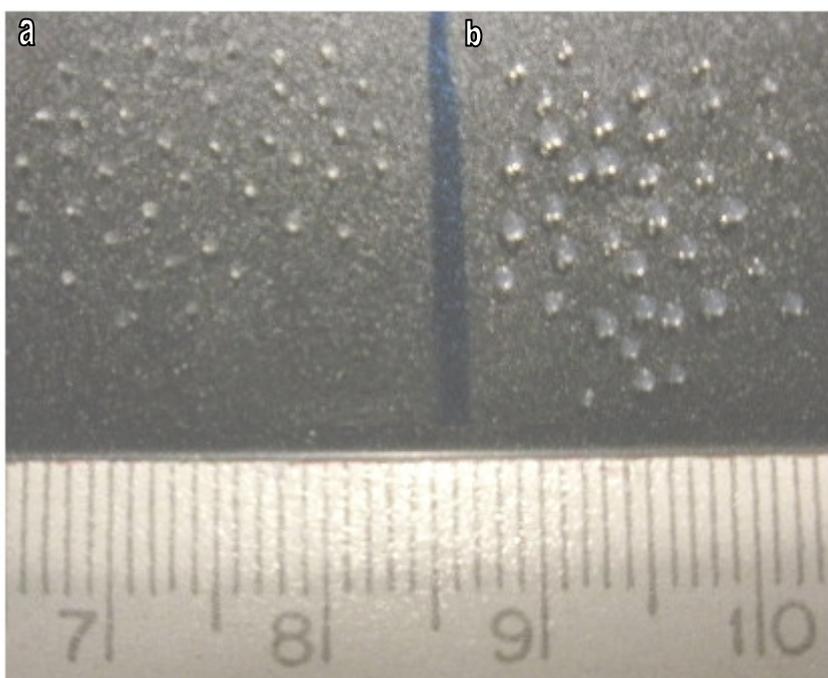


Figura 14: Fotografía de microesferas en dos condiciones: a, deshidratadas y b, húmedas.

3.3.2 Grado de hinchamiento de las microesferas

Tabla 7: Valores de pesada de microesferas en diferentes condiciones de hidratación

Peso de las microesferas (g)		
Húmedas (Mh)	Deshidratadas (Ms)	Re-hidratadas (Mr)
0.63	0.09	0.10

De los datos de la **Tabla 7**, se pudo determinar el grado de hinchamiento:

Tabla 8: Porcentaje de hinchamiento de microesferas

Grado de	Porcentage (%)
Deshinchamiento	85.8
Re-hinchamiento	8.5

El análisis de los resultados obtenidos (**Tabla 8**), refleja la capacidad del alginato como matriz polimérica de contener grandes cantidades de agua. Las diferencias entre los grados de hinchamiento obtenidos, pueden deberse en principio al tiempo de procesado de la muestra, pero también a cambios específicos en la estructura de las microesferas y de los sitios ocupados por el agua, que se podrían ver modificados de manera irreversible en los procesos de deshidratación.

3.3.3. Microscopía Óptica

La observación por microscopía óptica de las microesferas obtenidas mediante la técnica de goteo (nativas o húmedas) permitió observar morfologías relativamente esféricas, con superficies regulares, que no parecían presentar grandes porosidades (**Fig. 15 a y b**) y un tamaño promedio cercano a 600 μm .

La comparación de las mismas, en diferentes condiciones (deshidratadas o re-hidratadas) reveló una marcada disminución del tamaño al ser deshidratadas (**Fig. 15-c y d**), alcanzando aproximadamente los 200 μm .

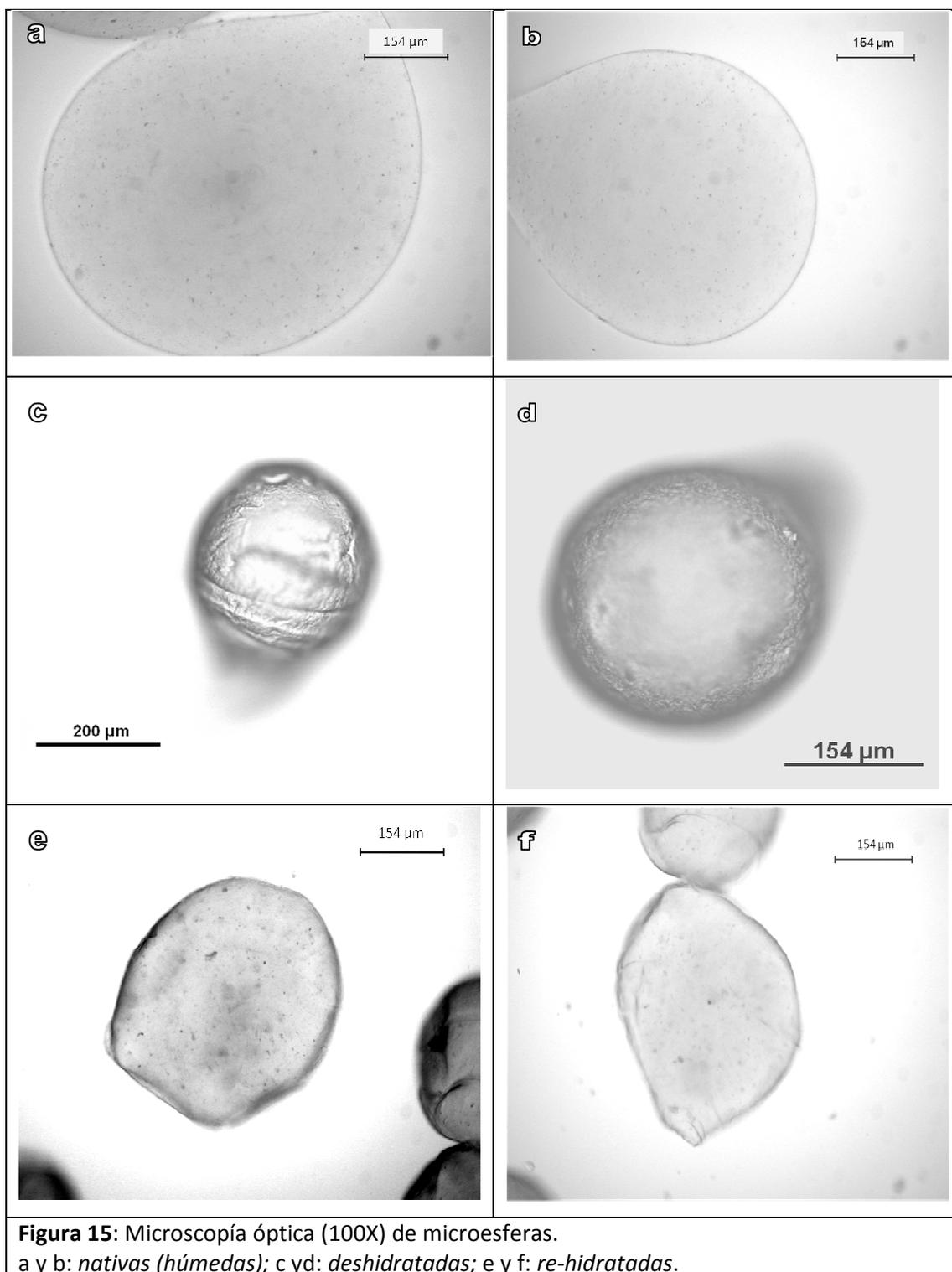


Figura 15: Microscopía óptica (100X) de microesferas.
a y b: *nativas (húmedas)*; c y d: *deshidratadas*; e y f: *re-hidratadas*.

Además se pudo observar un leve aumento del tamaño (hinchamiento) de las microesferas al ser re-hidratadas nuevamente, en el rango de los 300 μm , acompañada por cambios en la morfología, tal como puede verse en las fotos (**Fig. 15 e y f**), que vislumbran bordes mas irregulares y una apariencia de tipo cristalina.

Dichos cambios morfológicos pudieron deberse al escaso tiempo de maduración que tuvieron las microesferas, lo cual implicó la presencia de núcleos laxos, con escasa solidez como para amortiguar los cambios en la hidratación y/o cambio irreversibles de la estructura ante la necesidad de reemplazar los puentes hidrógeno del agua.

A su vez, fue dejada en evidencia nuevamente la capacidad del biopolímero de alginato de absorber cantidades significativas de agua, tal como se observan en los ensayos de hinchamiento de las microesferas.

3.4 Ensayos de liberación de Ciprofloxacina

3.4.1. Liberación en Buffer pH= 1.20

Tabla 9: Porcentaje de liberación de Cip a pH=1.20

Tiempo (min)	Liberación (%)
0	0,0 ± 0,0
10	37,3 ± 4,2
30	52,6 ± 4,1
45	59,2 ± 3,8
60	63,8 ± 2,7
90	67,9 ± 2,8
120	71,6 ± 2,9
180	75,3 ± 3,4

Nota; Los resultados mostrados representan la media aritmética de un experimento realizado por duplicado. El error experimental fue determinado mediante el cálculo de la desviación estándar (σ).

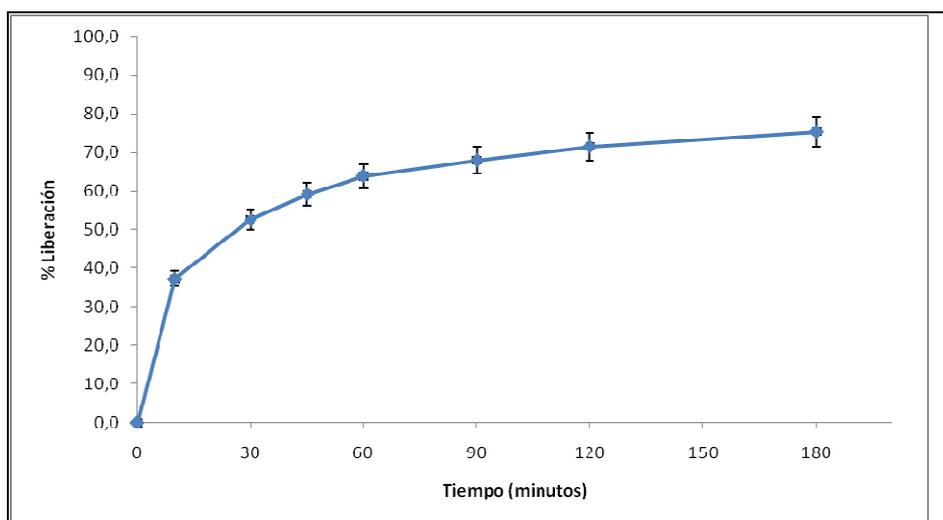


Figura 16: Curva de liberación de ciprofloxacina en buffer pH=1.20

En la **Figura 16** se ha observado una típica curva de liberación de Ciprofloxacina de características hiperbólicas. En la misma se pueden diferenciar dos etapas: una rápida de liberación de la Cip hacia el medio circundante sin degradación observable de las microesferas. Este hecho, sugiere que el proceso de liberación es controlado mayoritariamente por mecanismos difusionales, y alcanza aproximadamente hasta los 30 minutos con una liberación aproximada del 40 % de la Cip. A continuación se comienza a observar un proceso de degradación de las microesferas asociado a un

cambio de viscosidad del medio, por lo que el mecanismo de liberación de Cip comenzaría a ser gobernado por mecanismos mixtos de erosión y difusión, el cual alcanza en un lapso de 3 horas aproximadamente el 80 % de liberación del contenido de Ciprofloxacina encapsulado en las microesferas.

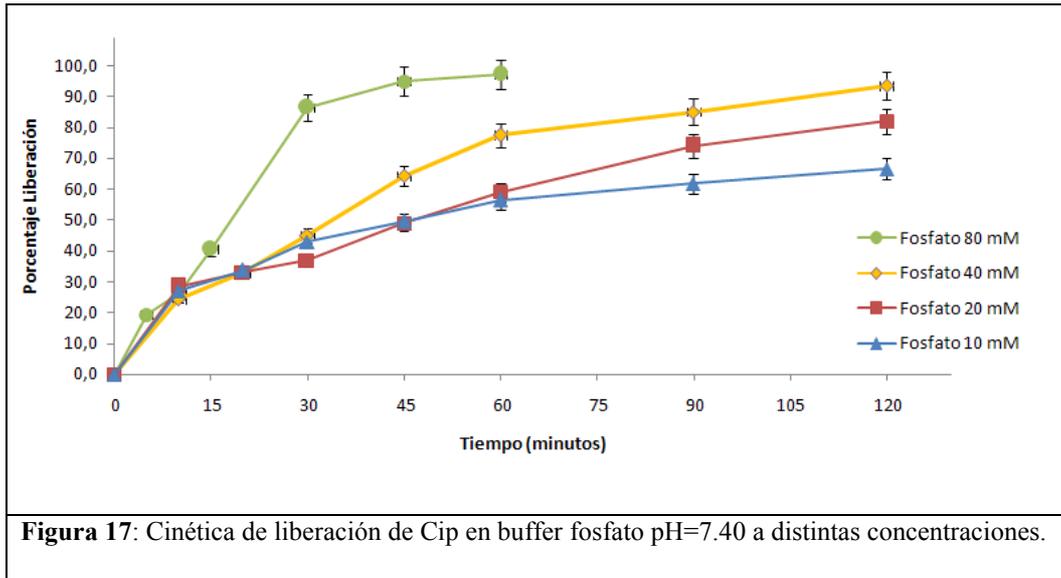
3.4.2. Liberación en Buffer pH= 7.40

Tabla 10: Porcentaje de liberación de Cip a pH=7.40 y diferente concentración de buffer fosfato

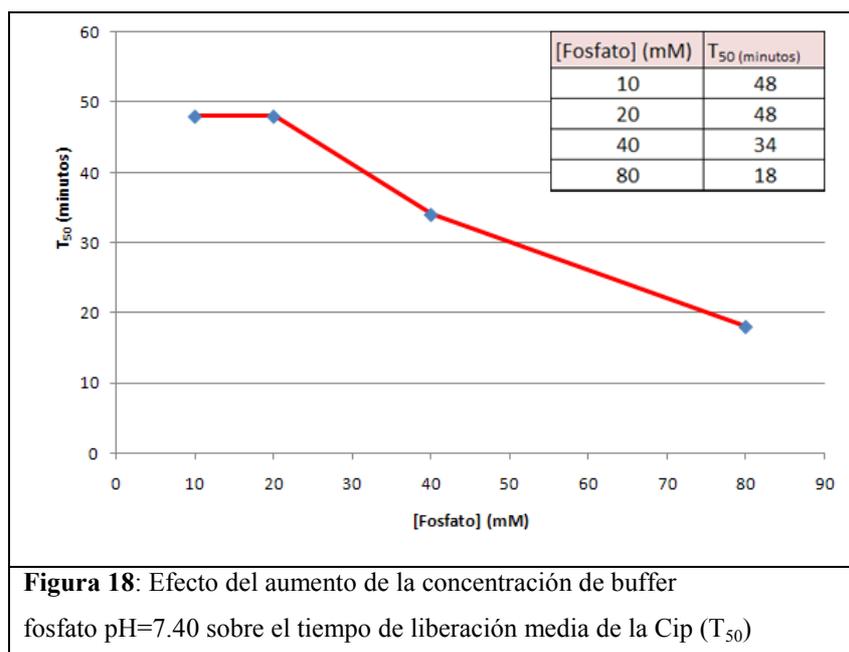
Tiempo (minutos)	Porcentaje de liberación en buffer fosfato a diferentes concentraciones (mM)			
	10	20	40	80
0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
5	-	-	-	19,4 ± 0,4
10	26,9 ± 0,1	28,4 ± 5,6	24,3 ± 2,1	26,1 ± 3,6
15	-	-	-	40,5 ± 6,7
20	33,6 ± 0,6	33,1 ± 6,9	32,9 ± 3,2	-
30	42,9 ± 1,0	36,8 ± 7,0	44,9 ± 7,0	86,5 ± 10,3
45	49,5 ± 2,1	48,9 ± 5,2	64,3 ± 15,1	95,0 ± 0,8
60	56,3 ± 2,8	59,1 ± 3,9	77,5 ± 6,1	97,2 ± 2,3
90	61,7 ± 3,2	74,0 ± 4,3	85,1 ± 6,4	-
120	66,6 ± 3,0	82,0 ± 2,8	93,5 ± 6,9	-
1440	85,8 ± 7,3	111,3 ± 17,7	102,1 ± 1,9	-

Los resultados mostrados representan la media aritmética de 1 experimento realizado por duplicado. El error experimental fue determinado mediante el cálculo de la desviación estándar (σ).

Como se puede observar en la Figura 17, el porcentaje de liberación de la Cip en buffer fosfato a pH=7.40 se incrementó de manera concomitante con la concentración del mismo. Así, en aproximadamente 60 minutos para buffer fosfato 80 mM se produjo la liberación total de la Cip, mientras que para buffer fosfato 10 y 20 mM las curvas alcanzaron a dicho tiempo una liberación cercana al 60 % de la Cip encapsulada. Esto se corroboró al analizar el efecto del aumento de la concentración de fosfato sobre el tiempo de liberación media de la Cip (T_{50}) (**Fig. 18**)



En estos ensayos se produjo un proceso de liberación que implicó mecanismos combinados: difusionales y de degradación de la matriz. Como fuera mencionado anteriormente, se observó la degradación de las microesferas de alginato en contacto con el buffer fosfato. Esto se debió a la propiedad del fosfato de actuar como quelante de iones Calcio, los cuales actúan de agente de entrecruzamiento entre las moléculas de alginato, afectando de dicha forma la estabilidad de las microesferas formadas. Se debe mencionar que la elevada interacción del ión calcio con fosfato esta favorecida por la constante de formación de la sal de fosfato de calcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$): 2.07×10^{-33} (ref: anónimo).



3.4.3. Efecto de la fuerza iónica sobre la liberación

3.4.3.1 Efecto del agregado de NaCl

Tabla 11: Cinéticas de liberación de Ciprofloxacina en presencia de diversas concentraciones de NaCl.

Tiempo (min)	Liberación de Ciprofloxacina (%) a diferentes concentraciones de NaCl (mM)		
	50	100	200
0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
10	35,2 ± 0,3	40,7 ± 1,6	46,5 ± 3,8
30	51,5 ± 1,1	58,5 ± 3,1	63,4 ± 4,6
45	58,3 ± 1,1	66,7 ± 5,3	72,4 ± 4,2
60	63,4 ± 0,4	72,9 ± 6,5	79,7 ± 4,9
90	72,7 ± 0,8	78,8 ± 7,2	87,4 ± 5,3
120	81,5 ± 2,0	82,7 ± 6,6	92,8 ± 5,7
1440	97,6 ± 0,3	99,1 ± 9,4	103,4 ± 6,8

Los resultados mostrados representan la media aritmética de 1 experimento realizado por duplicado. El error experimental fue determinado mediante el cálculo de la desviación estándar (σ)

La **Tabla 11** expresa los valores de porcentaje de liberación de Cip en buffer fosfato 10 mM en función del tiempo con el incremento la fuerza iónica del medio mediante el agregado de diversas concentraciones de cloruro de sodio. Estos resultados expresados en las curvas de liberación de la **Figura 19**, evidencian que a medida que se incrementó la fuerza iónica, el porcentaje de liberación fue mayor.

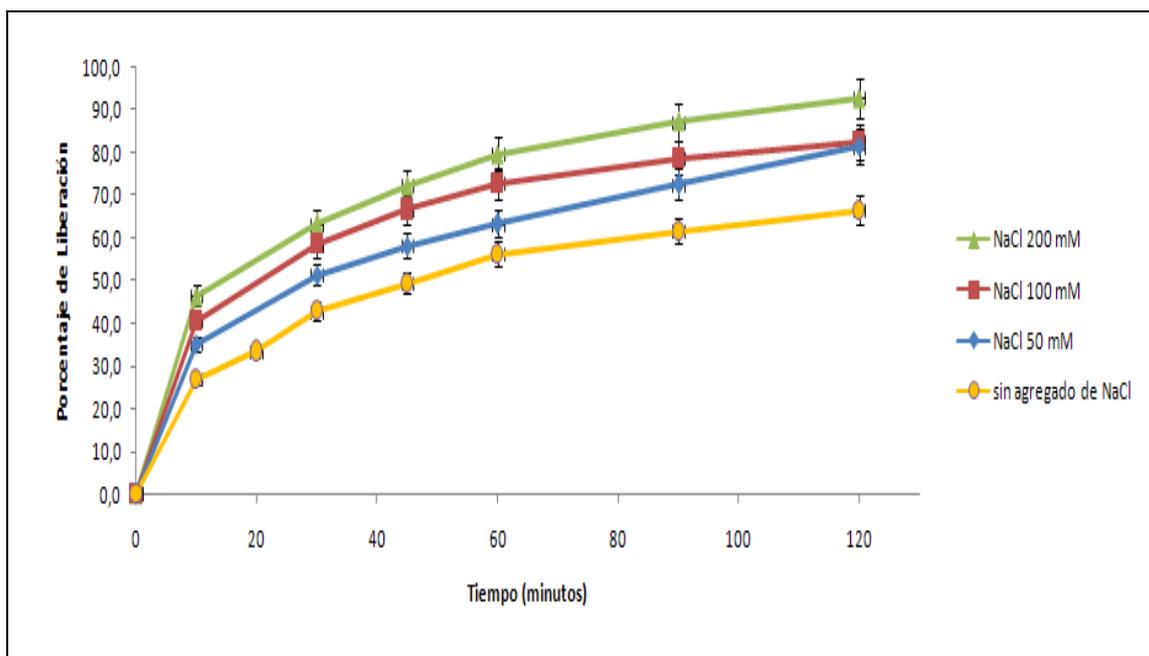


Figura 19: Cinética de liberación de ciprofloxacina en buffer fosfato (10 mM, pH=7.40), bajo diferentes condiciones de fuerza iónica (NaCl).

Ello fue debido a la competencia de los cationes Na(I) con los iones Ca(II) presentes en las microesferas de alginato polimerizado, lo cual tuvo una influencia directa sobre la estabilidad de las mismas, y por ende, sobre la capacidad de liberación del sistema.

3.4.3.2 Efecto de la fuerza iónica sobre el tiempo de liberación media (T_{50})

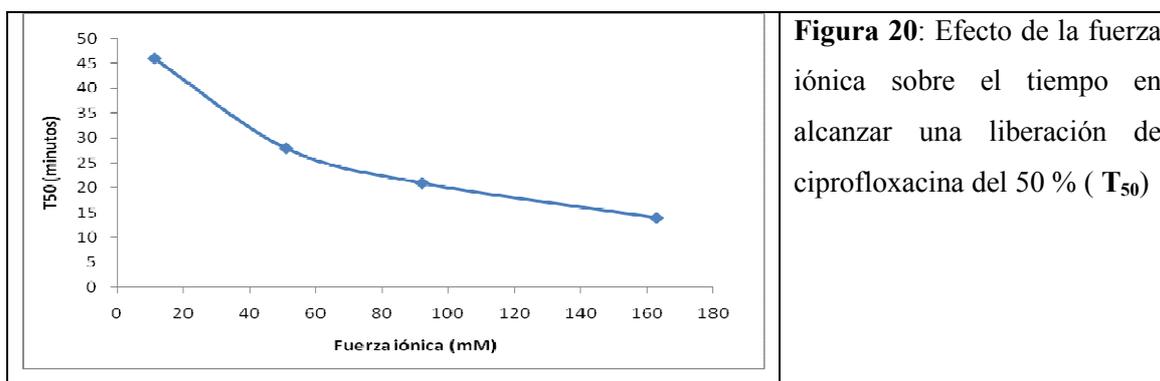
A partir de los datos anteriores se evaluó el efecto de la fuerza iónica de las soluciones anteriores mediante la determinación de la conductividad eléctrica sobre el T_{50} (tiempo al cual se produce la liberación del 50 por ciento de Cip). Así:

Tabla 12: Efecto de la fuerza iónica sobre el T_{50} de Cip en buffer fosfato 10 mM (pH=7.40)

[NaCl] (mM) a Solución Buffer fosfato 10 mM	Conductividad (miliS/cm)	Fuerza iónica (mM)	T_{50} (min.)
0	1.6	11.3	46
50	7.2	51.0	28
100	13.0	92.0	21
200	23.0	162.8	14

Fue evidente el efecto de la fuerza iónica en la liberación, tal como reflejó la **Tabla 12** y la **Figura 20**.

El análisis de la **Figura 20**, indicó una paulatina disminución del T_{50} a medida que se incrementó la fuerza iónica, dejando en claro el efecto de los iones sobre la estabilidad de las microesferas, al competir por los sitios de unión del calcio al alginato.

**Figura 20:** Efecto de la fuerza iónica sobre el tiempo en alcanzar una liberación de ciprofloxacina del 50 % (T_{50})

The page features a decorative graphic consisting of three blue circles of varying sizes, each with a lighter blue ring around its center. These circles are arranged vertically and are connected by thin, light blue lines that extend from the top-left and bottom-right corners of the page towards the circles. The text is centered on the left side of the page.

CAPITULO IV:
CONCLUSIONES

4.1. Conclusiones

Microesferas de alginato encapsulando Ciprofloxacina fueron producidas por la técnica de goteo, sustentándose en el proceso denominado “gelación iónica del alginato”.

La caracterización morfológica de las mismas, indicó la presencia de superficies regulares y distribución homogénea de tamaños, aunque cambios en la hidratación podrían alterar su esfericidad y capacidad de reabsorción de agua.

La variación de las condiciones de encapsulamiento, tanto del pH como de la concentración del ión Ca(II), revelaron comportamientos interesantes de las moléculas de Ciprofloxacina, así como también, de las de alginato. El incremento de la concentración de Ca(II) produjo efectos positivos sobre la encapsulación de Cip, debido al aumento del entrecruzamiento en la matriz biopolimérica. En contrapartida, el aumento del pH afectó la estabilidad de la matriz de alginato, y podría ser clave en la aparición de fenómenos de agregación entre propias moléculas de Ciprofloxacina.

Perfiles de liberación de Cip fueron realizados en diferentes condiciones, simulando el pH fisiológico del tracto gastrointestinal, y mostraron cinéticas que ofrecieron una tasa controlada de suministro de Cip al entorno acuoso. Fue observada una influencia directa en la liberación de la fuerza iónica y de quelantes del Ca(II), que desestabilizan la red matricial de alginato y por ende, la capacidad de liberación del sistema. Si bien, los tiempos de liberación fueron relativamente cortos (en el rango de las 1 a 5 horas dependiendo del pH y la concentración de buffer utilizado), el sistema constituye una sólida base para la mejora de la administración del antibiótico. La protección del mismo por el microentorno generado en la microesfera (buffer acético/acetato pH= 4.0) a la largo del trayecto gastrointestinal, es un punto fuerte a la hora de evaluar su estabilidad y biodisponibilidad.

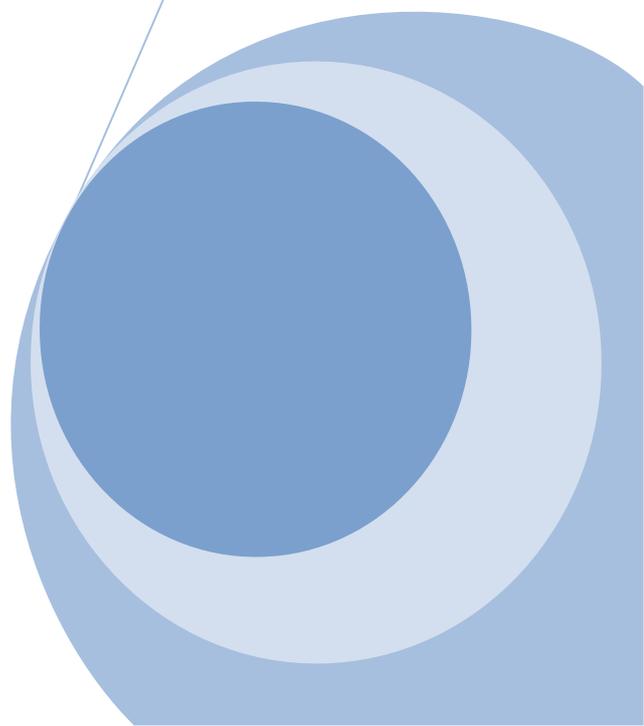
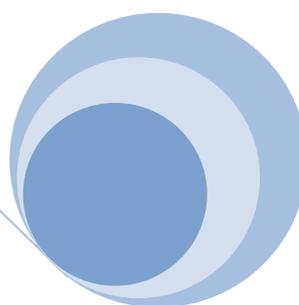
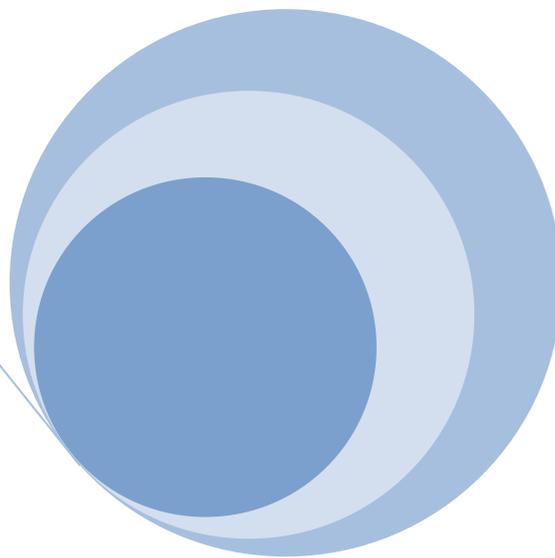
4.2. Perspectivas

En principio, resulta tentadora la idea de optimizar el sistema disminuyendo el tamaño de las microesferas, de modo de lograr alcanzar la escala de los nanómetros. Ello ofrecería mejores alternativas al momento de la accesibilidad a ciertas áreas del tracto gastrointestinal y en cuanto al suministro de la Cip, debido al aumento de la superficie específica de las esferas de alginato y a la manera de dosificar al paciente.

Es importante también lograr una mejora en la tasa de liberación de la Cip, a fin de obtener un perfil de liberación más prolongado en el tiempo. También resulta vital a la hora de pensar en un posible escalado del producto, la optimización del porcentaje de encapsulamiento, a fin de evitar costosos procesos para la recuperación del antibiótico no encapsulado. Ambas cuestiones pueden encontrar soluciones realizando:

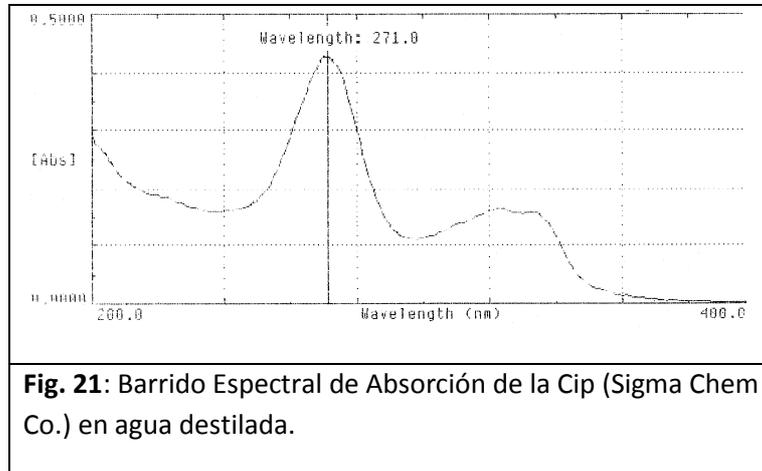
- Recubrimiento de las microesferas de alginato con algún otro biopolímero de índole catiónico (emulsano, quitosano, etc)
- Utilización de algún agente de entrecruzamiento que genere una matriz polimérica de mayor rigidez.
- Coacervación de la solución de alginato con otro polímero.
- Modificación estructural, química y/o enzimática de la matriz de alginato.
- Utilización de diferentes solventes en los métodos de preparación de las microesferas que tengan influencia sobre las propiedades fisicoquímicas de la moléculas intervinientes (alginato y Cip).

ANEXO



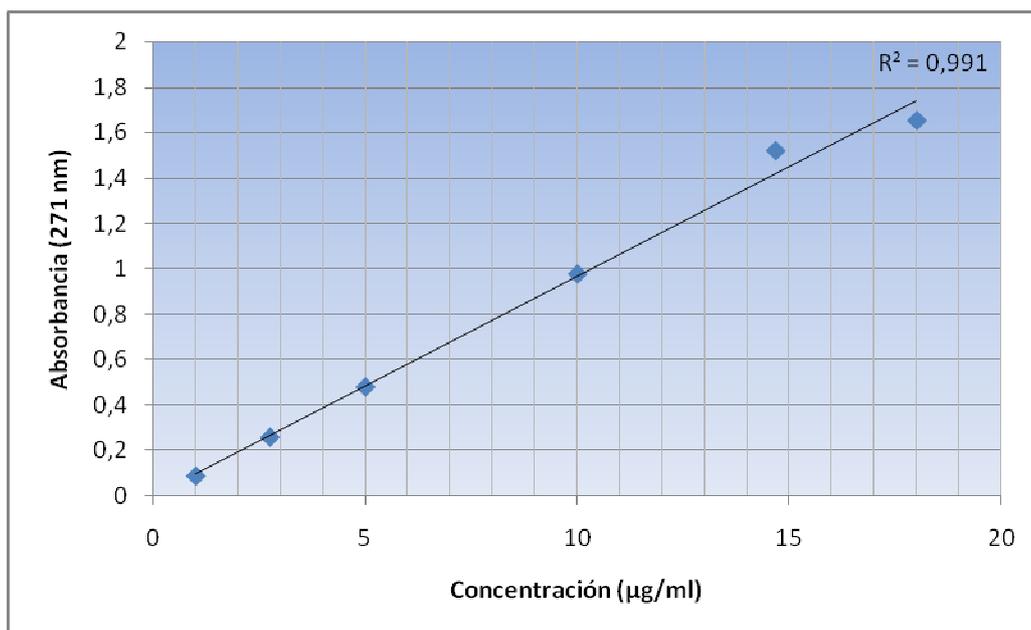
ANEXO 1: Curvas de calibración

A 1.1. Curva de calibración de Cip en agua destilada

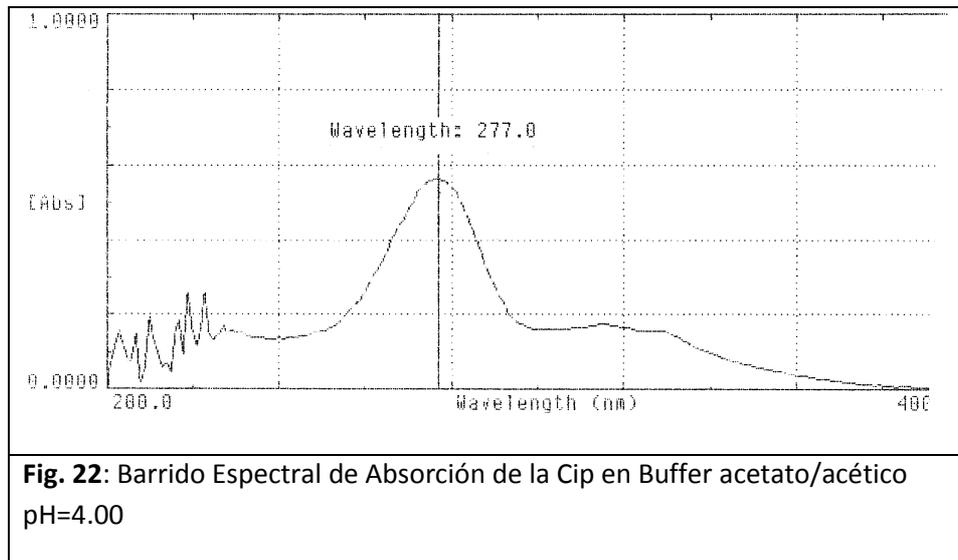


Longitud de Onda de Máxima Absorción = 271 nm

[Cip] (µg/ml)	A ₂₇₁
1.00	0.087
2.75	0.259
5.00	0.480
10.00	0.978
14.67	1.521
18.00	1.654

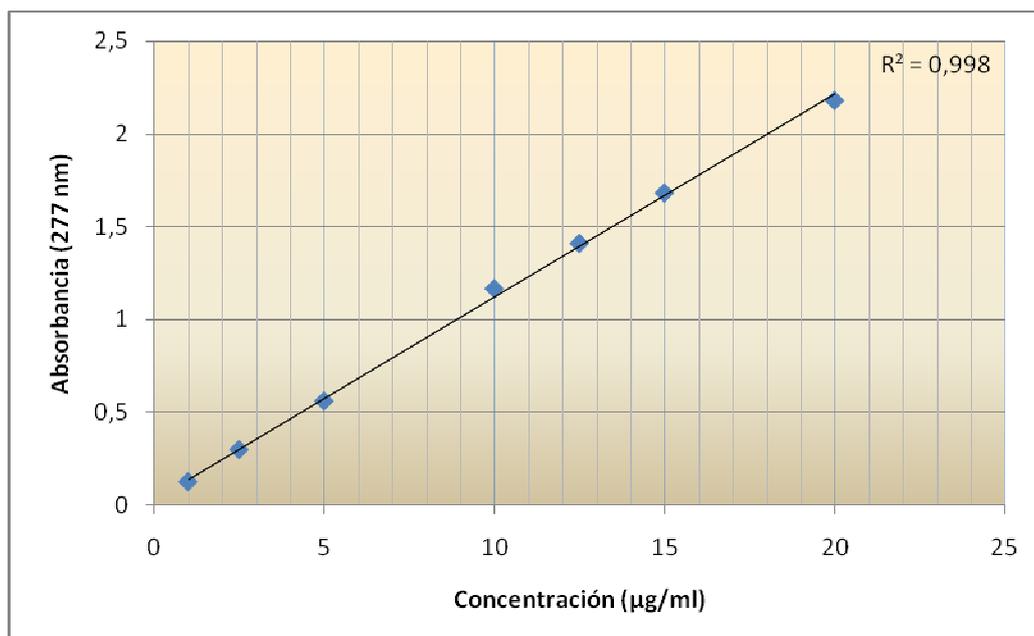


A 1.2. Curva de calibración de Cip en buffer AcNa/AcH 200 mM pH=4.00

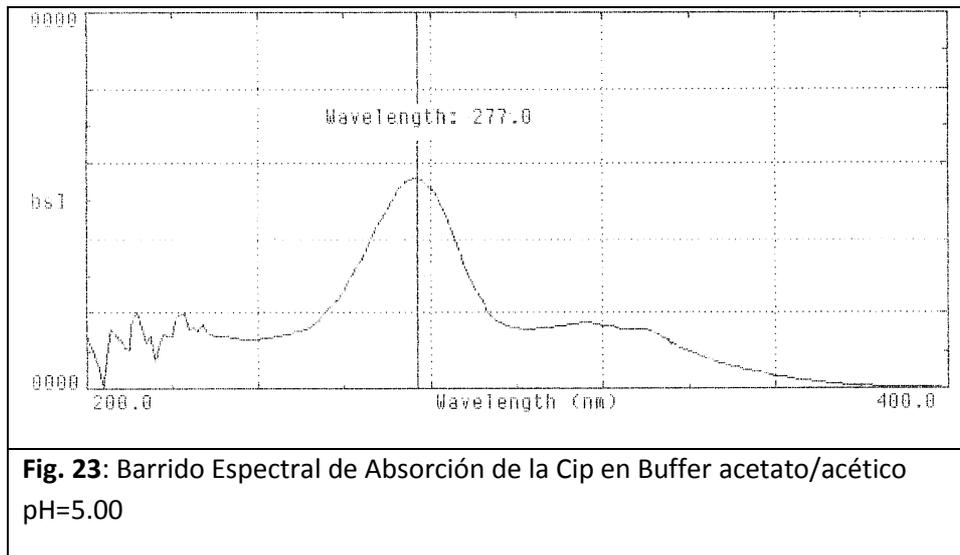


Longitud de Onda de Máxima Absorción = 277 nm

[Cip] (µg/ml)	A ₂₇₇
1.00	0.123
2.50	0.297
5.00	0.559
10.00	1.166
12.50	1.411
15.00	1.683
20.00	2.182

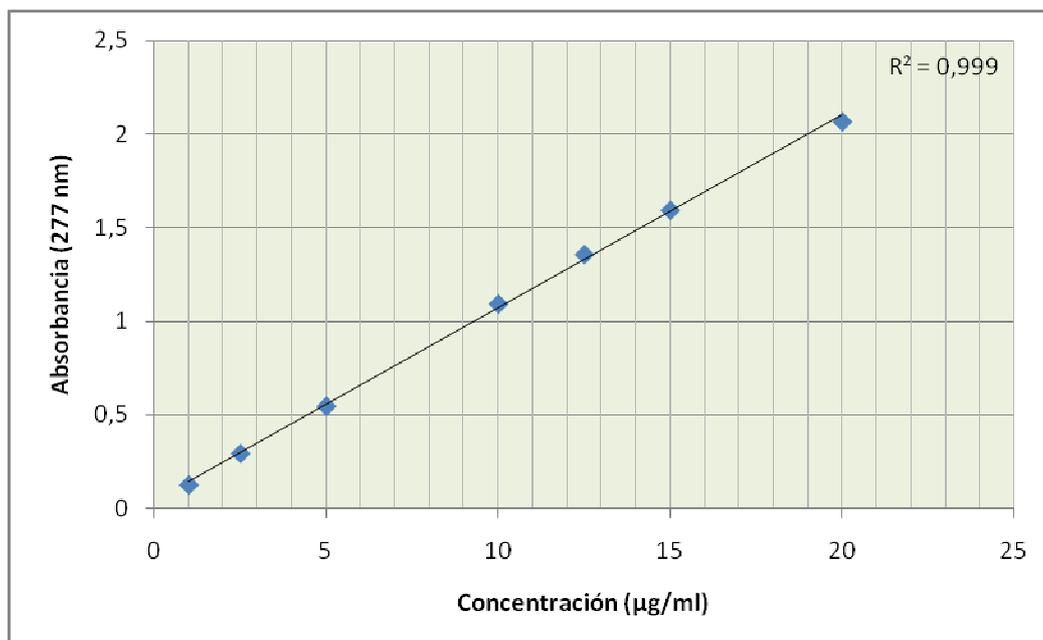


A 1.3. Curva de calibración de Cip en buffer AcNa/AcH 200 mM pH=5.00

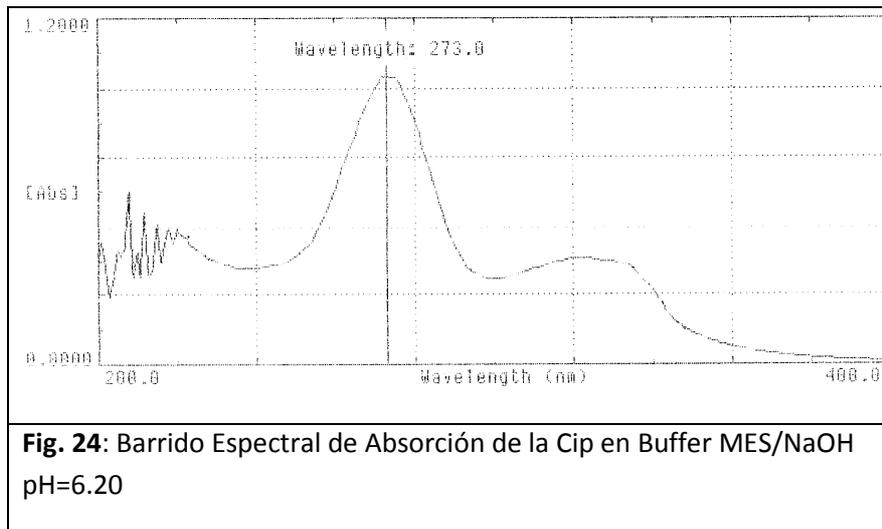


Longitud de Onda de Máxima Absorción = 277 nm

[Cip] (µg/ml)	A ₂₇₇
1.00	0.126
2.50	0.293
5.00	0.546
10.00	1.092
12.50	1.357
15.00	1.593
20.00	2.066

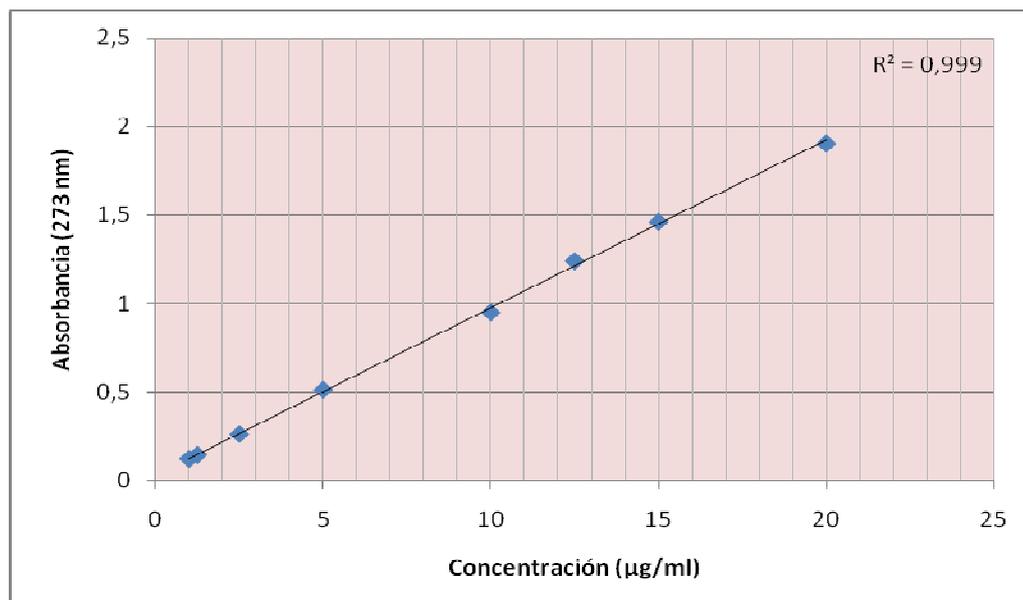


A 1.4. Curva de calibración Cip en buffer MES/NaOH 100 mM pH=6.20



Longitud de Onda de Máxima Absorción = 273 nm

[Cip] (µg/ml)	A ₂₇₃
1.00	0.119
1.25	0.141
2.50	0.258
5.00	0.510
10.00	0.949
12.50	1.240
15.00	1.461
20.00	1.905



A 1.5. Curva de calibración Cip en buffer KCl/HCl ("Clark and Lubs") 100 mM pH=1.20

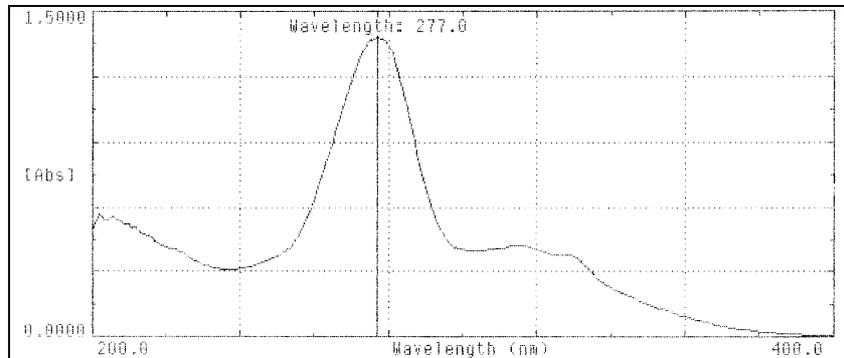
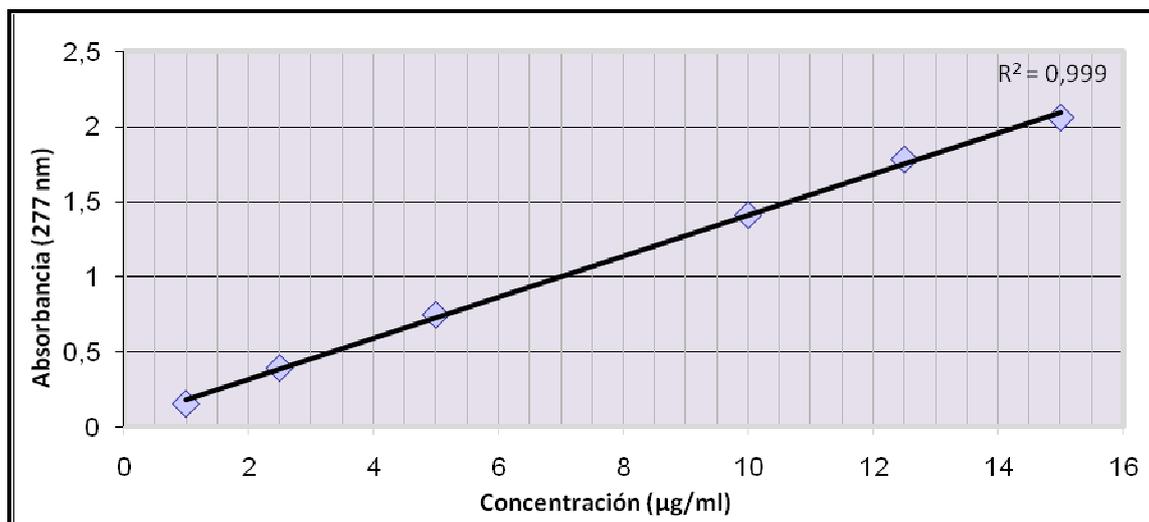


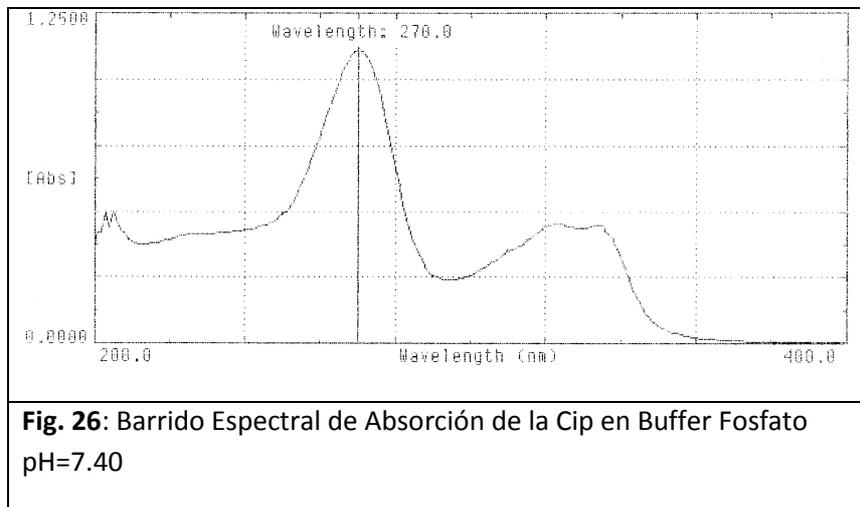
Fig. 25: Barrido Espectral de Absorción de la Cip en Buffer KCl/HCl pH=1.20

Longitud de Onda de Máxima Absorción = 277 nm

[Cip] ($\mu\text{g/ml}$)	A_{277}
1.00	0.152
2.50	0.391
5.00	0.745
10.00	1.409
12.50	1.779
15.00	2.058

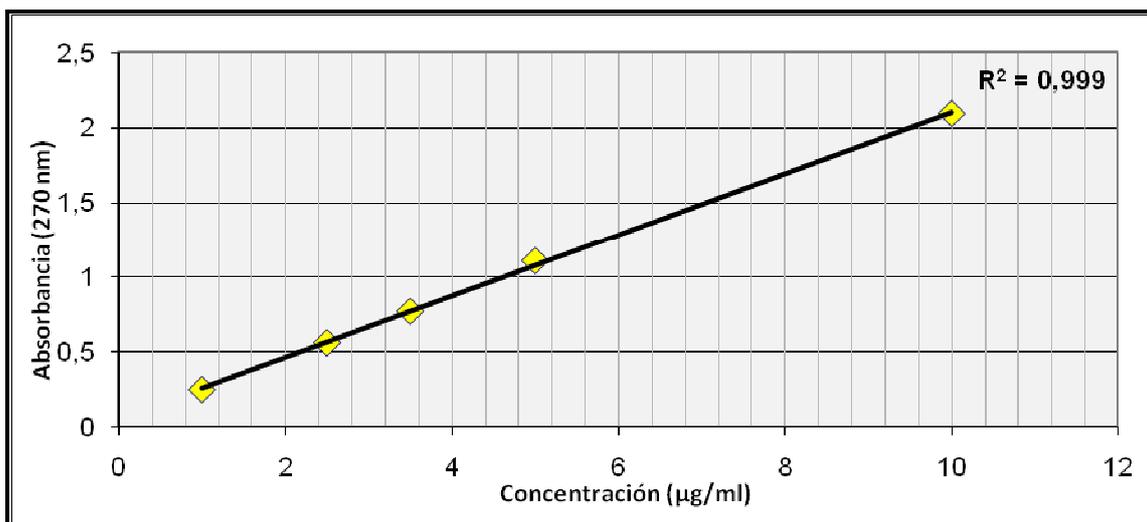


A 1.6. Curva de calibración Cip en buffer $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 100 mM pH=7.40



Longitud de Onda de Máxima Absorción = 270 nm

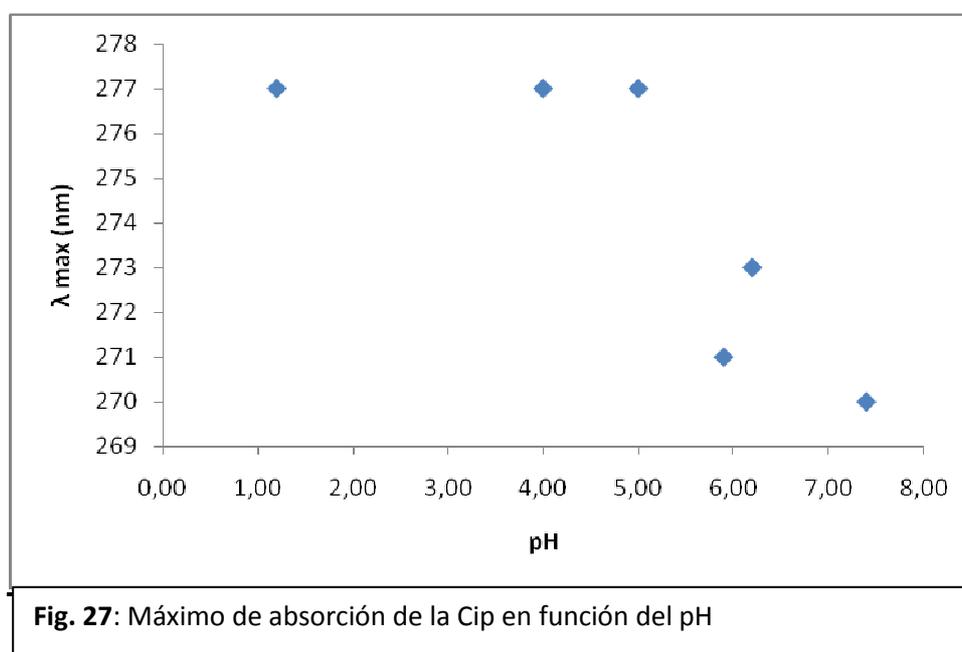
[Cip] ($\mu\text{g/ml}$)	A_{270}
1.00	0.245
2.50	0.557
3.50	0.767
5.00	1.107
10.00	2.094



A 1.7. Desplazamiento batocrómico (hacia longitudes de onda mayores) del máximo de absorción de la Cip, al disminuir el pH

Tabla 13: Efecto batocrómico del λ_{\max} de Cip con el pH

Buffer	pH	λ_{\max} (nm)
KCl/HCl	1,20	277
AcNa/AcH	4,00	277
AcNa/AcH	5,00	277
Agua dest	5,90	271
MES/NaOH	6,20	273
Fosfato	7,40	270



Se observa en la **Tabla 13** y el gráfico de la **Figura 27**, que ha medida que el pH disminuye, se incrementa el máximo de absorción de la Cip, lo cual indica un posible cambio en la estructura de la molécula, dada la influencia del medio donde se halla.

ANEXO 2: Test T para determinación de diferencias significativas entre muestras independientes.

Se desea determinar si hay diferencias significativas entre dos condiciones de encapsulamiento (muestras independientes):

Muestra	[CaCl ₂] (mM)	Encapsulación (%)
A	100	44.8 ± 0.9
B	250	42.1 ± 2.0

Con los valores de los experimentos individuales, se realiza el cálculo del coeficiente “t” y de los grados de libertad:

Tabla 14: Cálculo de los valores estadísticos del Test T

Muestra A	Muestra B		A	B
45.8 44.7 44.0	43.7 42.6 39.9	n	3	3
		ΣX	134.5	126.2
		ΣX^2	6031.7	5316.5
		SS	1.7	7.7
		promedio	44.8	42.1
		Prom _a - Prom _b		
		2.7		
		t		
		+2.2		
		Grados de libertad		
		4		

Donde:

$$SS = \sum (X - \text{promedio})^2$$

$$\sigma_p = \sqrt{[(SS_a + SS_b)/(n_a + n_b - 2)]}$$

$$t = (\text{Prom}_a - \text{Prom}_b) / (\sigma_p * \sqrt{(1/n_a) + (1/n_b)})$$

$$\text{Grados de libertad} = n_a + n_b - 2$$

Con el valor de “t” y los grados de libertad, se va a una **TABLA DE LA DISTRIBUCION t-Student**, para obtener el valor de probabilidad asignado. El valor más cercano al calculado, tiene una probabilidad de **0.05** (para un valor de $t=2.132$)

Se procede al “Planteamiento de la hipótesis”

- **Hipótesis alterna (Ha):** Los porcentajes de encapsulamiento obtenidos para diferentes concentraciones de cloruro de calcio, son distintos (diferencia significativa)
- **Hipótesis nula (Ho):** Las diferencias observadas en los porcentajes de encapsulamiento se deben al azar.

Nivel de significación:

Para todo valor de probabilidad igual o menor que 0.05, se acepta Ha y se rechaza Ho.

Zona de rechazo:

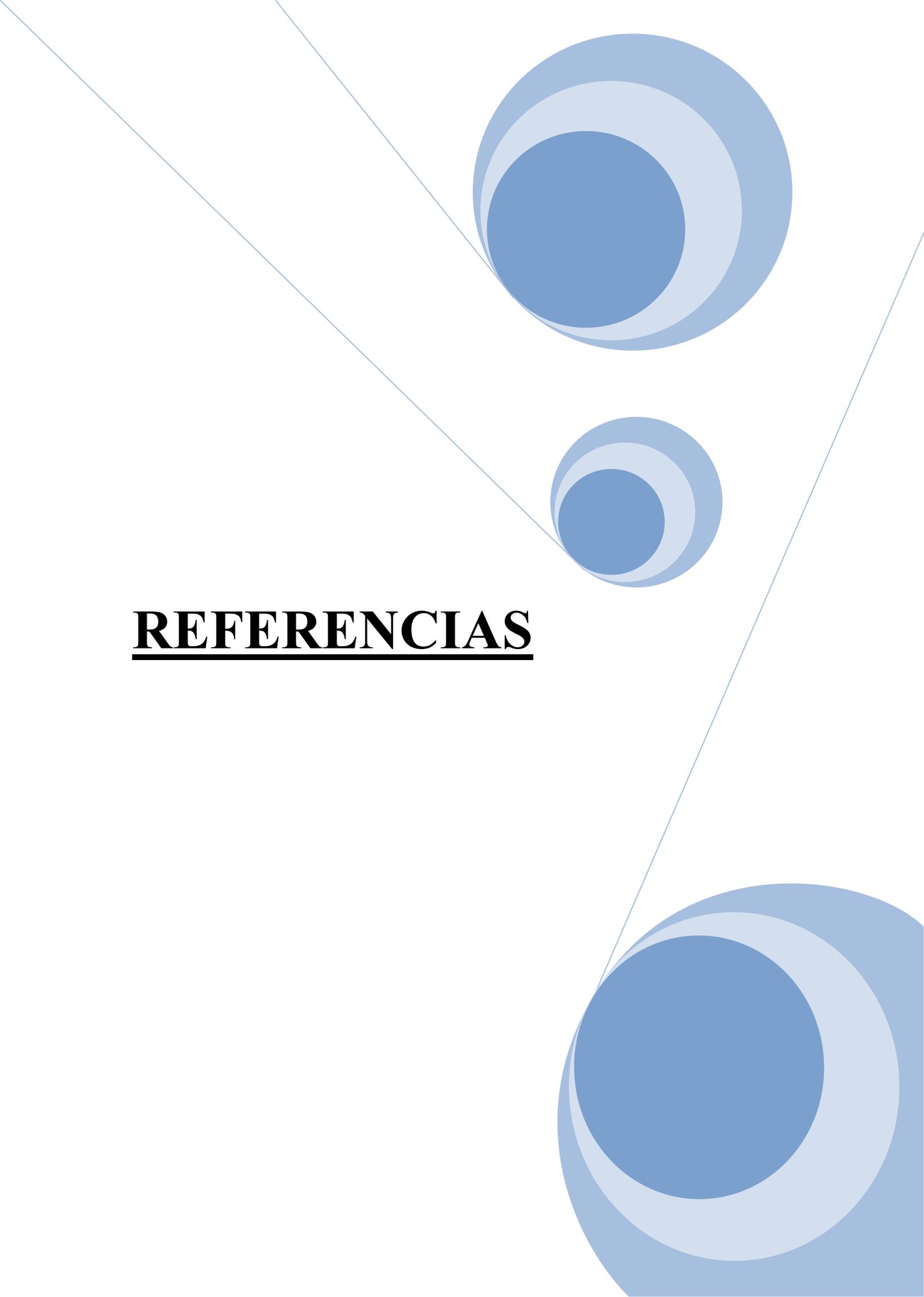
Para todo valor de probabilidad mayor que 0.05, se acepta Ho y se rechaza Ha.

Decisión:

Por lo tanto, como el valor de probabilidad obtenido es igual o menor a 0.05, se puede aceptar Ha, y rechazar Ho, con un nivel de confianza cercano al 95 %.

Interpretación:

Se puede concluir que las diferencias experimentales halladas entre ambos porcentajes de encapsulamiento resultan significativas.

A decorative graphic on the right side of the page. It features three blue circles of varying sizes, each composed of concentric circles with a gradient from dark blue to light blue. Two thin, light blue lines intersect at a point, forming a V-shape that frames the circles. The circles are positioned at the top, middle, and bottom of the V-shape.

REFERENCIAS

- Alós J. I., 2009. Quinolonas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27: 290-297.
- Anónimo. *School of Chemistry and Technology*, Croacia: <http://www.ktf-split.hr/periodni/en/abc/kpt.html>
- Breda S.A., Jimenez-Kairuz A.F., Manzo R.H., Olivera M.E., 2009. Solubility behavior and biopharmaceutical classification of novel high-solubility ciprofloxacin and norfloxacin pharmaceutical derivatives. *International Journal of Pharmaceutics*, 371: 106-113.
- Casanovas Soler P., Delgadillo Duarte J., Moreno Rueda J., 2008. Aqueous compositions containing ciprofloxacin and related use. US Patent 5786363.
- Calvo Miguel. *Bioquímica de los Alimentos*. <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/azucares/alginato.html>
- Castro G. R., Panilaitis B., Kaplan D. L., 2008. Emulsan, a tailorable biopolymer for controlled release. *Bioresource Technology*, 99: 4566–4571.
- Cho K.Y., Chung T.W., Kim B.C., Kim M.K., Lee J.H., Wee W.R., Cho C.S., 2003. Release of ciprofloxacin from poloxamer-graft-hyaluronic acid hydrogels in vitro. *International Journal of Pharmaceutics*, 260: 83–91.
- Dochibhotla P. and Robinson D.H., 2001. Factors Affecting The Release Of Model Drugs From Calcium Alginate Microspheres.
- Dong Z., Wang Q., Du Y., 2006. Alginate/gelatin blend films and their properties for drug controlled release. *Journal of Membrane Science*, 280: 37–44.
- Dornish M., Kaplan D., Skaugrud Ø., 2001. Standards and guidelines for biopolymers in tissue-engineered medical products. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 944: 388–397.
- Eboka C.J. and Okeri H.A., 2005. Aqueous solubility of ciprofloxacin in the presence of metal cations. *Tropical Journal of pharmaceutical Research*, 4: 349-354.
- Escobar J.L., García D.M., Zaldivar D., Katime I., 2002. Hidrogeles: Principales características en el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos. *Revista Iberoamericana Polímeros*, 3.
- Haerdi-Landerer M. C., Habermacher J., Wenger B., Suter M. M., Steiner A., 2009. Review: Slow release antibiotics for treatment of septic arthritis in large animals. *The Veterinary Journal* xxx.

- Hernandez-Gil J., Perello L., Ortiz R., Alzuet G., Gonzalez-Alvarez M., Liu-Gonzalez M., 2009. Synthesis, structure and biological properties of several binary and ternary complexes of copper(II) with ciprofloxacin and 1,10 phenanthroline. *Polyhedron*, 28: 138–144.
- Kim E. and Choi H., 2004. Preparation of Various Solid-Lipid Beads for Drug Delivery of Enrofloxacin. *Drug Delivery*, 11: 365-370.
- Kim W., Chung H., Shin I., Yam K. L., Chung D., 2008. Characterization of calcium alginate and chitosan-treated calcium alginate gel beads entrapping allyl isothiocyanate. *Carbohydrate Polymers*, 71: 566–573.
- Maurer N, Wong K. F., Hope M. J., Cullis P. R., 1998. Anomalous solubility behavior of the antibiotic ciprofloxacin encapsulated in liposomes: a ¹H-NMR study. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1374: 9-20.
- Neeves K. Controlled Release Drug Delivery from Hydrogels. Student's Guide. CSIP Graduate Fellow. Cornell University.
- Oh Y., Nix D. E. and Straubinger R. M., 1995. Formulation and Efficacy of Liposome-Encapsulated Antibiotics for Therapy of Intracellular Mycobacterium avium Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, :2104–2111.
- Patel S. A., Patel N. M. and Patel M. M., 2006. Simultaneous Spectrophotometric Estimation of Ciprofloxacin and Ornidazole in Tablets. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 68: 665-667.
- Ragab G. H., Amin A. S., 2004. Atomic absorption spectroscopic, conductometric and colorimetric methods for determination of fluoroquinolone antibiotics using ammonium reineckate ion-pair complex formation. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 60 : 973-978.
- Rojas Cortés M. G., Vallejo Díaz B. M. y Perilla J. E., 2008. Biopolymers as materials for developing products in pharmaceutical applications and biomedical uses. *REVISTA INGENIERÍA E INVESTIGACIÓN*, 28: 57-71.
- Silva-Júnior A. A., Scarpa M. V., Pestana K. C., Mercuri L. P., Rosário de Matos J., Gomes de Oliveira A., 2008. Thermal analysis of biodegradable microparticles containing ciprofloxacin hydrochloride obtained by spray drying technique. *Thermochimica Acta*, 467: 91–98.

- Torniainen K., Tammilehto S., Ulvi V., 1996. The effect of pH, buffer type and drug concentration on the photodegradation of ciprofloxacin. *International Journal of Pharmaceutics*, 132: 53-61.
- Varanda F., Pratas de Melo M.J., Cacüo L.M., Dohrn R., Makrydaki F.A. Voutsas E., Tassios D., and Isabel M. Marrucho I.M., 2006. Solubility of Antibiotics in Different Solvents. 1. Hydrochloride Forms of Tetracycline, Moxifloxacin, and Ciprofloxacin. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 45: 6368-6374.
- Wang Q., Dong Z., Du Y., Kennedy J. F., 2007. Controlled release of ciprofloxacin hydrochloride from chitosan/polyethylene glycol blend films. *Carbohydrate Polymers*, 69: 336–343.
- Zhao H., Le Y., Liu H., Hu T., Shen Z., Yun J., Chen J., 2009. Preparation of microsized spherical aggregates of ultrafine ciprofloxacin particles for dry powder inhalation (DPI). *Powder Technology*, 194: 81–86.

