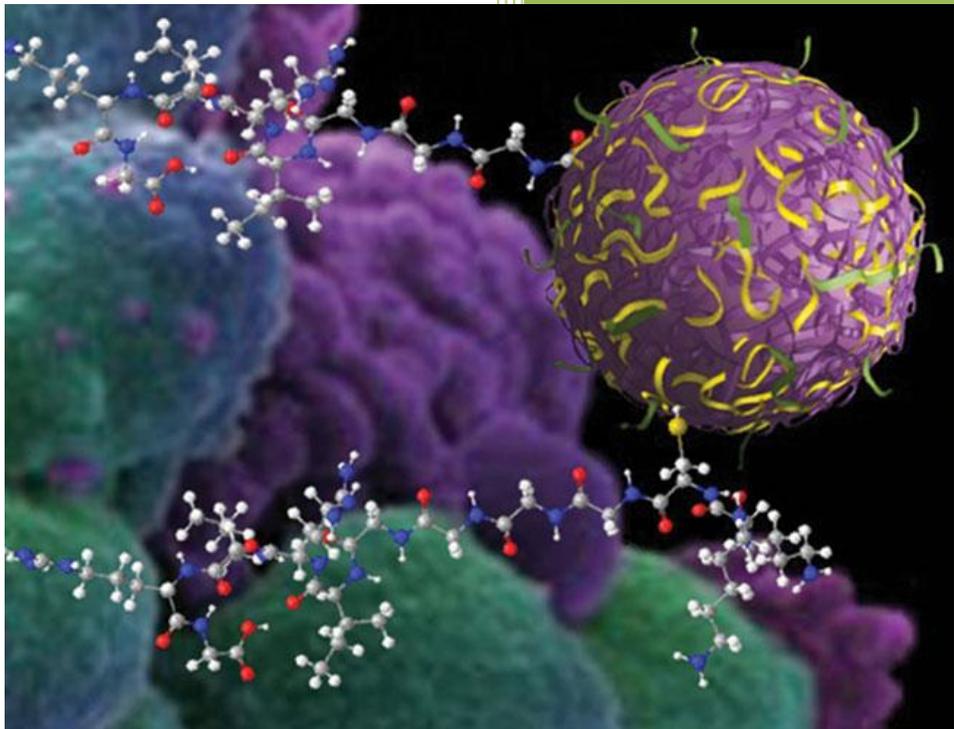


# 2011

## Encapsulación y liberación controlada de Enrofloxacin utilizando matrices biopoliméricas.



Maximiliano Luis Cacicedo

Trabajo de Tesis de Licenciatura en  
Biotecnología y Biología Molecular

Facultad de Ciencias Exactas

Universidad Nacional de La Plata



*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*

*A mis padres y hermana, por su educación y apoyo día a día.*

*A mis abuelos y abuelas por guiarme en el buen camino y por su amor incondicional.*

*A Vir, por ser una irremplazable compañera de vida y por amarme y estar en la buenas y malas dando todo de sí.*

*A Guiye, por su confianza, consejos y amistad.*

*A mis amigos de laboratorio Mancho, Yani y Vale, por sus enseñanzas, momentos y excelente predisposición.*

*A Edgardo Donati, por abrirme las puertas del Cindefi y de su cátedra.*

*A la Facultad de Ciencias Exactas y a sus profesores, por la educación que me brindaron.*

*A la educación pública, sin la cual no podría estar en la situación en la que hoy me encuentro.*

*A la gente del CINDEFI, por toda su buena onda.*

*A mis amigos de la Facu, sin ellos todo hubiese sido imposible.*

*A mis amigos de la vida, por estar siempre a mi lado y ayudarme con total incondicionalidad y cariño.*



## **INDICE GENERAL**

### **CAPITULO I: INTRODUCCION**

1.1. Los biopolímeros como materiales para el desarrollo de productos con aplicaciones farmacéuticas y de uso biomédico	1
1.2. Alginato, carragenina y pectina como matrices poliméricas	3
1.3. Enrofloxacin	6
1.4. Liberación controlada de fármacos	7
1.5. Objetivos	8

### **CAPITULO II: MATERIALES Y METODOS**

2.1. Materiales	10
2.2. Procedimientos experimentales	
2.2.1. Curvas de calibración y preparación de soluciones estándar de enrofloxacin	10
2.2.2. Preparación de soluciones de biopolímeros	10
2.2.3. Ensayos de interacción	11
2.2.4. Ensayos de interacción del polímero seleccionado en función del pH	11
2.2.5. Desarrollo de microesferas por el método de gelación iónica	11
2.2.6. Encapsulamiento en función del pH	12
2.2.7. Optimización de las condiciones de encapsulamiento de enrofloxacin	12
2.2.8. Ensayos de Saturación	12
2.2.9. Ensayos de liberación	13
2.2.10. Recubrimiento a las microesferas	13

## CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Interacción de la Enrofloxacin con los biopolímeros	15
3.2. Encapsulación de la Enrofloxacin	
3.2.1. Encapsulación en condiciones seleccionadas de pH	19
3.2.2. Encapsulación de enrofloxacin con soluciones de solventes miscibles con agua	20
3.2.3. Conclusiones y elección de las condiciones optimas de encapsulación	21
3.3. Ensayos de saturación	21
3.4. Ensayos de liberación de Enrofloxacin	
3.4.1. Liberación de Enrofloxacin utilizando los distintos biopolímeros	22
3.4.2. Liberación de Enrofloxacin a pH=1.2, utilizando una matriz de alginato-carragenina (1:1)	23
3.4.3. Optimización de la capacidad de liberación	
3.4.3.1. Recubrimiento con ácido oleico	24
3.4.3.2. Recubrimiento con pectina y goma guar	26
3.4.3.3. Efecto del aumento de la concentración de polímero de recubrimiento	27
3.4.3.4. Emulsiones	28
3.4.3.5. Goma Guar carboximetilada (CMGG)	30

## CAPITULO IV: CONCLUSIONES

❖ Conclusiones	33
❖ Perspectivas	34

<u>REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFIA</u>	36
-----------------------------------	----

ANEXOS

A 1.	Valores de Concentración inhibitoria Mínima (MIC) de enrofloxacin	40
A 2.	Concentraciones sericas de Enrofloxacin en función del tiempo	41
A 3.	Especies sensibles a enrofloxacin, comparación con otros antibióticos	41
A 4.	Suceptibilidad a enrofloxacin de cepas patogenas	42
A 5.	Cinéticas de muerte para <i>E. coli</i> por exposición a enrofloxacin	42
A 6.	Curva de calibración de enrofloxacin en buffer Clark & Lubs 50mM, pH=1.2	43
A 7.	Curva de calibración de enrofloxacin en buffer HAc/Ac <sup>-</sup> 50mM, pH=5	43
A 8.	Curva de calibración de enrofloxacin en buffer fosfato 100mM, pH=7.4	44
A 9.	Curva de calibración de enrofloxacin en etanol	44
A 10.	Curva de calibración de enrofloxacin en propanol	45
A 11.	Curva de calibración de enrofloxacin en etilenglicol	45
A 12.	Curva de calibración de enrofloxacin en propilenglicol/EtOH 1:1	46
A 13.	Test T para determinación de diferencias significativas entre muestras independientes	46

## **INDICE DE FIGURAS**

### **CAPITULO I: INTRODUCCION**

Figura 1. Mecanismos de liberación de moléculas	2
Figura 2. Plegamiento del alginato	5
Figura 3. Efecto de la concentración del polímero sobre la red del hidrogel	5
Figura 4. Estructura molecular de la Enrofloxacin	6
Figura 5. Sistemas tradicionales de liberación	7
Figura 6. Esquema del sistema gastrointestinal humano	8

### **CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSION**

Figura 7. Cinéticas de interacción para la pectina y la carragenina	16
Figura 8. Equilibrio proteolítico de análogos de Enrofloxacin	16
Figura 9. Ensayos de interacción de Carragenina a distintos pHs	17
Figura 10. Microscopia óptica de las microesferas (100X)	20
Figura 11. Ensayos de saturación de enrofloxacin en la matriz alginato-carragenina	21
Figura 12. Cinética de liberación de enrofloxacin en biopolímeros	22
Figura 13. Curva de liberación de Enrofloxacin en Alginato/Carragenina a pH=1.2	24
Figura 14. Liberación de Enro con recubrimientos de ácido oleico	25
Figura 15. Efecto del recubrimiento de pectina y goma guar sobre la formulación Alginato/Carragenina	27
Figura 16. Liberación con dos concentraciones de pectina para el recubrimiento	27
Figura 17. Liberación de enrofloxacin en la emulsión a dos concentraciones distintas de Propilenglicol (PG)	29
Figura 18. liberación de enrofloxacin de la emulsión con recubrimiento de pectina (0.01 %)	30
Figura 19. Liberación de enrofloxacin de la formulación conteniendo GGCM en dos condiciones de pH	31

ANEXOSDOSIS TERAPEUTICAS DE ENROFLOXACINA

A 1.	Valores de Concentración inhibitoria Mínima (MIC) de enrofloxacin	40
A 2.	Concentraciones sericas de Enrofloxacin en función del tiempo, en función de dosis orales e intramusculares	41
A 3.	Especies sensibles a enrofloxacin, comparación con otros antibióticos	41
A 4.	Susceptibilidad a enrofloxacin de cepas patógenas bacterianas y mycoplasma de origen bovino	42
A 5.	Cinéticas de muerte para E. coli por exposición a enrofloxacin	42

CURVAS DE CALIBRACION PARA LA ENROFLOXACINA

A 6.	Curva de calibración de enrofloxacin en buffer Clark & Lubs 50mM, pH=1.2	43
A 7.	Curva de calibración de enrofloxacin en buffer HAc/Ac- 50mM, pH=5	43
A 8.	Curva de calibración de enrofloxacin en buffer fosfato 100mM, pH=7.4	44
A 9.	Curva de calibración de enrofloxacin en etanol	44
A 10.	Curva de calibración de enrofloxacin en propanol	45
A 11.	Curva de calibración de enrofloxacin en etilenglicol	45
A 12.	Curva de calibración de enrofloxacin en propilenglicol/EtOH 1:1	46

## INDICE DE TABLAS

### CAPITULO I: INTRODUCCION

Tabla 1. Características de los biopolímeros	3
--	---

### CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSION

Tabla 2. Interacción de biopolímeros con enrofloxacin	15
Tabla 3. Proporción de las distintas especies de Enrofloxacin dependiendo del pH	18
Tabla 4. Especies de Enrofloxacin predominantes a los distintos pHs	19
Tabla 5. Porcentaje de encapsulación en distintas condiciones de pH	19
Tabla 6. Porcentaje de encapsulación de enrofloxacin con diferentes	20
Tabla 7. Encapsulación vs. Concentración de Enrofloxacin	21
Tabla 8. Cinética de liberación de enrofloxacin en una matriz de	23
Tabla 9. Liberación de Enrofloxacin a pH=1.2, utilizando alginato/carragenina	26
Tabla 10. Porcentajes de encapsulación de Emulsión en distintas condiciones	28
Tabla 11. Liberación desde Emulsión	29
Tabla 12. Liberación de enrofloxacin para la formulación con CMGG	31

### ANEXOS

Tabla 13. Calculo de los valores estadísticos del Test T	47
--	----



# Capítulo I: Introducción

### **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 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 algunas de 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.

La función de estos polímeros en los sistemas de liberación controlada de fármacos es principalmente de protección y de direccionamiento. En este sentido, en los sistemas de administración oral de fármacos pueden proteger al estómago de los efectos adversos de las drogas, y a la potencial degradación de los fármacos de los efectos de los componentes gástricos. Hay un gran número de drogas que al exponerlas a la mucosa gástrica producen irritación, y en algunos casos, una verdadera corrosión de la pared gástrica, lo que es un serio inconveniente en pacientes con tratamientos prolongados y/o en el tratamiento de enfermedades crónicas. Como por ejemplo, la eritromicina es inestable en el medio gástrico.

Otras razones para la utilización de polímeros para liberación controlada por vía oral son:

- ❖ Obtener una dosis adecuada del fármaco en alguna región del intestino, o que simplemente actúe en el intestino y se necesite una elevada concentración del mismo.
- ❖ para proveer de un retardo en el proceso de liberación de la droga.
- ❖ para prevenir interacciones entre drogas con biomoléculas presentes en el tracto digestivo que puedan interferir con su acción y/o reducir su biodisponibilidad. Como por ejemplo pepsina y peptonas que pueden llevar a obstaculizar la digestión.

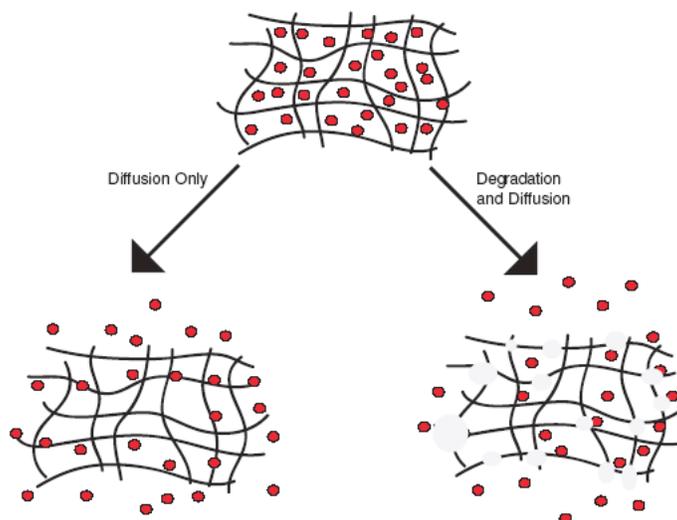
Los factores fisiológicos más importantes del sistema gastrointestinal (GI) que afectan el funcionamiento de los recubrimientos de drogas con polímeros son:

1. El pH del estomago e intestino: el pH del estomago varía entre 1.0 y 3.5 dependiendo de la presencia o no de alimentos. El pH intestinal puede oscilar entre 3.8 y 6.6 en el delgado, y entre 7.5 y 8.0 en el grueso. Este amplio rango de pHs resulta de la dilución progresiva del ácido estomacal por parte de los iones de bicarbonato presentes en la secreción pancreática.  
Basados en el pH del estomago y del intestino delgado, las formulaciones poliméricas deben ser capaces de resistir valores de pH por debajo de 4 para evitar su desintegración en el estomago y empezar a disolverse a valores de pH por superiores a 5, para luego ser completamente solubilizados a un valor de pH cercano a 7.0.
2. El vaciado gástrico: el vaciado gástrico ha sido reportado como promedio en tres horas o más, hecho que depende del tipo de alimento presente en el estomago junto a otros factores fisiológicos.
3. La actividad enzimática en todo el sistema GI: Hay una gran variedad de enzimas que ayudan a degradar sustancias, la mayoría pueden ser clasificadas dentro de las hidrolasas e incluyen tripsina, quimotripsina, amilasa y lipasa.

Entre los mecanismos que intervienen en la liberación de un fármaco contenido en un gel que pueda ser liberado de un polímero podemos mencionar, a saber:

1. Mecanismo difusional a través de la matriz y hacia el medio de externo a la matriz sin que se altere la estructura del gel. Este mecanismo es el descrito por las leyes de Fick.
2. Mecanismo de erosión o degradación de la red polimérica debido a la presencia de otras moléculas activas sobre el gel, como enzimas, agua, concentraciones de ácido/base, sales, fuerza iónica; y/o un proceso de degradación por choque (mecanismo físico), el cual esta superpuesto con el mecanismo de difusión (Fig. 3).

**Figura 1.** Mecanismos de liberación de moléculas.



Algunos sistemas de liberación controlada de moléculas han sido diseñados para que no puedan ser degradados en condiciones fisiológicas, y que la liberación de la molécula cargo sólo proceda mediante un mecanismo difusional. Sin embargo, estos sistemas pueden presentar

dificultades en su manufactura y problemas de toxicidad secundaria al momento de eliminar del organismo la matriz y/o sus productos parciales de degradación, 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, entre otros. De manera general podemos destacar las principales propiedades de los biopolímeros que se busca emplear en sistemas de liberación controlada son:

- Biocompatibilidad
- Biodegradabilidad
- No Inmunogénico
- Ausencia de toxicidad en el polímero y sus productos de degradación

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):

**Tabla 1:** Características de los polímeros sintetizados químicamente (izq.) y biopolímeros naturales (der.)

<b>Propiedades</b>	<b>Polímeros de síntesis química</b>	<b>Biopolímeros</b>
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

En general, el atractivo de los polímeros naturales radica principalmente en su amplia disponibilidad, su bajo costo, su estereoespecificidad y las posibilidades de modificación, sus propiedades química- y/o enzimáticamente, su potencial degradabilidad y compatibilidad dado su origen.

## **1.2. Alginato, Carragenina y Pectina como matrices poliméricas**

### **1.2.1. Pectina**

Es un heteropolisacárido contenido principalmente en las paredes celulares de plantas. Se produce comercialmente extrayéndolo de la cáscara de frutas. En general es utilizado como un agente de gelación en alimentos. La pectina contiene principalmente (65 %) unidades de ácido galactourónico unidas por enlaces  $\alpha$ -(1-4). Los grupos ácidos se pueden presentar tanto libres,

esterificados con grupos metilo, o como sales de sodio, potasio, calcio o amonio. En algunas pectinas grupos amida también pueden estar presentes. Debido a que la pectina es un hidrocoloide ionizable, es sensible a variaciones de pH y a la presencia de cationes. Las propiedades de gelación dependen de su grado de metoxilación. Las pectinas con un alto grado de metoxilación gelifican a valores bajos de pH para que los grupos ácidos, minoritarios, se encuentren fundamentalmente en forma no ionizada, y no existan repulsiones iónicas. A pH 3,5, aproximadamente la mitad de los grupos carboxilo del ácido galacturónico se encuentran ionizados, pero por debajo de pH 2,0 el porcentaje es ya muy pequeño. Las moléculas de pectinas de alto metoxilo pueden entonces unirse a través de interacciones hidrofóbicas de los grupos metoxilo o mediante puentes de hidrógeno, incluidos los de los grupos ácidos no ionizados. En consecuencia, las pectinas de alto metoxilo formarán geles a pH entre 1,0 y 3,5. Además del pH, es necesario adicionar un cosoluto hidrofílico, como la sacarosa, para disminuir la actividad del agua; la cual se encuentra entonces menos libre para solvatar la molécula de polisacárido. Por lo tanto, la sacarosa aumenta la interacción hidrofóbica entre los grupos éster metílico permitiendo la formación de zonas de unión estables. A la vez la gelificación también depende de las temperaturas utilizadas.

La gelificación de las pectinas de bajo grado de metoxilación se encuentra gobernada por las interacciones entre el polímero y los iones calcio. Por esto mismo la disponibilidad de los iones calcio es muy importante para esta gelificación.

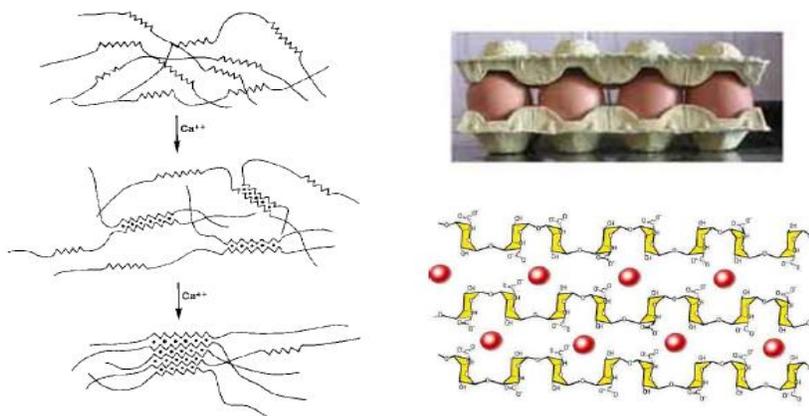
La pectina se ha empleado como absorbente intestinal desde hace muchos años por su capacidad de absorber agua lo que produce un ralentizado del vaciado gástrico permitiendo mas tiempo para absorber nutrientes en el intestino. Además, se le han atribuido ciertos efectos beneficiosos como en la prevención del cáncer, sobre todo [colorectal](#). Recientemente un equipo de investigadores halló en estudios de laboratorio que ciertos componentes de la pectina se unen y, quizás, inhiben una proteína que facilitaría la diseminación del cáncer en el organismo humano. Al parecer, ciertos azúcares en la pectina se unen a la [galectina 3](#), una proteína sobre la superficie de las células tumorales que favorece el crecimiento celular y se disemina en el organismo. Por lo tanto, la utilización de pectina como polímero protector de fármacos posee un gran potencial ya que además de cumplir con su función como biopolímero para liberación controlada de fármacos puede cooperar como agente anticancerígeno ([Gunning et al., 2009](#))

### 1.2.2. Alginato

Los alginatos son biopolímeros lineales compuestos de ácido  $\beta$ -manurónico (unidades M) y ácido Q-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 y col., 2001).

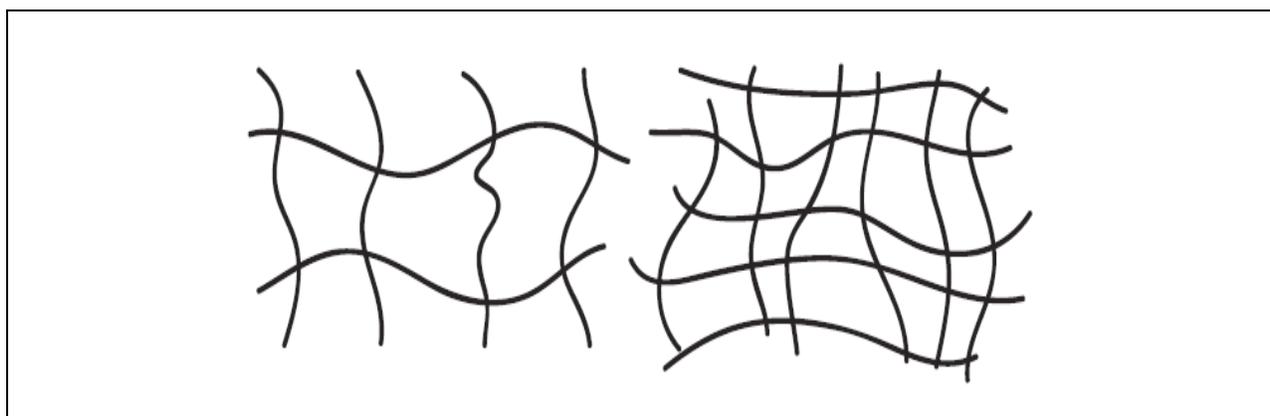
El alginato como hidrogel, posee la capacidad de absorber grandes cantidades de agua y, en presencia de iones multivalentes (*e.g.* calcio, zinc y otros) constituye una red polimérica, proceso que se denomina gelificación iónica. En el caso del alginato, la red polimérica está compuesta de moléculas lineales conectadas entre sí por interacciones iónicas dando lugar a entrecruzamientos denominados comúnmente “caja de huevos” (*egg shell*) (Fig. 2).

**Figura 2.** Plegamiento del alginato: En ausencia de iones divalentes (e.g. calcio), el alginato se pliega formando, cada uno de los bloques constituyentes, hélices mantenidas por puentes de hidrogeno. 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 galurónico.



El grado de entrecruzamiento del gel de alginato está determinado por el catión 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 3.** Efecto de la concentración del polímero sobre la red del hidrogel. Izquierda: baja concentración. Derecha: alta concentración (Neeves ,Student`s Guide)



### 1.2.3. k- Carragenina

Kappa-carragenina (K-C) es un polisacárido aniónico sulfatado, compuesto por cadenas alternantes de  $\alpha$  (1-3)-D-galactosa-4-sulfato y  $\beta$  (1-4)-3,6-anhidro-D-galactosa. Es extraído de algas rojas, es muy utilizado en la industria alimentaria como espesante, gelificante y estabilizante. En presencia de cationes puede formar geles termoreversibles.

Al elevar la temperatura de una solución acuosa de K-C por encima de 60 °C, el polisacárido se hidrata y adopta una forma al azar. Por otro lado, al disminuir la temperatura por debajo de una temperatura crítica se produce la gelificación. A temperaturas superiores a la temperatura de

fusión del gel, los polímeros de la carragenina existen en la solución como espirales aleatorias. Durante el enfriamiento de la solución, una red tridimensional de polímeros es formada, en la cual las hélices dobles constituyen los puntos de unión de las cadenas de polímero. El enfriamiento adicional causa la agregación de los puntos de unión para formar la estructura de gel tridimensional. La presencia de asas en la cadena, así como el número, tipo y posición de los grupos de éster sulfato tienen efectos importantes en las propiedades de gelificación. Ese mecanismo de gelificación es básico para las soluciones de carrageninas tipo kappa e iota. Las sales de potasio o calcio son necesarias para la obtención del gel en agua, pero no son necesarias en leche. Particularmente, la K-C es muy sensible a la presencia de iones monovalentes (Michel, *et al.*, 1997).

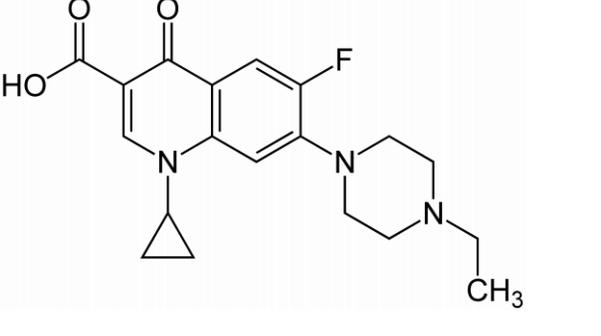
### 1.3. Enrofloxacin

La enrofloxacin (Enro) es una fluoroquinolona utilizada como agente quimioterapéutico, antibacteriano, de uso exclusivo en veterinaria debido a su elevada toxicidad (Mckellar *et al.*, 1996). Las quinolonas son antibióticos conocidos desde los años 60 y desde entonces se ha investigado y sintetizado gran número de ellas con el objeto de aumentar el espectro de acción e incrementar su actividad y así como reducir los efectos tóxicos no deseados. Las quinolonas conforman una familia de antibióticos, en la cual la Enrofloxacin pertenece a la tercera generación. La primera generación poseía actividad sólo contra infecciones urinarias, gastrointestinales y bacterias aerobias Gram-negativas, la segunda y tercera generación se han convertido actualmente en un importante instrumento contra un mayor número de infecciones.

Las quinolonas poseen un amplio espectro clínica de acción, que se basa en su efecto bactericida, por su buena absorción por vía digestiva, amplia distribución en los tejidos, prolongada vida media, prolongado efecto post antibiótico, de lo que resultan planes terapéuticos eficaces y convenientes. Este amplio espectro de actividad permite el tratamiento y uso en una variedad de infecciones dérmicas, respiratorias, urinarias e intestinales. La actividad bactericida de esta droga es concentración dependiente provocando la muerte de los microorganismos a los 20-30 minutos de exposición. El rango de dosificación es de 5 a 20 mg/Kg.

Su mecanismo de acción no se elucidado por completo pero se establecido que actúa inhibiendo la DNA girasa bacteriana (Topoisomerasa II), previniendo así el superenrollamiento y la *síntesis de ADN*. Es efectiva contra: [Pseudomonas aeruginosa](#), [Klebsiella spp.](#), [Escherichia coli](#), [Enterobacter spp.](#), [Campylobacter spp.](#), [Shigella spp.](#), [Salmonella spp.](#), [Aeromonas spp.](#), [Haemophilus spp.](#), [Proteus spp.](#), [Yersinia spp.](#), [Serratia spp.](#), [Vibrio spp.](#), [Brucella spp.](#), [Chlamydia trachomatis](#), [Staphylococcus spp.](#), [Mycoplasma](#), [Mycobacterium spp.](#)

**Figura 4.** Estructura molecular de la Enrofloxacin

 <p>The image shows the chemical structure of Enrofloxacin, a fluoroquinolone antibiotic. It features a central quinolone ring system with a carboxylic acid group (-COOH) at position 6, a fluorine atom at position 8, and a piperazine ring at position 7. The piperazine ring is substituted with a methyl group (-CH3) at the 4-position and a cyclopropyl group at the 1-position.</p>	 <p>Bacterial pathogens attacking respiratory tract. Baytril is a "good first choice" for treating bacterial infections of the respiratory tract.</p>
Estructura molecular de Enrofloxacin	Imagen publicitaria del producto

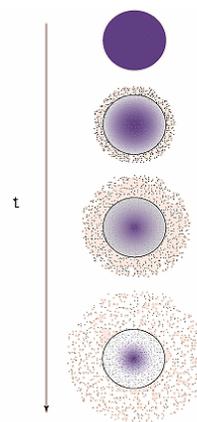
comercializado y patentado por Bayer

### Toxicidad y efectos secundarios de Enrofloxacin

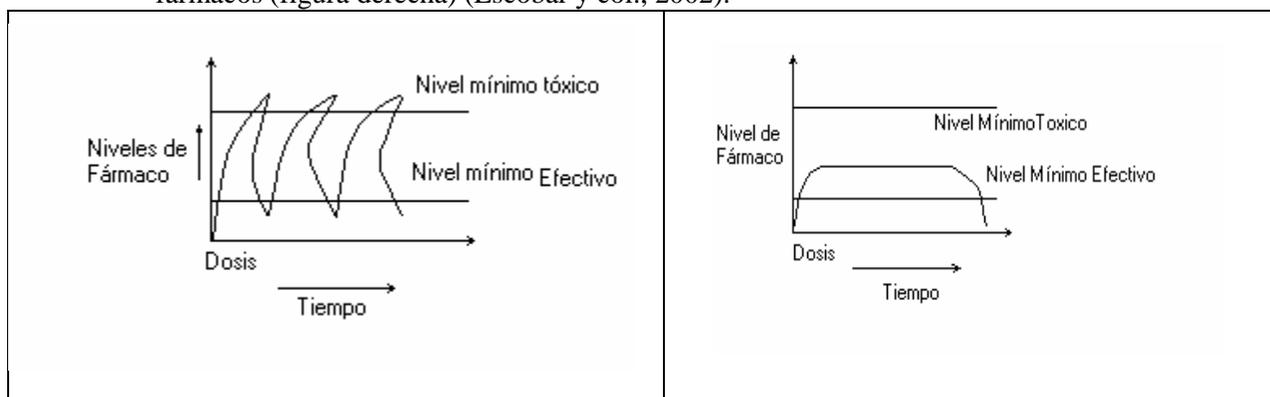
Se han informado efectos tóxicos de las quinolonas sobre los sistemas nervioso, cardiovascular y gastrointestinal del hombre y de los animales, así como condrotoxicidad; toxicidad sobre los procesos de reproducción y el desarrollo, genotoxicidad, carcinogénesis y fototoxicidad (Takayama y col., 1995; Schlüter y col., 1997; Yoshida y col., 1998 ). Debido a las patologías de origen secundario de la enrofloxacin, ha sido prohibido su uso en humanos, aunque se emplea habitualmente en animales como antibiótico de amplio espectro. Por otro lado, la pobre estabilidad de las fluoroquinolonas en orina ácida puede causar cristaluria renal en animales que no estén adecuadamente hidratados (Mckellar *et al.*, 1996). También se ha observado que la enrofloxacin es muy irritante cuando se administra por la vía intramuscular, ocasionando un marcado aumento de la creatina quinasa en suero e inflamación y dolor en el sitio de inyección en algunos casos (Kaartinen y col., 1997). Otro de los casos más severos se da en lo que respecta a degeneración de retina en felinos (Gelatt y col., 2001). Además algunos de los efectos secundarios comunes, en perros, son vómitos, diarrea, aumento de las enzimas hepáticas, ansiedad y depresión (Forney, 2011).

### 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.

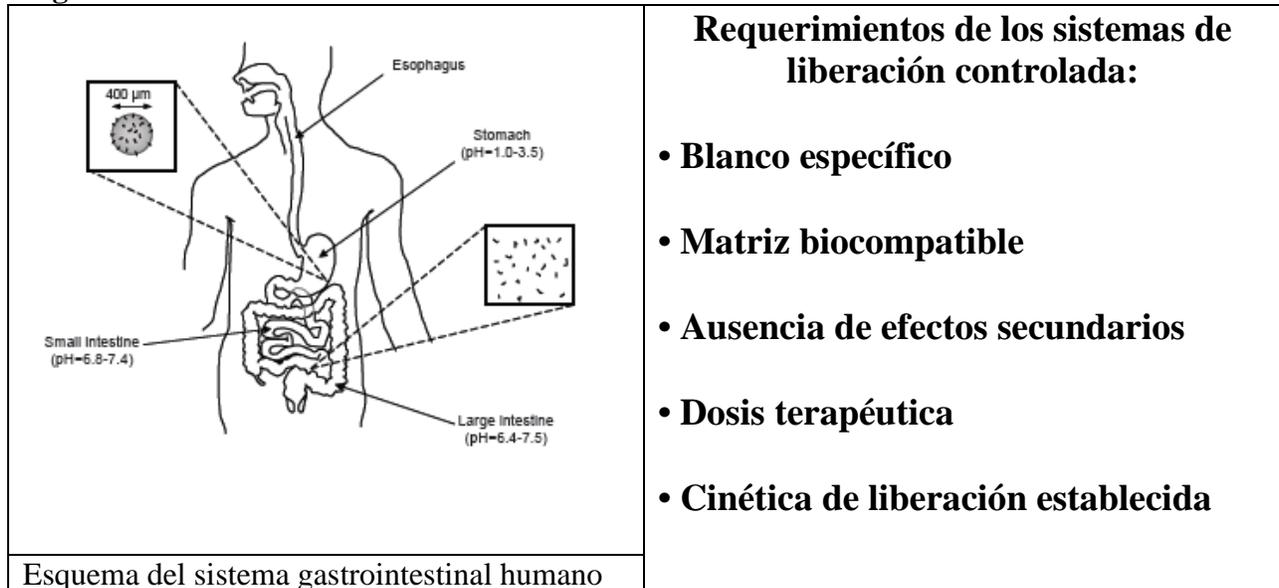


**Figura 5.** Sistemas tradicionales de liberación (figura izquierda) y sistemas de liberación controlada de fármacos (figura derecha) (Escobar y col., 2002).



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

**Figura 6.**



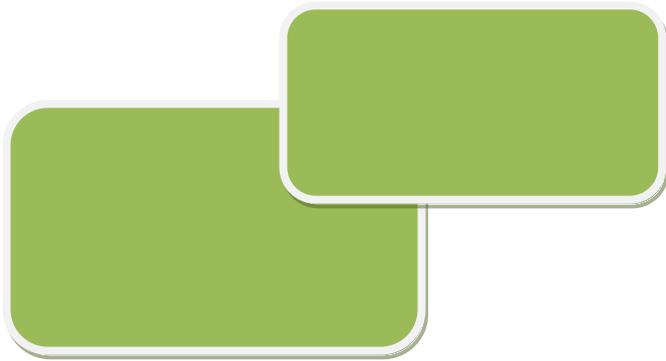
### **1.5. Objetivos**

Los objetivos del presente trabajo han sido:

- 1.- Desarrollar una matriz biopolimérica mediante métodos de gelificación con capacidad de almacenar enrofloxacin.
- 2.- Realizar ensayos de encapsulación en distintas condiciones experimentales (Ej. pH, temperatura).
- 3.- Estudiar los perfiles de liberación de la droga a partir de la formulación matricial elegida en condiciones de simulación gastrointestinal, a saber: pHs 1.2 y 7.4; Temperatura 37°C en ambos pHs.

La finalidad de este trabajo es poder reducir los efectos secundarios y los niveles de toxicidad de la enrofloxacin mediante un sistema efectivo de liberación controlada de la droga basado en biopolímeros inteligentes y mediante la aplicación de un mecanismo de autoensamblado.





# Capitulo II: Materiales y Métodos

## **2.1. Materiales**

Fueron utilizados los siguientes reactivos: enrofloxacin (P.M 359,39, grado de pureza 98%, Sigma-Aldrich, EE.UU.), alginato de sodio (grado industrial, Monsanto, EE.UU.), los polímeros k-carragenina y pectina BM (Bajo Metoxilo, 33 %) fueron provistos por Saporiti y CP Kelco (Argentina), respectivamente. La goma guar carboximetilada (CMGG) fue provista gentilmente por el Prof. Arup Mukherjee (Univ of Calcutta, India).

Los siguientes reactivos: cloruro de calcio dihidratado, ácido acético glacial, acetato de sodio anhidro (Cicarelli Laboratorios), fosfato monobásico de sodio dihidratado, fosfato dibásico de sodio heptahidratado, cloruro de sodio y cloruro de potasio utilizados fueron provistos por Anedra (Buenos Aires, Argentina).

Para realizar los ensayos de encapsulación y liberación se utilizaron los siguientes buffers: Acido acético/acetato (Ac/AcH, 200 mM, pH= 4,0); Clark & Lubs (50 mM, pH=1,2); fosfato (100 mM, pH= 7,4).

Por otro lado, los solventes de calidad analítica utilizados para realizar la selección de la matriz de encapsulamiento fueron los siguientes: etanol (EtOH), etilenglicol, 1-propanol, propilenglicol (Cicarelli Laboratorios)

En el desarrollo de los ensayos de liberación se utilizo un agitador marca Viking (Shaker Pro, Argentina) termostatzado a 37 °C. Se empleó un espectrofotómetro marca Beckman DU640 (EE.UU.) para la cuantificación de enrofloxacin. También se llevo a cabo una caracterización estructural de las esferas biopoliméricas mediante microscopía de fluorescencia (Leica, Alemania).

## **2.2. Procedimiento Experimental**

### **2.2.1. Curvas de calibración y preparación de soluciones estándar de enrofloxacin**

Se preparó una solución estándar de enrofloxacin en un buffer seleccionado para determinar la relación entre absorbancia y concentración. La solución estándar de 10.0 mg/ml de enrofloxacin fue preparada en buffer Ac/AcH (200 mM, pH=4,0), a partir de la misma fueron realizadas diluciones sucesivas hasta obtener las concentraciones deseadas. Previamente fue realizado un barrido espectral de las soluciones para determinar la longitud de onda de máxima absorción ( $\lambda_{max}$ ) de enrofloxacin en el buffer mencionado. Posteriormente, empleando la longitud de onda máxima de absorción se procedió realizar las curvas de calibración de enrofloxacin. 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. Este procedimiento se efectuó para cada uno de los medios en donde fue cuantificada enrofloxacin.

### **2.2.2. Preparación de soluciones de biopolímeros.**

Las soluciones fueron preparadas en buffer Ac/AcH (200 mM), pesando el o los biopolímeros a utilizar en una balanza analítica (Mettler Toledo, Suiza) de manera de obtener la concentración deseada. Posteriormente, se agrego la cantidad correspondiente del buffer y se coloco el volumen de la solución patrón de enrofloxacin necesario para obtener la concentración deseada para cada ensayo. La suspensión resultante fue dejada 12 horas con agitación magnética a 500 rpm (Tianjin Taisite Instrument Co. Ltd., China) a temperatura ambiente hasta disolución total.

### 2.2.3. Ensayos de interacción

Se prepararon 2 tubos de soluciones de alginato, pectina y carragenina al 1,0 % (p/v) en agua destilada (500µl):

- Tubos 1: se les agregó un volumen determinado de una solución stock de enrofloxacin (10 mg/ml) obteniéndose una concentración de 50µg/ml.
- Tubos 2: se les agrega sólo buffer (control).

El procedimiento fue realizado con cada uno de los tres polímeros mencionados precedentemente por duplicado.

Los tubos fueron agitados durante un período comprendido entre 1 y 6 horas. Una vez finalizado el período de agitación, se procede a agregar 1,00 ml de EtOH (96 %), el cual produce la precipitación del polímero. Se homogeniza y posteriormente se centrifuga por 20 min. a 3400g en microcentrifuga y se analiza la concentración de enrofloxacin en el sobrenadante con la respectiva corrección por solvente (EtOH:solucion = 50:50 v/v). El porcentaje de interacción de la siguiente forma:

$$I_{\text{Enrof}} = (C_{\text{total}} - C_{\text{sobr}}/C_{\text{total}}) \times 100 \quad (1)$$

En donde:

$C_{\text{total}}$  = concentración total de enrofloxacin colocada en el tubo de reaccion.

$C_{\text{sobr}}$  = concentración de enrofloxacin en el sobrenadante de EtOH

Adicionalmente, se realizaron cinéticas para determinar la posible interacción entre el antibiótico y los biopolímeros: carragenina y pectina. Los experimentos consistieron en desarrollar los ensayos de interacción descriptos anteriormente pero utilizando una batería de tubos, con sus respectivos controles. Muestras cada 10 min. fueron retiradas por un tiempo total de 60 min. Los ensayos se efectuaron por duplicado para cada uno de los dos polímeros.

### 2.2.4. Ensayos de interacción del polímero seleccionado en función del pH

Se evaluaron las propiedades de interacción entre la droga y la carragenina a dos condiciones de pH distintas: 4,0 en buffer AcH/Ac (200 mM) y a pH=6,2 en buffer MES (100 mM). Los ensayos se realizaron de similar manera que la mencionada en el inciso 2.2.3, con la salvedad que el polímero se solubiliza en un determinado buffer y el tiempo de interacción es de 1 hora. Al igual que en el anterior inciso se realizaron los controles correspondientes a cada ensayo.

### 2.2.5. Desarrollo de microesferas por el método de gelación iónica:

Se gotearon 2,00 ml de la solución polimérica conteniendo enrofloxacin, sobre una solución de 10,00 ml de la solución de gelación, la cual contiene cloruro de calcio (500 mM) y el correspondiente buffer y/o solvente. El experimento se realizó a tiempo constante de goteo (15 min.) en un baño de hielo y con agitación (100 rpm). Las microesferas obtenidas fueron filtradas con una placa filtrante. Al filtrado se le determinó el volumen y la concentración de enrofloxacin residual (no encapsulada) corregida al respectivo pH (el cual varía en el rango de 270 a 280 nm). La cantidad de antibiótico encapsulado queda determinado por la ecuación:

$$\% \text{ Enc} = \frac{Q_0 - (C_r \times V)}{Q_0} \times 100 \quad (2)$$

---

 $Q_0$ 

Donde:

$Q_0$  = Cantidad inicial de ciprofloxacina = enrofloxacina ( $\mu\text{g/ml}$ ) x 2,0 ml = Enrofloxacina ( $\mu\text{g}$ ).

$C_r$  = Concentración de enrofloxacina remanente en la solución filtrada.

V = Volumen de la solución filtrada = 10,0 ml.

En algunos casos, fue agregado glutaraldehído (25,0 %) a la solución de gelación hasta obtener a una concentración final de 2,0 %.

#### 2.2.6. Encapsulamiento en función del pH

Se realizaron ensayos de encapsulamiento con carragenina, pectina BM y alginato. Se determinaron los porcentajes de encapsulación para una solución de carragenina conteniendo enrofloxacina (50,0  $\mu\text{g/ml}$ ) en dos condiciones experimentales de pH:

- pH=1,2 buffer Clark & Lubs conteniendo 500 mM de KCl.
- pH= 4,0 buffer Ac/AcH conteniendo 500 mM KCl.

En el ensayo anterior se reemplazo el agregado de  $\text{CaCl}_2$  como agente entrecruzante por el agregado de KCl.

A continuación, se realizaron los ensayos con coacervados conteniendo alginato o pectina y carragenina, en proporciones 50:50 (v/v). Estas soluciones se sometieron a las mismas condiciones experimentales descritas para carragenina, con la salvedad de reemplazar KCl por  $\text{CaCl}_2$  (500 mM).

Por otro lado, se realizaron ensayos siguiendo el protocolo anterior pero utilizando soluciones de gelación diferentes solventes conteniendo  $\text{CaCl}_2$  (500 mM) para la configuración alginato/carragenina debido a que se la eligió por sus propiedades microscópicas como esfericidad y resistencia mecánica (véase Resultados y Discusión).

#### 2.2.7. Optimización de las condiciones de encapsulamiento de enrofloxacina

Con el fin de optimizar los porcentajes de encapsulación se prosigue a preparar las soluciones de goteo con la utilización de los distintos solventes mencionados en el inciso 2.1. Esta técnica sólo fue realizada para la configuración alginato/carragenina.

Se prepararon las soluciones de solvente conteniendo  $\text{CaCl}_2$  (500 mM). Luego se gotea la solución de polímero-enrofloxacina sobre las distintas soluciones y se evalúan los porcentajes de encapsulación con el fin de elegir la mejor condición experimental.

#### 2.2.8 Ensayos de Saturación

En esta etapa se evalúa la cantidad de antibiótico capaz de encapsularse en la matriz elegida. Se preparan soluciones de alginato/carragenina con distintas concentraciones de enrofloxacina comprendidas entre 25 y 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Posteriormente, se realiza el goteo correspondiente de cada solución y se determinan los porcentajes de encapsulación para cada condición. Los experimentos se realizaron por duplicado.

### 2.2.9. Ensayos de liberación

Se colocan 250 mg de microesferas en un frasco de 5,0 ml de capacidad conteniendo 2,0 mililitros de solución buffer, a continuación se incuban con agitación (100 rpm) a 37 °C. A especificados intervalos de tiempo se extrajeron muestras y se determina la concentración de enrofloxacin. En caso, de ser necesario se procedió a centrifugar la muestra a fin de obtener un sobrenadante límpido. Los experimentos han sido realizados por duplicado.

Se efectuaron controles, a fin de determinar la cantidad de enrofloxacin encapsulada en cada ensayo mediante dos métodos:

- Análisis de sobrenadante
- Degradación: se pesaron 250 mg de microesferas que fueron incubadas en una solución de buffer fosfato (100 mM) bajo agitación constante por 12 hs. La muestra fue centrifugada en microcentrífuga (10.000 xg, 15 min) y se determino la absorbancia del sobrenadante.

Se analizó la liberación de enrofloxacin encapsuladas en matrices de alginato, pectina BM y carragenina en las siguientes soluciones reguladoras que simulan pH intestinal y estomacal respectivamente:

- pH=7,40: Buffer  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (10 mM - 100 mM).
- pH=1,20: Buffer Clark and Lubs (KCl/HCl 100 mM.)

### 2.2.10. Recubrimiento a las microesferas:

Se realizaron a las esferas dos tipos de recubrimientos, a saber:

#### 2.2.10.1. Recubrimiento con polímeros (pectina AM y gomas)

Consiste en una cobertura de pectina de AM (0,1 %) disuelta en agua destilada. Las microesferas resultantes de la gelificación fueron adicionadas a una solución del biopolímero y se las incubó durante 20 min.

#### 2.2.10.2. Recubrimiento con ácido oleico:

El procedimiento fue similar al descrito anteriormente, incubando las esferas en ácido oleico por diferentes períodos de tiempo.

#### 2.2.10.3. Emulsión:

Para la preparación de la emulsión se utilizaron 890  $\mu\text{l}$  de la solución Alg/Carr conteniendo enrofloxacin (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), se le adicionaron 10  $\mu\text{l}$  de tween 80, y por ultimo 100  $\mu\text{l}$  de ácido oleico (el mismo utilizado para hacer los recubrimientos). De esta forma se logra obtener una emulsión cuyo volumen final es de 1,0 ml.

Se prosigue al goteo de la solución sobre propilenglicol (100 %) y en propilenglicol/EtOH (50:50 v/v) ambos conteniendo  $\text{CaCl}_2$  (500mM). Por último se realizan los ensayos de liberación correspondientes como fuera descrito anteriormente.

#### 2.2.10.4. Formulación con Goma guar modificada:

Se preparó una solución de alginato y carboximetil goma guar en una proporción de 7:1 de acuerdo al siguiente procedimiento. Se prepara una solución de alginato (3,5 %) en agua destilada, seguidamente se agrega muy lentamente CMGG, y se agita hasta total disolución. Por

último, se adiciona una solución stock de enrofloxacin (10,0 mg/ml en buffer AcH/Ac) hasta obtener a una concentración de enrofloxacin de 100 µg/ml. Posteriormente, se realiza el goteo sobre una solución conteniendo propilenglicol/EtOH (50:50 v/v) y CaCl<sub>2</sub> (500 mM).

Se evalúa el porcentaje de encapsulación, y se almacenan las esferas con la misma solución de goteo a 5 °C por un periodo de 20 horas (período de maduración). A continuación, se determina la cantidad de antibiótico liberado durante este período y se efectúa la corrección respectiva, determinándose la encapsulación final. Para tal fin, se emplea la ecuación de % de encapsulación corregida, a saber:

$$\% \text{ Enc} = \frac{Q_0 - (C_r + C_m) \times V}{Q_0} \times 100 \quad (3)$$

El parámetro que se adiciona a la ecuación precedente (3) es C<sub>m</sub>, que corresponde a la concentración de antibiótico determinada luego de finalizar el periodo de maduración.

Para finalizar se procede a los ensayos de liberación por duplicado a pH=1,2, de similar manera con que se realizaron con las restantes formulaciones.



# Capitulo III: Resultados y discusión

### **3.1. Interacción de Enrofloxacin con los biopolímeros**

Se evaluó la capacidad de interacción de enrofloxacin con los siguientes biopolímeros: alginato, pectina BM y carragenina. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 2.** Interacción de biopolímeros con enrofloxacin

Biopolímeros (1.0 %)	Porcentajes de unión de enrofloxacin diferentes tiempos (horas)	
	1	6
Alginato	20.3 ± 14.1	20.8 ± 2.9
Carragenina	68.2 ± 4.7	71.3 ± 1.9
Pectina BM	72.3 ± 6.8	71.7 ± 0.6

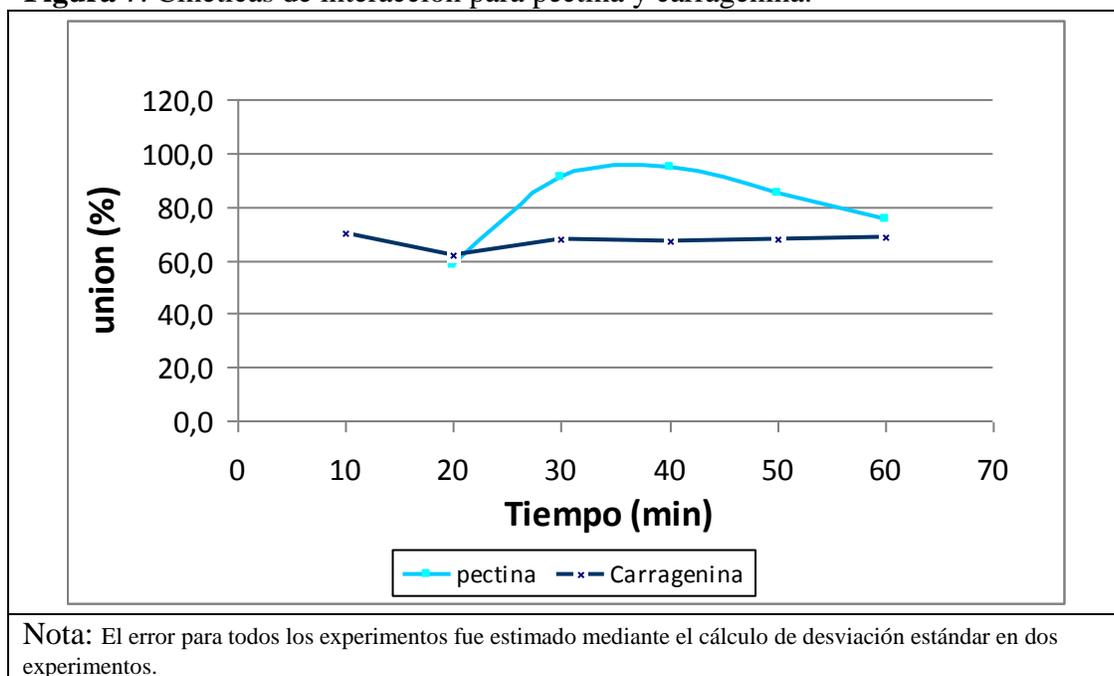
El error para todos los experimentos fue estimado mediante el cálculo de desviación estándar en dos experimentos.

Como se puede observar en la Tabla 2, el grado de interacción para alginato es aproximadamente tres veces menor comparado con los restantes polímeros. Un análisis estadístico permitió establecer que los resultados presentan diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre las interacciones biopolímero-enrofloxacin.

En el caso de la pectina y carragenina, el grado de interacción con la enrofloxacin fue cercano al 70 %, lo que implica una mayor afinidad del antibiótico por estas matrices. Vale aclarar, que el equilibrio de interacción es alcanzado a la hora y no se modifica significativamente a las 6 horas de ensayo ( $p \geq 0.05$ ). Razón por la cual se considera que la interacción es estable en nuestras condiciones experimentales.

Por lo tanto, se planteó necesario determinar la cinética de interacción a tiempos menores a 1 hora, para poner de manifiesto cual es la interacción más eficiente, y principalmente para determinar y justificar cual es el biopolímero que permita desarrollar la matriz más apta para el encapsulamiento de la enrofloxacin. El estudio cinético de interacción de enrofloxacin con pectina BM y carragenina se muestra en el figura 7.

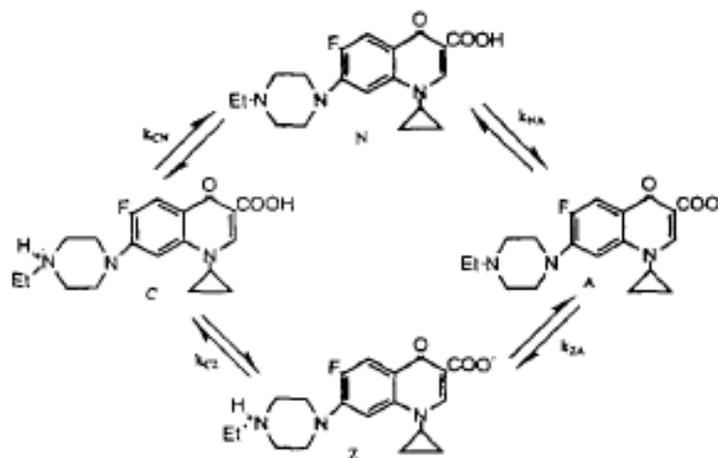
**Figura 7.** Cinéticas de interacción para pectina y carragenina.



Basado en los resultados experimentales de la Figura 7, se decidió continuar los trabajos con carragenina debido a que su interacción con el antibiótico es estable y se observa constante a lo largo del tiempo, lo que implica una mayor estabilidad de la interacción entre la matriz y el antibiótico lo largo del tiempo.

Seleccionada la matriz de carragenina, se procedió a realizar los ensayos de interacción a distintos pHs (descrito en Materiales y métodos) para determinar la interacción entre la matriz y el antibiótico con distintos grados de protonación. El análisis correspondiente se realizó mediante los equilibrios de protonación para la Enrofloxacin presentes en la siguiente figura.

**Figura 8.** Equilibrio químico de enrofloxacin a diferentes pHs.

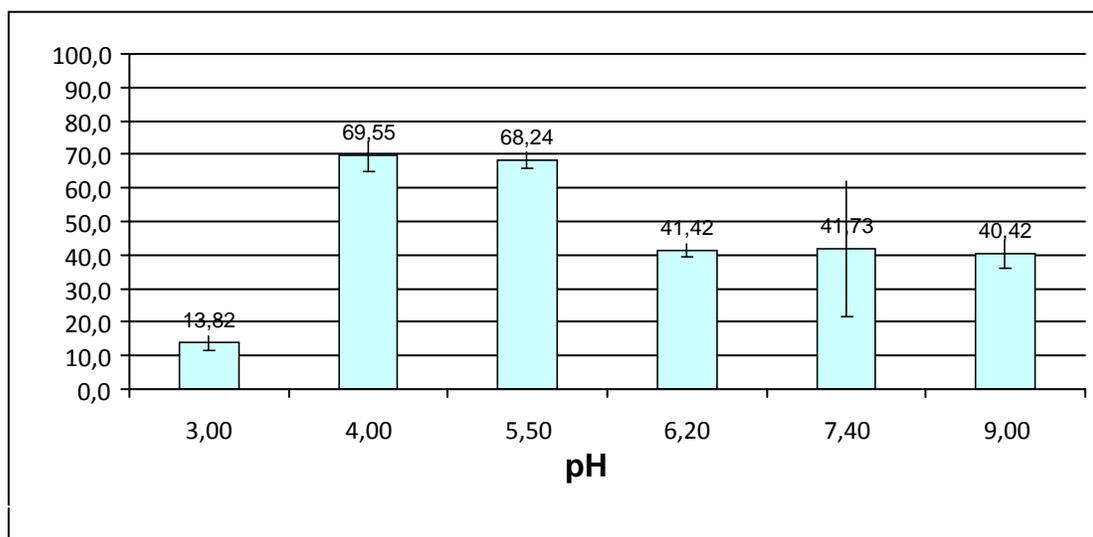


Las especies presentes en la figura anterior representan: N: especie sin carga, C: especie catiónica, A: especie aniónica, y Z: switterion.

Los resultados indican que las mejores condiciones de trabajo fueron a pH 4,0 donde se obtiene un grado de interacción cercano al 70 %.

**Figura 9.** Ensayos de interacción de Carragenina con enrofloxacin a distintos pHs

union



Nota: los ensayos fueron realizados por triplicado o cuadruplicado.

En la figura 9 se observan diferencias significativas para los valores de pH 4.0 y 5.5 respecto de los valores restantes para las interacciones entre enrofloxacin y carragenina. Estas diferencias fueron evaluadas mediante un test T ( $p \leq 0.05$ ). Las diferencias entre los dos valores correspondientes a los máximos pHs (4.0 y 5.5) se analizaron además mediante un test T para intentar discriminar la mejor interacción. Los resultados indican que no existían diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ). En razón de lo expresado, se decidió trabajar a pH= 4,0 (buffer 200 mM Ac/AcH). El resultado es concordante con las concentraciones de las especies presentes como se observa en la Figura 8, la enrofloxacin a pH 4,0 posee el grupo carboxilo protonado ( $pK_a \approx 6.0$ ) así como también el grupo amino ( $pK_a \approx 8.0$ ) con lo cual la molécula posee una carga neta positiva, lo que posibilita una interacción de tipo iónica con los sitios de la cadena polimérica de carragenina cuyos grupos funcionales sulfonato se hallan desprotonados y con carga negativa ( $pK_a \approx 3,0$ ). A pHs mayores a 6,2 se produce la desprotonación del grupo carboxilo de la enrofloxacin, con lo cual la molécula se halla en estado switterion (carga neta cero, figura 2) y no es posible la interacción iónica con la carragenina. A su vez, a pHs menores que 3,0, el grupo sulfonato de la carragenina no se encuentra en su forma ionizada por lo que tampoco es posible la interacción con la enrofloxacin, la cual posee carga neta positiva al mencionado pH.

Las especies de enrofloxacin presentes a distintos valores de pH se pueden expresar a partir de las siguientes ecuaciones:

$$[C] = \frac{[H^+]^2}{[H^+]^2 + K_1[H^+] + K_1K_2}$$

$$[A] = \frac{K_1K_2}{[H^+]^2 + K_1[H^+] + K_1K_2}$$

$$[Z] = \frac{k_{CZ}[C]}{[H^+]}$$

pK<sub>a1</sub>  
pK<sub>a2</sub>

5.94  
8.70

(Lizondo et.al., 1996)

Teniendo los datos anteriores se realizó una tabla para los distintos valores de pH evaluados.

**Tabla 3.** Proporción de las distintas especies de Enrofloxacin dependiendo del pH.

pH	[C]	[N]	[A]	[Z]
3.0	0.999	0	0	0
4.0	0.989	0.011	0	0.011
5.5	0.734	0.266	0	0.249
6.2	0.354	0.644	0	0.601
7.4	0.032	0.922	0.046	0.861
9.0	0	0.334	0.666	0.311

Analizando los valores de la Tabla 3 con el fin de comprender el comportamiento de la enrofloxacin en distintas condiciones de pH. A pH= 3,0, la enrofloxacin se encuentra por debajo del pK<sub>a1</sub> (5.94), por lo que el grupo ácido se encuentra protonado, y predominan las especies moleculares con densidad de carga neta positiva, como se puede observar en la tabla donde la especie catiónica posee una concentración del 99.9 %.

A pH=4,0 comienzan a aparecer las especies con densidad de carga neta nula, especies neutras y switterion de la molécula de enrofloxacin. Esto es debido a que el aumento el pH se acerca al valor de pK<sub>a1</sub>. Igualmente la concentración de la especie catiónica sigue predominando con un 98 %, mientras que a las especies switterion y neutra le corresponde un valor del 1 % a cada una.

A pH= 5.5 nos encontramos prácticamente cercanos al pK<sub>a1</sub>, por lo que se hace mucho más notable la desprotonacion del grupo ácido y también del grupo amino del antibiótico, aunque el pK<sub>a</sub> de este ultimo sea mayor (pK<sub>a2</sub>= 8.70).

Con el valor de pH= 6.2 superamos el pK<sub>a1</sub> y se puede notar un marcado cambio en las concentraciones de las especies presentes, siendo la de la especie catiónica del 35 %, y las especies de densidad de carga neta nula representan el 60 %.

A los dos valores de pH restantes, 7.4 y 9.0, la concentración de la especie catiónica se reduce prácticamente a cero, y predominan las especies con densidad de carga neta nula y aniónica. Siendo la concentración, de esta última mayor cuanto más se acerca el valor de pH al pK<sub>a2</sub>. Este cambio se hace muy notorio a pH= 9,0, en donde la especie dominante es la aniónica (66 %) debido a que las condiciones se encuentran por encima del pK<sub>a2</sub> correspondiente al grupo amino.

En la tabla 4 se exponen los porcentajes correspondientes a las especies moleculares de la enrofloxacin predominante para cada condición de pH.

**Tabla 4:** Especies predominantes a los distintos pHs.

pH	Especies predominantes	Concentración (%)
3.0	Catiónica	99.88
4.0		98.86
5.5		73.35
6.2	Neutra	64.40
7.4		92.18
9.0	Aniónica	66.59

### **3.2. Encapsulación de la Enrofloxacin**

La encapsulación de enrofloxacin fue estudiada a distintos pHs y en presencia de solventes miscibles con agua presentes en una solución de sales de calcio.

A su vez, en razón de que la resistencia mecánica de las microesferas de carragenina es muy baja frente a presiones leves, se desarrollaron coacervados con otros biopolímeros. En este sentido, a la carragenina se le adicione en un caso pectina BM y en el otro alginato, en proporciones 1:1, con el fin de obtener una mayor resistencia mecánica y mejor morfología, lo cual fue corroborado por microscopía óptica (Figura 10).

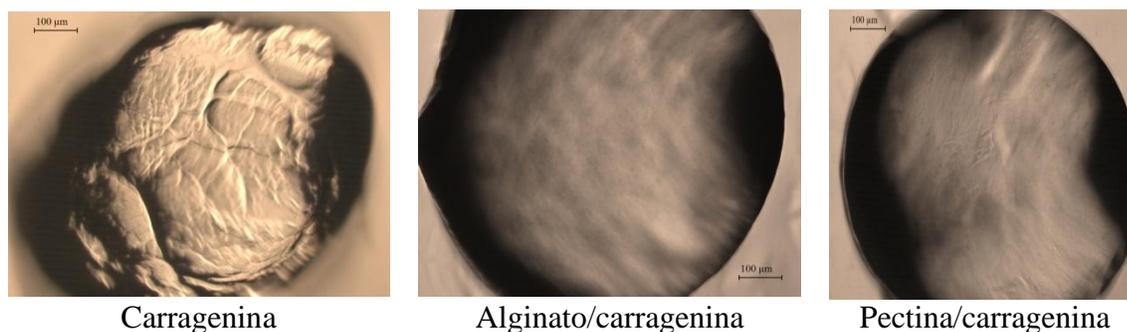
#### **3.2.1. Encapsulación en condiciones seleccionadas de pH**

**Tabla 5.** Porcentaje de encapsulación en distintas condiciones de pH para distintas configuraciones de matriz.

Biopolímeros	Ión (500 mM)	Encapsulación (%)	
		pH = 1.2 (Clark & Lubs)	pH=4,0 (Ac/AcH)
Carragenina	K <sup>+1</sup>	28.2 ± 3.2	37.6 ± 4.0
Pectina/Carragenina	Ca <sup>+2</sup>	36.6 ± 0.5	44.2 ± 1.0
Alginato/Carragenina		38.1 ± 1.5	43.6 ± 4.6

NOTA: El error para todos los experimentos fue estimado mediante el cálculo de desviación estándar sobre un total de dos experimentos

En la Tabla 5 se puede observar un aumento del porcentaje de encapsulación para los sistemas coacervados. Esto puede ser atribuible a una disminución del tamaño de poro debido a las fuertes propiedades de entrecruzamiento de pectina y alginato con iones divalentes. Esto último puede corroborarse debido a que las microesferas son mucho más rígidas y uniformes en estos casos comparados con carragenina, cuya superficie es más rugosa y poco uniforme (Figura 10).

**Figura 10.** Estudios morfológicos de las microesferas mediante microscopía óptica .

Sin embargo, los porcentajes de encapsulación obtenidos fueron cercanos al 40 %. Se debe mencionar que desde el punto de vista industrial, un porcentaje de encapsulamiento del 20 % se considera aceptable para las formulaciones en la industria farmacéutica.

Con el objeto de mejorar el rendimiento de encapsulación se optó por utilizar solventes en la solución de goteo, para modificar las condiciones fisicoquímicas del entorno de encapsulamiento. Esto solo fue realizado para la configuración de Alginato/Carragenina debido a que si bien las diferencias de encapsulación en medio acuoso con la matriz de pectina/carragenina no fueron significativas ( $p \geq 0.05$ ) y las características observadas por microscopía óptica tampoco lo fueron, se observó una mejoría en la rigidez de la matriz conteniendo alginato.

### 3.2.2. Encapsulación de enrofloxacin con soluciones de solventes miscibles con agua

En la tabla 6 se observa la encapsulación de enrofloxacin en un coacervado de alginato-carragenina con solventes.

**Tabla 6.** Porcentaje de encapsulación de enrofloxacin con diferentes mezclas acuosas de solventes conteniendo  $\text{CaCl}_2$  (500 mM).

<b>Solvente (%)</b>	<b>Encapsulación (%)</b>	<b>(S<sub>v</sub> - A<sub>agua</sub>)</b>
Agua (100)	43.6±4.6	0.0
Etanol (20.4)	64.0 ± 1.8	20.4
Etilenglicol (23.3)	66.9 ± 1.6	23.3
Propanol (13.8)	57.4 ± 1.9	13.8
Propilenglicol (46.5)	<b>90.1 ± 3.0</b>	46.5

NOTA: El error para todos los experimentos fue estimado mediante el cálculo de desviación estándar sobre un total de dos experimentos. S<sub>v</sub>: encapsulación en solución con el solvente correspondiente. A<sub>agua</sub>: encapsulación en solución con agua.

En la tabla 6 se observa un marcado aumento de la encapsulación de enrofloxacin en presencia de diversas soluciones de solventes comparado al encapsulamiento en solución acuosa. Este resultado permitió determinar las mejores condiciones para garantizar una elevada encapsulación. La solución de propilenglicol presentó el mayor grado de encapsulamiento, duplicando al obtenido en agua.

### 3.2.3. Conclusiones y elección de las condiciones óptimas de encapsulación

Debido a la hidrofiliidad de enrofloxacin, la utilizaci3n de solventes org3nicos en soluciones de gelificaci3n mejor3 la retenci3n del antibi3tico en la matriz biopolim3rica. Las soluciones de goteo obtenidas en estos solventes y el ion divalente  $Ca^{+2}$  permiten una r3pida gelaci3n de la matriz. Adem3s, el retardo difusional de la enrofloxacin mientras se produce el entrecruzamiento, como consecuencia de la baja solubilidad del antibi3tico y de la matriz en estos solventes garantizan valores elevados de encapsulamiento. En conclusi3n se eligi3 el propilenglicol como la soluci3n 3ptima de gelaci3n debido a que nos garantiza aproximadamente un 90 % de enrofloxacin encapsulada en las microesferas.

### 3.3. Ensayo de saturaci3n

Una vez seleccionada la matriz y las condiciones 3ptimas de encapsulaci3n de enrofloxacin, se procedi3 a realizar ensayos de saturaci3n con la finalidad de evaluar la posible interferencia del antibi3tico en el proceso de gelificaci3n del coacervado. El objetivo fue determinar que concentraci3n de enrofloxacin m3xima que se podr3a utilizar sin interferir con la estabilidad de la matriz, para luego ajustar par3metros de liberaci3n para obtener las dosis terap3uticas.

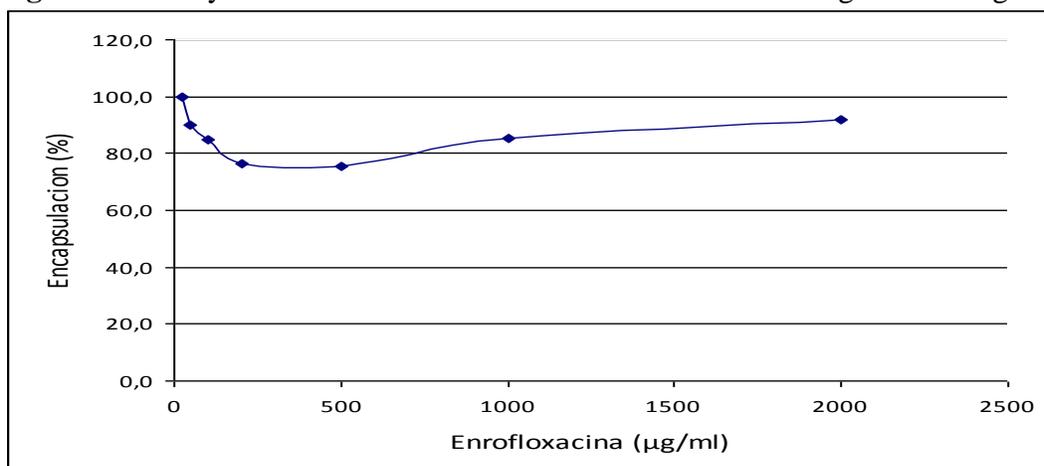
Las experiencias se realizaron seg3n lo descrito en Materiales y M3todos, los resultados se muestran a continuaci3n:

**Tabla 7.** Encapsulaci3n vs. Concentraci3n de Enrofloxacin

Enrofloxacin ( $\mu\text{g/ml}$ )	Encapsulaci3n (%)
25	100.0 $\pm$ 0.0
50	90,1 $\pm$ 3.0
100	84,8 $\pm$ 4.4
200	76,5 $\pm$ 1.0
500	75,6 $\pm$ 1.0
1000	85,4 $\pm$ 0.3
2000	91.8 $\pm$ 0.4

NOTA: El error para todos los experimentos fue estimado mediante el c3lculo de desviaci3n est3ndar sobre un total de dos experimentos, a excepci3n de la concentraci3n 50  $\mu\text{g/ml}$  que se realizo por cuadruplicado.

**Figura 11.** Ensayos de saturaci3n de enrofloxacin en la matriz alginato-carragenina.



NOTA: El error para todos los experimentos fue estimado mediante el c3lculo de desviaci3n est3ndar sobre un total de dos experimentos.

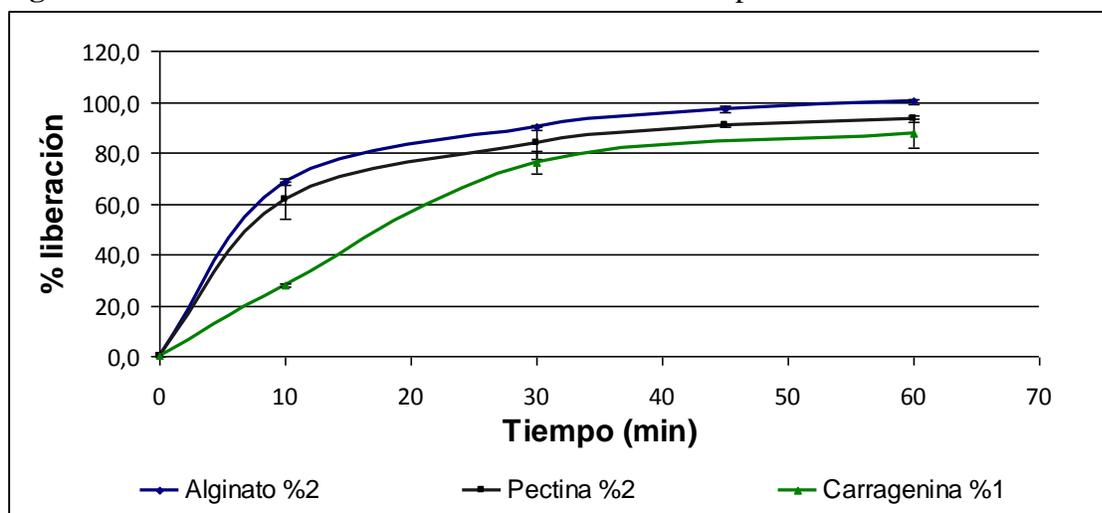
A concentraciones menores a 500µg/ml de enrofloxacin se observa una tendencia de reducción de los porcentajes de encapsulación a medida que la concentración de antibiótico va en aumento, esto se puede atribuir a una saturación de la matriz y/o a la interferencia del antibiótico en el proceso de gelificación. A concentraciones mayores la encapsulación aumenta y esto puede ser atribuido a la capacidad que tienen las quinolonas a apilarse, lo que aumenta la encapsulación y dificulta la liberación y actividad de la droga. Teniendo en cuenta las dosis terapéuticas (ver adjunto de dosis terapéutica), el ensayo nos brinda la posibilidad de elegir la concentración deseada para alcanzar dicho nivel inhibitorio del antibiótico, dado que los porcentajes de encapsulación se mantiene en el orden del 80 % o superiores. Se procedió a continuar con los ensayos con una concentración de 50 µg/ml, para facilitar la medida analítica en los ensayos de liberación y asegurarse que no haya problemas de solubilidad en el tiempo de liberación.

### **3.4. Ensayos de liberación de Enrofloxacin**

#### **3.4.1. Liberación de Enrofloxacin utilizando los distintos biopolímeros**

A continuación se presentan las cinéticas de liberación de enrofloxacin (50 µg/ml) para los biopolímeros solos, teniendo como objetivo observar las diferentes cinéticas.

**Figura 12.** Cinética de liberación de enrofloxacin en biopolímeros



NOTA: El error para todos los experimentos fue estimado mediante el cálculo de desviación estándar sobre un total de dos experimentos

En la figura 12 se pueden observar los perfiles de liberación correspondientes a los polímeros a pH=1,2 y 37 °C. Los estudios se realizaron para determinar si existía una diferencia significativa entre la liberación de enrofloxacin encapsulada en alginato y pectina comparados con la matriz de carragenina, la cual cabe recordar había sido seleccionada por presentar elevada interacción con el antibiótico. La capacidad de interacción entre la matriz y la molécula cargo podría ser la responsable de disminuir las velocidades de liberación al medio.

En los resultados se observa una menor liberación de la enrofloxacin en el tiempo para la carragenina. La matriz de pectina le sigue en el orden de retraso de liberación de enrofloxacin, al igual que lo hizo en el orden de capacidad de interacción con el antibiótico.

Sin embargo, cuando se realizaron ensayos de gelificación de enrofloxacin empleando una matriz de carragenina se observó que las propiedades físicas de las esferas no eran adecuadas para su uso debido a que no se obtenía esfericidad en las partículas y presentaban una elevada fragilidad al stress mecánico (este último ensayo se determinó cualitativamente presionando las microesferas y observando la resistencia que imponían a la rotura). La pérdida de esfericidad e irregularidad morfológica de las partículas no permiten establecer de manera fehaciente las cinéticas de liberación y/o presentan significativas diferencias entre lotes, y por otro lado su fragilidad hace que sea muy limitada la posibilidad de almacenamiento, de dudosa administración por vía oral. En base a lo expresado, se ensayaron coacervados con diferentes biopolímeros capaces de gelificar en presencia de iones. Los coacervados obtenidos posibilitaron la obtención de partículas esféricas determinado por microscopía (Figura 10) y aumentaron la resistencia mecánica de las mismas.

#### 3.4.2. Liberación de Enrofloxacin a pH=1.2, utilizando una matriz de alginato-carragenina (1:1)

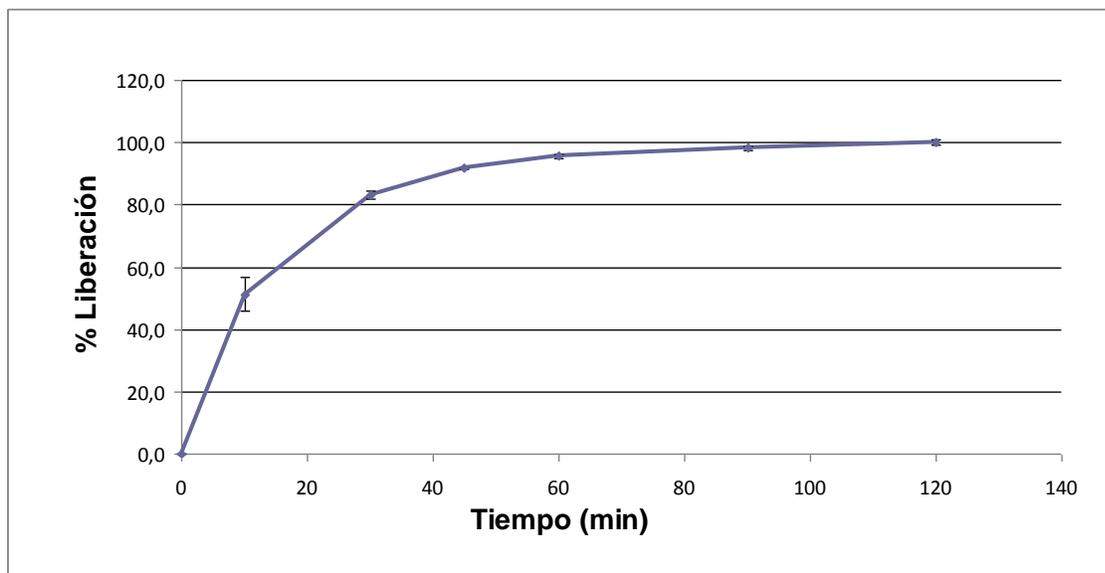
Se llevó a cabo un estudio de liberación de la formulación nombrada en condiciones de pH= 1.2 (gástrico). Se quería determinar si las microesferas eran capaces de mantener su integridad en estas condiciones experimentales y contener al antibiótico en su interior simulando *in vitro* las condiciones ambientales del estómago (pH 1,2 y 37 °C).

**TABLA 8.** Cinética de liberación de enrofloxacin en una matriz de alginato-carragenina a pH= 1,2.

Tiempo (min)	Liberacion (%)
0	0 ± 0
10	51.2 ± 5.4
30	83.1 ± 1.5
45	91.7 ± 0.2
60	95.6 ± 0.6
90	98.2 ± 0.6
120	100 ± 0.8

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 ( $\sigma$ ).

**Figura 13.** Curva de liberación de Enrofloxacin encapsulada en una matriz de alginato/carragenina a pH=1,2



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 ( $\sigma$ ).

En la figura 13 se observa una curva de liberación de enrofloxacin de características hiperbólicas. En la misma se pueden diferenciar dos etapas: una rápida de liberación de enrofloxacin hacia el medio circundante sin degradación observable de las microesferas (que fuera determinado por microscopía óptica, datos no mostrados). 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 85 % de la droga. A continuación de la cual, 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 Enrofloxacin comenzaría a ser gobernado por mecanismos mixtos de erosión y difusión, el cual se alcanza en un lapso de 2 horas aproximadamente el 100 % de liberación del contenido de Enrofloxacin encapsulado en las microesferas

El perfil de liberación observado en la Figura 13 no es el deseado debido a que el antibiótico se libera con demasiada velocidad, de manera que gran parte del antibiótico sería liberado y degradado en el estómago (pH= 1,2). En este sentido, se realizaron experimentos tendientes a reducir la liberación en medio ácido mediante procesos de optimización de la matriz.

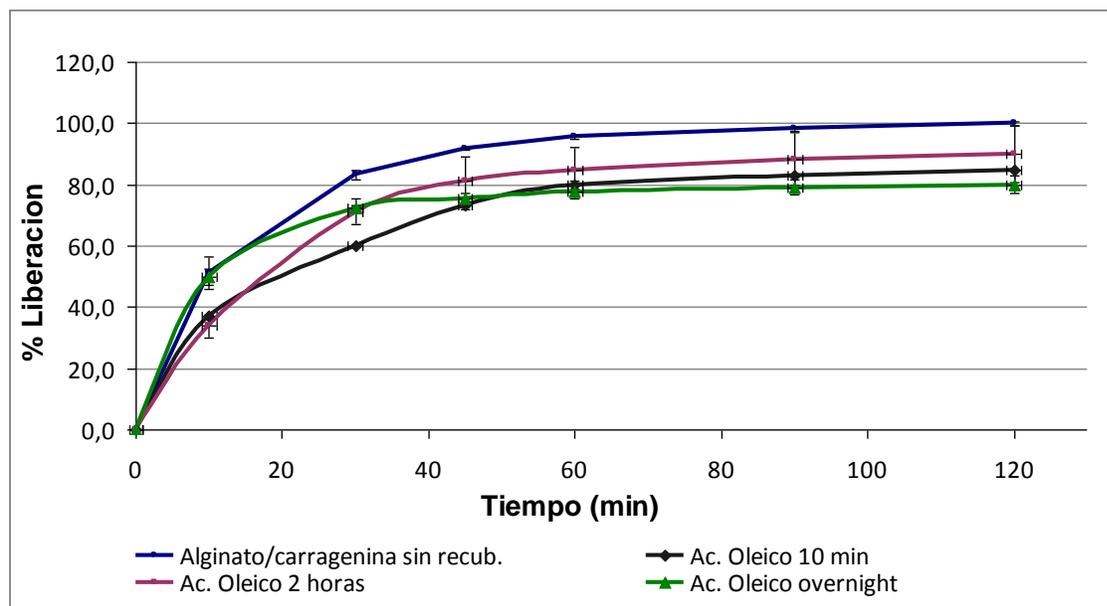
### 3.4.3. Optimización de la capacidad de liberación

#### 3.4.3.1. Recubrimiento con ácido oleico.

En función de lo mencionado precedentemente se procedió a desarrollar recubrimientos en las microesferas capaces de brindar una barrera física adicional. Para tal fin, se realizaron incubaciones de las microesferas de alginato/carragenina en ácido oleico. Esta técnica se desarrolló para brindar una capa hidrofóbica que funcionaría como la barrera física buscada, de manera de retardar los procesos difusionales de enrofloxacin al medio acuoso. En la figura 14 se presentan los perfiles de liberación para la matriz de alginato/carragenina preparada, como ya se

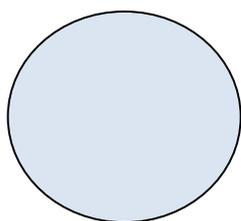
mencionó, incubando las microesferas por distintos periodos de tiempo en ácido oleico con el fin de formar un recubrimiento.

**Figura 14.** Cinética de liberación de Enrofloxacin a pH=1,2, utilizando la matriz alginato-carragenina con recubrimiento de ácido oleico.

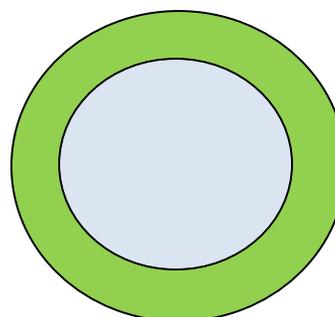


Los resultados mostrados representan la media aritmética de un experimento realizado por duplicado. El error experimental fue determinado mediante el cálculo de la desviación estándar ( $\sigma$ ).

No se observaron diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ) entre los distintos tiempos de incubación con el ácido oleico. Por otro lado, se observó una disminución en los perfiles de liberación observándose que en todos los casos se llega a un 80 % de liberación de enrofloxacin a las dos horas. En los ensayos sin recubrimiento se llegó a un 100 % de liberación tan solo en una hora de incubación en las condiciones de pH=1.2, (Figura 14). La capa de ácido oleico es laxa, por lo cual como proyección se podría plantear el entrecruzamiento en su superficie con agente de entrecruzamiento (*e.g.* glutaraldehído).



Microesfera sin recubrimiento 100 % de enrofloxacin liberada en 60 minutos



Microesfera con recubrimiento de ácido oleico 80 % de enrofloxacin liberada en 60 minutos

A pesar de los positivos resultados obtenidos, se deseaba reducir las velocidades de liberación de enrofloxacin por lo que se continuaron realizando ensayos de recubrimiento con otras moléculas: se llevaron a cabo recubrimientos con pectina y goma guar.

### 3.4.3.2. Recubrimientos con pectina y goma guar.

La pectina, por su parte, posee propiedades de entrecruzamiento a pHs ácidos por lo que fue seleccionada como candidata para el recubrimiento debido a que el pH ácido del ensayo ayudaría a que esta gelifique provocando una disminución de los poros de la matriz. Por otro lado, la Goma Guar es ampliamente utilizada en la industria farmacéutica y posee propiedades de gelificación similares a las de los polímeros utilizados hasta el momento. En la tabla 9 se muestran los resultados de este ensayo de liberación.

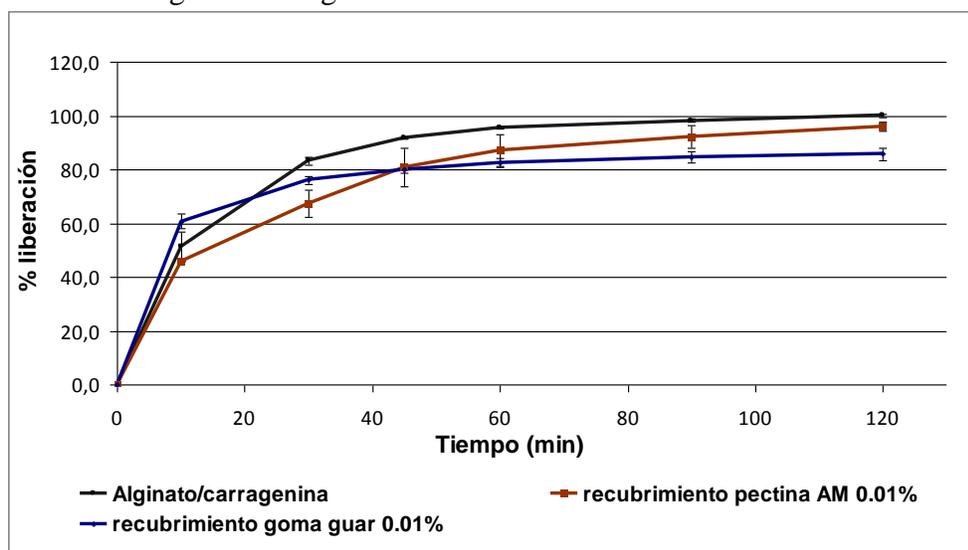
**Tabla 9.** Porcentaje de liberación de Enrofloxacin a pH=1.2, utilizando la formulación alginato/carragenina con recubrimientos de Pectina AM (0.01 %) y de goma guar por un periodo de 20 min.

Tiempo (min)	Pectina	Goma guar
0	0 ± 0	0 ± 0
10	46.0 ± 12.6	60.8 ± 2.7
30	67.4 ± 7.5	76.0 ± 1.3
45	80.7 ± 5.5	80.0 ± 1.2
60	87.1 ± 6.7	82.6 ± 1.7
90	92.3 ± 8.5	84.5 ± 2.0
120	95.9 ± 11.0	85.7 ± 2.3

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 ( $\sigma$ ).

Se observa en la Tabla 9 que el antibiótico se sigue liberando rápidamente, además el inconveniente con la realización de los recubrimientos biopoliméricos ensayados es que, durante el tiempo que se deja a las microesferas incubando con la solución de pectina y goma guar para la maduración de los recubrimientos, la enrofloxacin difunde desde la matriz. A continuación se muestran los perfiles de liberación comparativos para la formulación elegida de alginato-carragenina con y sin recubrimientos:

**Figura 15.** Efecto del recubrimiento de pectina y goma guar sobre la formulación alginato/carragenina.



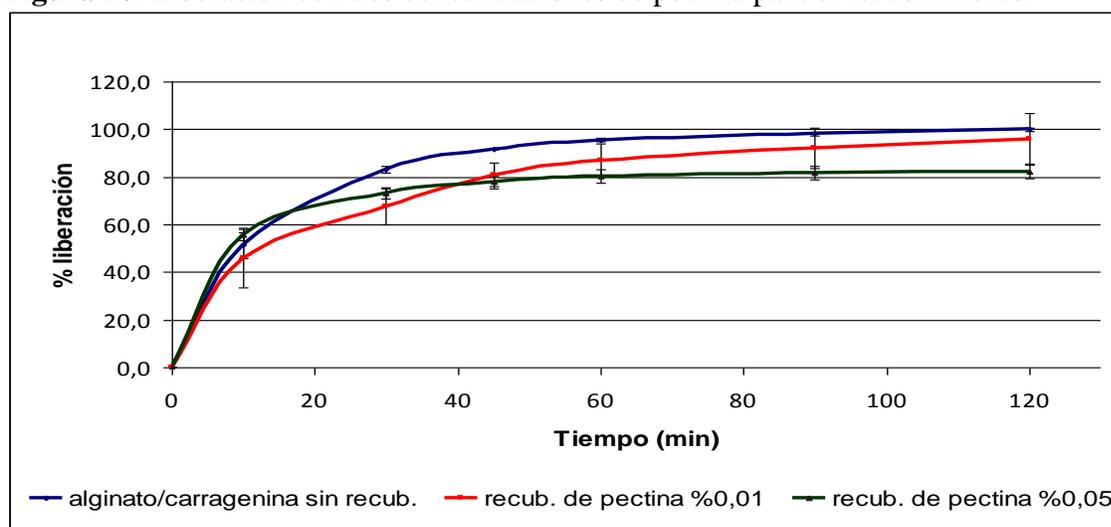
Nota: Los resultados mostrados representan la media aritmética de un experimento realizado por duplicado. El error experimental fue determinado mediante el cálculo de la desviación estándar ( $\sigma$ ).

En la figura 15 no se observan diferencias en los perfiles de liberación de enrofloxacin en las formulaciones recubiertas con biopolímeros con respecto a la matriz originaria con desviaciones estándar menores al 10 % en ambos casos.

Teniendo en consideración la reducción de los tiempos de liberación obtenidos con el recubrimiento de ácido oleico, se planteó la hipótesis de realizar una emulsión entre esta molécula y los polímeros, esto podría brindar un medio hidrofóbico al interior de la matriz que permita retrasar la difusión de enrofloxacin.

#### 3.4.3.3. Efecto del aumento de la concentración de polímero de recubrimiento.

**Figura 16.** Liberación con dos concentraciones de pectina para el recubrimiento.



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 ( $\sigma$ ).

Se observa en la figura 16 una disminución del perfil de liberación al incrementar la concentración de biopolímero utilizado como recubrimiento, debido a que es mayor el polímero capaz de adherirse a la superficie de la microesfera y en consecuencia se disminuye la porosidad superficial, aumentando barrera física que impide la difusión de enrofloxacin hacia el exterior de la matriz.

#### 3.4.3.4. Emulsiones

Se estudiaron los perfiles de liberación correspondientes a la emulsión de alginato y ácido oleico gelificada en Propilenglicol (100 %) y en una solución de Propilenglicol y etanol (50:50). El motivo de la mezcla de solventes se debe a que al efectuar el proceso de gelificación en la solución de propilenglicol debido a su elevada viscosidad (a 25°C 40.1η (mPa s)), no se llegaban a formar la esferas. El agregado de etanol permitió obtener mejores morfologías de las microesferas. Por otro lado, el agregado de etanol provocaba una disminución del porcentaje de encapsulación por el comportamiento observado en la selección de solventes expuesto anteriormente (Tabla 6). Esto se pudo corroborar midiendo la capacidad de encapsulación para estos dos procedimientos:

**Tabla 10.** Porcentajes de encapsulación de Emulsión en distintas condiciones

<b>Emulsión</b>	<b>Encapsulación (%)</b>
PG (100)	100.0
PG:EtOH (50/50)	87.7

Una vez seleccionadas las condiciones experimentales de gelificación de las esferas de emulsión se prosiguió a estudiar la liberación de enrofloxacin a pH= 1,2, de acuerdo al protocolo mencionado previamente. Se observan dos perfiles de liberación para cada una de las condiciones anteriormente mencionadas. Se realizaron los dos ensayos de liberación debido a que se quería observar si la mejor morfología obtenida con el agregado de etano (EtOH) modificaba de una manera visible la velocidad de liberación.

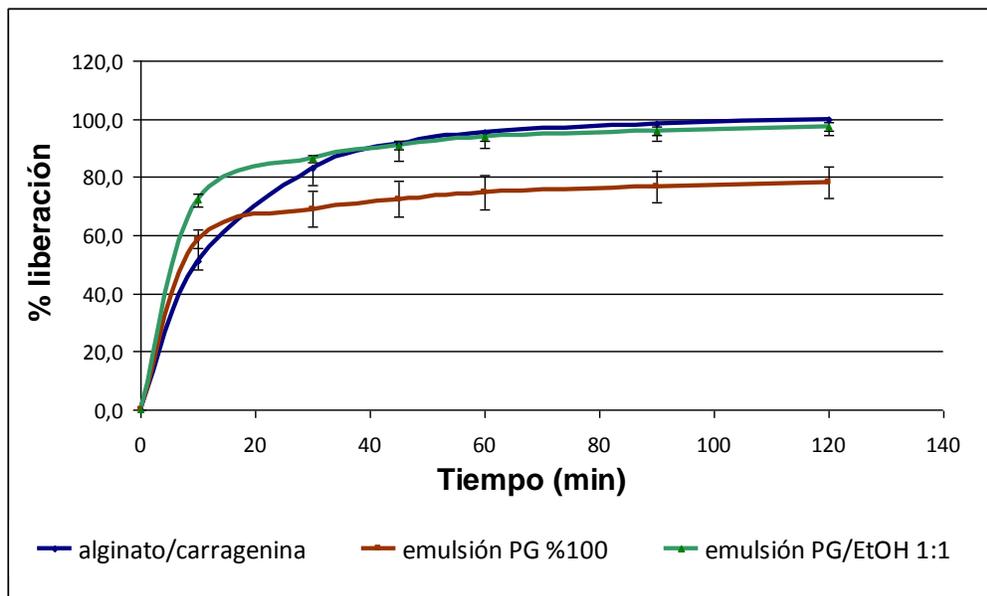
**Tabla 11.** Liberación de enrofloxacin de diferentes formulaciones emulsionadas

Tiempo	Liberación de Enrofloxacin (%)		
	Emulsión		Alg/Carr
	PG (100 %)	PG:EtOH (50-50 %)	PG (100 %)
0	0±0	0±0	0±0
10	58,7±3.2	72,2±2.1	51,3±5.4
30	69,0±6.2	86,3±1.1	83,2±1.5
45	72,4±6.1	90,9±1.4	91,7±0.2
60	74,7±5.8	93,8±1.4	95,6±0.6
90	76,7±5.6	95,8±1.5	98,2±0.6
120	78,0±5.4	97,6±1.5	99,9±0.8

NOTA: El error para todos los experimentos fue estimado mediante el cálculo de desviación estándar

En la tabla 11, se hace referencia a la liberación de enrofloxacin observada en la configuración inicialmente seleccionada de alginato/carragenina formando parte de la emulsión, con el objeto de poder comparar los resultados obtenidos. Una visión más versátil de los mismos se puede obtener en el siguiente grafico que muestra los datos de esta misma tabla:

**Figura 17.** Comparación de las cinéticas de liberación de enrofloxacin en la emulsión a dos concentraciones distintas de PG.

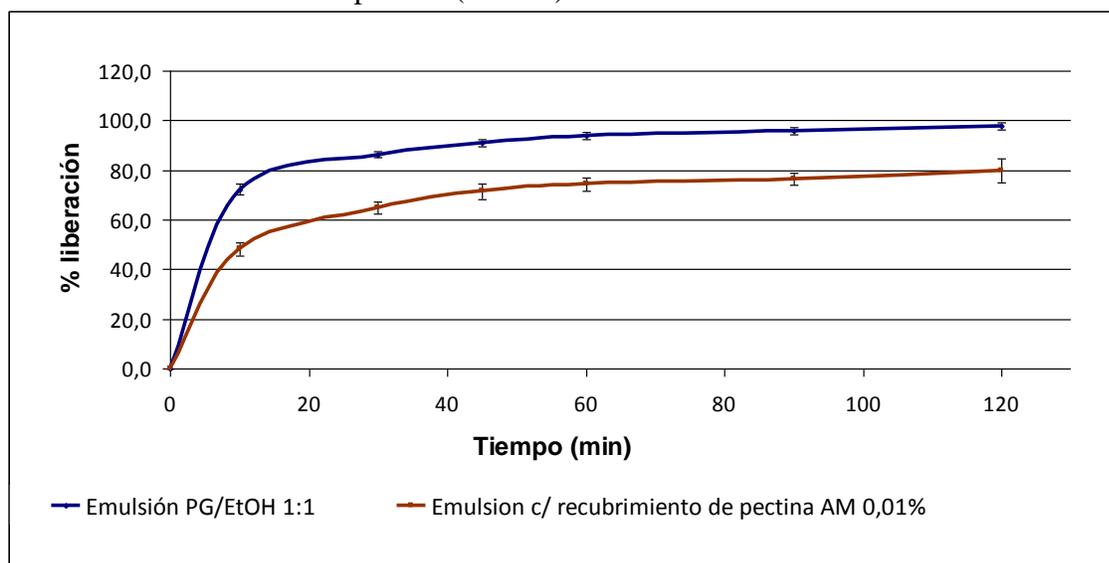


Los resultados mostrados representan la media aritmética de un experimento realizado por duplicado. El error experimental fue determinado mediante el cálculo de la desviación estándar ( $\sigma$ ).

Se puede observar en la Figura 17 que la emulsión previene parcialmente la liberación de enrofloxacin, debido a que se reducen los porcentajes de liberación del antibiótico, cuyos mejores resultados se observan en el sistema PG (100 %). Sin embargo y con fines predictivos se procedió a continuar trabajando con la solución de gelificación de PG y EtOH, debido a que la morfología y estructura de las microesferas era muy superior.

La etapa posterior fue realizar un recubrimiento a la emulsión con pectina en razón de que habíamos observado una mejora en los perfiles de liberación en los ensayos mostrados anteriormente (Vease tabla 9, figura 16)

**Figura 18.** Cinética de liberación de enrofloxacin de las partículas sometidas a un recubrimiento con solución de pectina (0.01 %).



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 ( $\sigma$ ).

En la figura 18 se observa un marcado efecto de retardo debido a la acción del recubrimiento de pectina. Sin embargo, los valores de liberación de enrofloxacin experimentales son elevados comparados con los reportados en la bibliografía. (LinShu L. *et al.*, 2003; Viness Pillay *et al.*, 1999; Graeme S. M. *et al.*, 1999; Wakerly Z. *et al.*; 1997).

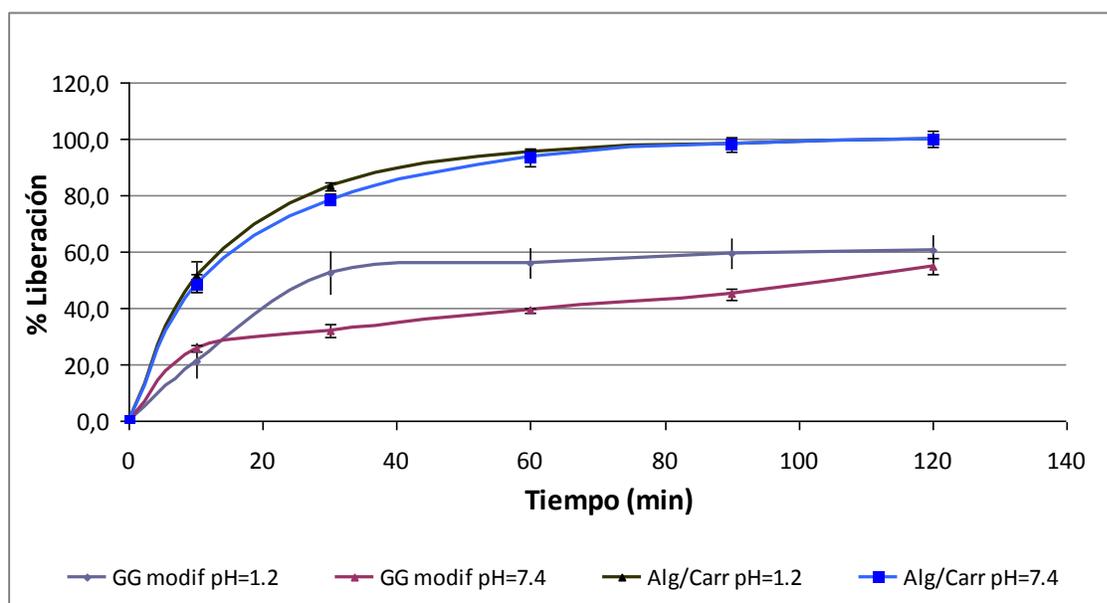
### 3.4.3. Goma Guar carboximetilada (CMGG)

El procedimiento involucra la disolución de CMGG de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. La CMGG posee una gran solubilidad en agua, lo que permite superar una de las principales desventajas de la Goma Guar. Lo que posibilita realizar soluciones poco viscosas y de fácil preparación. Se observó que la CMGG presenta una alta capacidad de interacción con la enrofloxacin, debido a cambios fisicoquímicos de la solución de GG en presencia del antibiótico (datos no mostrados), lo que se presume tendrá una correlación en el retardo de la liberación de enrofloxacin durante el proceso de liberación. En tal sentido se realizaron los ensayos de liberación a pH=1,2 y 7,4; los resultados se muestran a continuación en la tabla 12.

**Tabla 12.** Liberación de enrofloxacin para la formulación con CMGG a diferentes pHs.

TIEMPO (min)	Liberación de Enrofloxacin (%)	
	pH=1,2	pH=7,4
0	0±0	0±0
10	21.3±6.5	25.6±1.1
30	52.7±8.0	32.1±2.3
60	56.2±5.6	39.2±1.0
90	59.4±5.6	44.9±1.8
120	60.8±5.6	54.7±2.8

NOTA: El error para todos los experimentos fue estimado mediante el cálculo de desviación estándar sobre un total de dos experimentos

**Figura 19.** Liberación de enrofloxacin de la formulación conteniendo GGCM en dos condiciones de pH.

NOTA: El error para todos los experimentos fue estimado mediante el cálculo de desviación estándar sobre un total de dos experimentos

Los resultados experimentales de la Figura 19 muestran una reducción la cantidad de enrofloxacin liberada en función del tiempo





# Capitulo IV: Conclusiones y perspectivas

### Conclusiones

Se evaluó la capacidad de interacción entre la enrofloxacin y diferentes biopolímeros. Se logro una alta interacción con la carragenina de aproximadamente un 70 % y se llego al equilibrio de forma muy rápida, el cual además se mantiene en el tiempo como se demostró con las cinéticas de interacción.

Posteriormente, se prosiguió con la evaluación de la capacidad de encapsulación de enrofloxacin en esta matriz en distintas condiciones. En soluciones acuosas de distinto pH se obtuvieron valores de encapsulación menores al 50 %. Este valor de encapsulación no es satisfactorio, por lo que se decidió continuar con una etapa de optimización de la encapsulación, para lo cual se utilizaron distintos solventes como soluciones de goteo. En esta etapa se lograron mejorar los porcentajes de encapsulación hasta llegar a un valor del 90 % utilizando propilenglicol. Las microesferas realizadas en presencia de este solvente fueron las elegidas para realizar los ensayos posteriores. Sin embargo, dichas microesferas tenían propiedades estructurales poco deseables como muy poca uniformidad en su superficie y poca esfericidad. Sabiendo que esto podía llegar a afectar negativamente las características de las cinéticas de liberación de la enrofloxacin se llevo a cabo un proceso de reformulación de la solución biopolimérica, utilizando coacervados de alginato y carragenina, y también de pectina (bajo metoxilo) y carragenina. Para estas mezclas se llevaron adelante los ensayos de encapsulación dando valores similares a las de la carragenina sola. Por otro lado, se observaron las propiedades estructurales por microscopia electrónica, mostrando superficies mucho mas uniformes y buena esfericidad. De estas dos optimizaciones se eligió la formulación alginato-carragenina por poseer una mayor rigidez estructural. Luego se pudieron realizar ensayos de saturación de la matriz con la droga y se observo una buena capacidad para encapsular distintas cantidades de Enrofloxacin, es decir, los porcentajes de encapsulación se mantuvieron por encima del 80 % para el rango de concentraciones 25-2.000 µg/ml.

Una vez seleccionadas las condiciones más convenientes para realizar los ensayos de liberación, nos avocamos a ello. Los resultados iniciales nos obligaron a desarrollar una etapa de optimización progresiva debido a que no era eficiente una matriz que liberase el antibiótico al medio tan rápidamente, dado que el 100 % de la droga encapsulada se liberaba en no menos de 60 min.

El periodo de tiempo considerado de residencia en el estomago estimativo considerando que el tiempo máximo promedio en que una sustancia permanece en el estomago es de 120 min, luego esta pasa a la primera porción del intestino delgado. Además, la idea era obtener una liberación en el tiempo de la droga en el intestino mismo. Esto permitiría un suministro gradual de la enrofloxacin en el lugar donde mayormente es absorbida.

Los intentos por disminuir las velocidades de liberación en condiciones gástricas se llevaron a cabo utilizando distintas herramientas que permitiesen retardar la difusión como las emulsiones, para aumentar la hidrofobicidad de la matriz y de esta forma generar un ambiente en donde la enrofloxacin difunda a una menor velocidad desde la misma, y los recubrimientos con varios polímeros: pectina alto metoxilo, goma guar, ácido oleico o agentes entrecruzantes como glutaraldehído, para disminuir la porosidad superficial de la matriz. Si bien se obtuvieron disminuciones de un 25 % aproximadamente, esto no era suficiente por el hecho que llegaría muy poca droga al intestino.

Por este motivo, se procedió a utilizar algún método donde la formulación sea modificada de forma tal que haya una interacción de tipo covalente entre el antibiótico y la matriz, y no solo interacciones débiles o métodos fisicoquímicos para retardar la difusión. La configuración obtenida mediante el uso de CMGG (goma guar carboximetilada) ha permitido lograr un gran avance ya que los perfiles de liberación se modificaron por completo con una reducción promedio de un 50 % tanto a pH ácido como alcalino de los perfiles de liberación de Enrofloxacin. Además considerando que la concentración de droga utilizada para estos últimos ensayos fue de 100 µg/ml (el doble a la utilizada con las primeras formulaciones) se obtuvo una considerable concentración de enrofloxacin capaz de llegar al sitio de absorción deseado (el intestino).

Otro aspecto positivo, es que la liberación de enrofloxacin a pH intestinal también es gradual por lo que se brinda un suministro constante de droga al organismo por un periodo de tiempo, aumentando la biodisponibilidad del antibiótico, evitando los posibles efectos tóxicos por altas concentraciones, irritaciones del sistema gastrointestinal y procesos de agregación propios de la molécula, estado en el cual no es posible ser absorbido.

Finalmente, mediante mejoras de los propiedades tanto físicas como químicas de las matrices biopoliméricas, fue posible desarrollar un sistema de liberación controlada de enrofloxacin apto para la administración oral de animales con necesidad de un tratamiento contra algún tipo de infección bacteriana.

### Perspectivas

Uno de los objetivos deseados a futuro es optimizar la capacidad de la matriz de liberar la enrofloxacin empleando biopolímeros. Debido a que a la fecha son escasos los trabajos en los que se ha estudiado la liberación controlada de la misma, lo que deja un amplio espacio de investigación debido a las ventajas del uso de esta droga y también a las desventajas como los efectos tóxicos que ofrece por administración directa. Algunas de los puntos a evaluar para trabajar en este primer objetivo serían:

- Utilizar polímeros modificados, química o enzimáticamente, de manera de obtener una interacción mayor entre la droga-matriz.
- Obtener un entrecruzamiento mayor de los biopolímeros utilizados de manera de disminuir el tamaño de poro.
- Continuar con el estudio de la formulación de CMGG adicionándole recubrimientos.
- Desde el punto de vista terapéutico, la combinación de dos o más antibióticos u otras sustancias ha probado ser de utilidad para el tratamiento de patologías agudas, razón por la cual se podría adicionar otra molécula para mejorar la aplicación biomédica del antibiótico. Algunas moléculas candidatas pueden ser:
  - Vitamina K: es una vitamina liposoluble que juega un papel importante en la coagulación de la sangre. La vitamina K se conoce como la vitamina de la coagulación, porque sin ella la sangre no coagularía. Además, algunos estudios indican que ayuda a mantener los huesos fuertes durante la vejez.
  - Drogas con las que presenta sinergismo como aminoglicosidos, cefalosporinas y penicilinas de amplio espectro.
- ❖ Enzimas (como lizosimas).

Por otro lado, se deberían evaluar los niveles de Enrofloxacin que se alcanzan en sangre y compararlos con los necesarios para alcanzar las dosis terapéuticas en distintos animales.

A su vez, es necesario desarrollar esferas de menor tamaño para mejorar la llegada a distintas aéreas del aparato gastrointestinal, y aumentar así la superficie específica de absorción.



# Referencias y bibliografía

**REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFIA**

- Castro G.R., B. Panilaitis, D.L. Kaplan. Emulsan, a tailorable biopolymer for controlled release. *Bioresource Technology* 99 (2008), 4566–4571
- Dornish, M., Kaplan, D., Skaugrud. Standards and guidelines for biopolymers in tissue-engineered medical products. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 944(2001), 388–397.
- Eun-Hee K. and Hoo-Kyun C. Preparation of Various Solid-Lipid Beads for Drug Delivery of Enrofloxacin. *Drug Delivery*, 1(2004), 365-370.
- Gamal H. R., Alaa S. Amin. 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(2004), 973-978.
- Gelatt KN M. Christina, et al. Enrofloxacin-associated retinal degeneration in cats. *Vet Ophthalmol* 4 (2001), 99-106.
- Gunning A. P., Bongaerts R. J. M., Morris V. J. Recognition of galactan components of pectin by galectin-3. *FASEB J.* 23(2009), 415–424 .
- Haerdi-Landerer, Habermacher Judith, Wenger Barbara, Suter Maja M., Steiner Adrian. Review: Slow release antibiotics for treatment of septic arthritis in large animals. *The Veterinary Journal* xxx (2009)
- Kaartinen L, Panu S, Pyörälä S. Pharmacokinetics of enrofloxacin in horses after single intravenous and intramuscular administration. *Equine Veterinary Journal* 29(1997), 378-381.
- LinShu L., Fishman Marshall L., Kost Joseph, Hicks Kevin B.. Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. *Biomaterials* 24 (2003) 3333-3343.
- Lizondo Mónica, Miquel Pons, Montserrat Gallardo, Joan Estelrich. Physicochemical properties of enrofloxacin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 15 (1997), 1845-1849.
- Mckellar QA. Clinical relevance of the pharmacologic properties of fluorquinolones. *Suppl Compend Contin Educ Pract Vet.* 18(1996), 14-21.
- Michel A-S., M.M. Mestdagh, M.A.V. Axelos. Physico-chemical properties of carrageenan gels in presence of various cations. *International Journal of Biological Macromolecules* 21 (1997), 195-200.

Schlüter G. Ciprofloxacin: review of potential toxicologic effects. *American Journal of Medicine*. 82 (1987), 91-93.

Takayama S, Hirohashi M, Kato M, Shimada H. Toxicity of quinolone antimicrobial agents. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 45 (1995), 1-45.

Yongnian Ni, Shaojing Su, Serge Kokot. Spectrometric studies on the interaction of Fluoroquinolones and bovine serum albumin. *Spectrochimica acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 75 (2010) 547-552

Yoshida K, Yabe K, Nishida S, Yamamoto N, Ohshima C, Sekiguchi M, Yamada K, Furuhashi K. Pharmacokinetic disposition and arthropathic potential of oral ofloxacin in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 21(1998), 128-132.

Viness Pillay, Reza Fassihi. In vitro release modulation from crosslinked pellets for site-specific drug delivery to the gastrointestinal tract. I. Comparison of pH-responsive drug release and associated kinetics. *Journal of Controlled Release* 59 (1999) 229-242.

Pagina Web: <http://www.wedgewoodpetrx.com/learning-center/professional-monographs/enrofloxacin-for-veterinary-use.html>



# Anexos

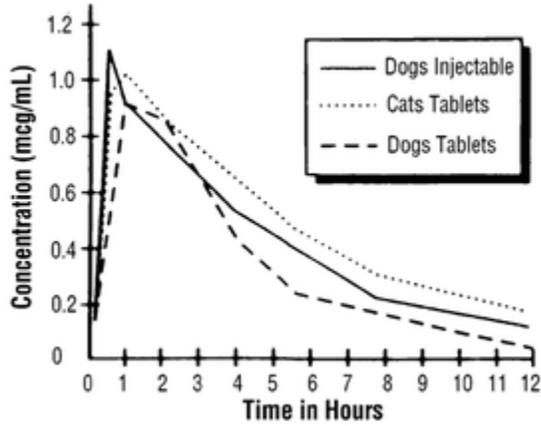
**ANEXO 1****DOSIS TERAPEUTICAS DE ENROFLOXACINA**

A 1. Valores de Concentración inhibitoria Mínima (MIC) de enrofloxacin contra patógenos caninos y felinos (diagnostic Laboratory Isolates, 1984, <http://www.drugs.com/vet/baytril-enrofloxacin-antibacterial-tablets.html>)

<b>Organismos</b>	<b>Aislamientos</b>	<b>Rango Mic (µg/ml)</b>
<i>Bacteroides spp.</i>	2	2
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	3	0.125-0.5
<i>Brucella canis</i>	2	0.125-0.25
<i>Clostridium perfringens</i>	1	0.5
<i>Escherichia coli</i>	5*	≤0.016-0.031
<i>Klebsiella spp.</i>	11*	0.031-0.5
<i>Proteus mirabilis</i>	6	0.062-0.125
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	0.5-8
<i>Staphylococcus spp.</i>	5	0.125

\*Incluidos aislamientos de felinos.

A 2. Concentraciones sericas de Enrofloxacin en función del tiempo, en función de dosis orales e intramusculares de 2.5 mg/Kg para perros y una dosis oral de 2.5 mg/Kg para gatos.



A 3. Especies sensibles a enrofloxacin, comparación con otros antibióticos

**Medication options in ruminants**

	Penicillin G	Amoxicillin	Ceftiofur	Gentamycin	Neomycin	Spectinomycin	Macrolides	Phenicol	Tetracyclines	Sulfonamides Trimethoprim/Sulfa	Baytril® (Enrofloxacin)
E. coli		●	●	●	■	●		●	●	●	●
Salmonella spp.		●	●	●	■	●		●	●	●	●
Lactobacillus spp.*	●	●	●	●	■	●	●	●	●	●	●
Mannheimia spp.	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●
Haemophilus spp.	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●
Pasteurella spp.	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●
Mycoplasma spp.				●		●	●	●	●	●	●
Staph aureus	●	●	●	●			●			●	●
Actinomyces	●		●				●	●	●	●	
Listeria spp.	●	●	●	●			●	●	●	●	●
Bacteroides	●		●				●	●	●	●	

■ no systemic activity; medication may reduce intestinal bacterial multiplication.

● good susceptibility

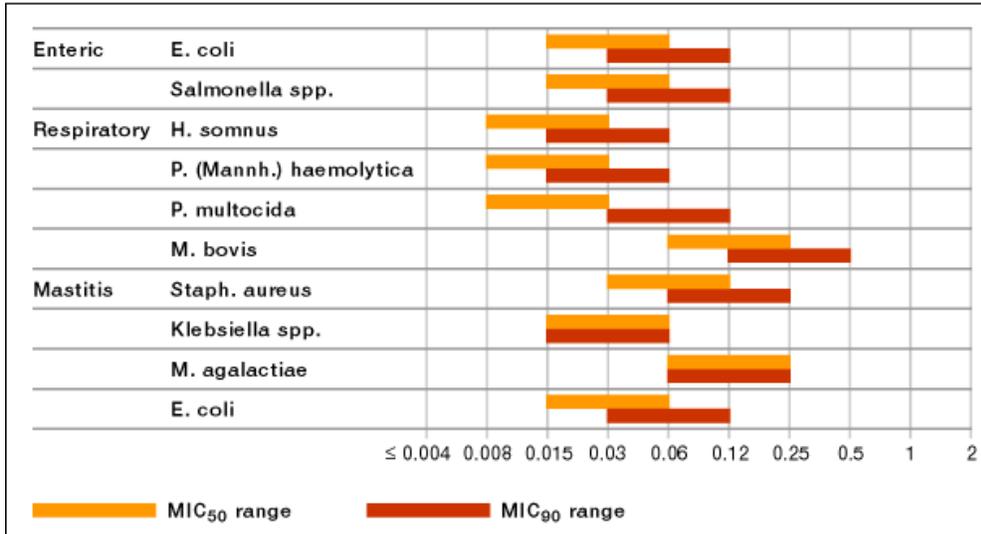
● moderate or variable susceptibility

\* present in normal gut flora

© 2002 Bayer AG, Germany

A 4. Suceptibilidad a enrofloxacin de cepas patogenas bacterianas y mycoplasma de origen bovino.

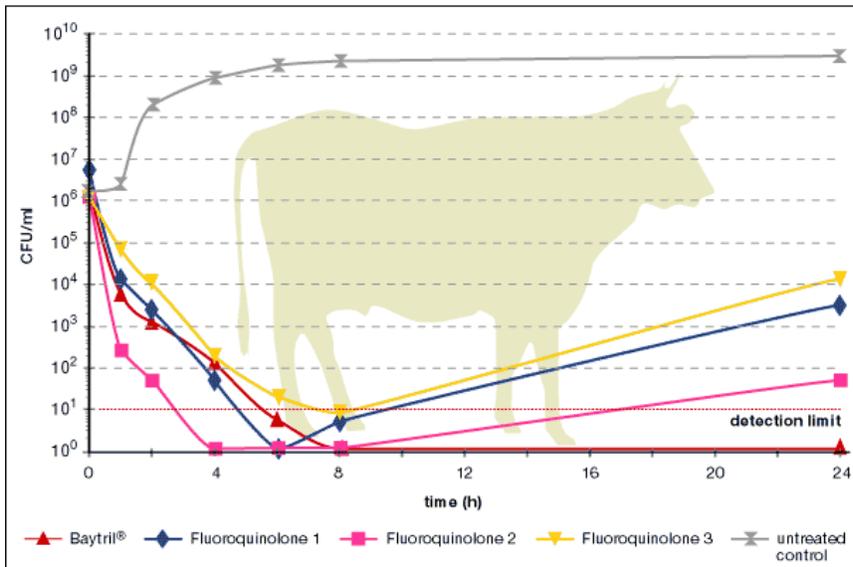
**Activity of Baytril® against bacteria and mycoplasma of bovine origin**  
 Range of enrofloxacin minimal concentrations (µg/ml) inhibiting 50% or 90% (MIC<sub>50</sub> or MIC<sub>90</sub>) of a susceptible bacterial population



Data collation of several antimicrobial susceptibility tests (published sources and data on file, Bayer Animal Health).  
 © 2002 Bayer AG, Germany

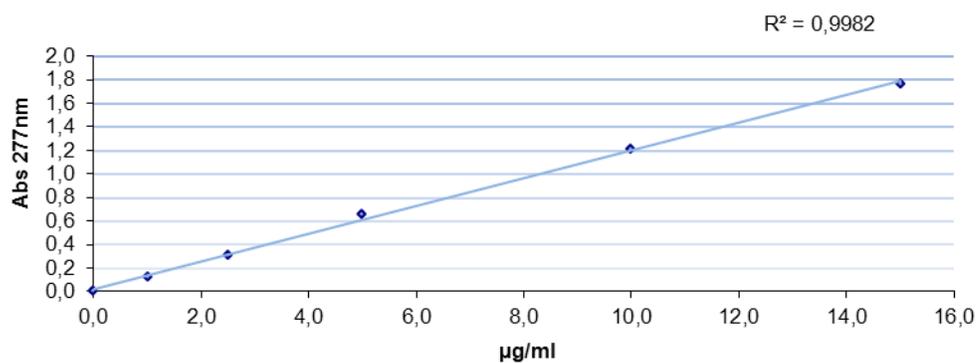
A 5. Cinéticas de muerte para *E. coli* por exposición a enrofloxacin.

**Time-kill kinetics of Baytril® (Enrofloxacin) and other Quinolones (0.5 µg/ml) in *E. coli* ATCC 25922**



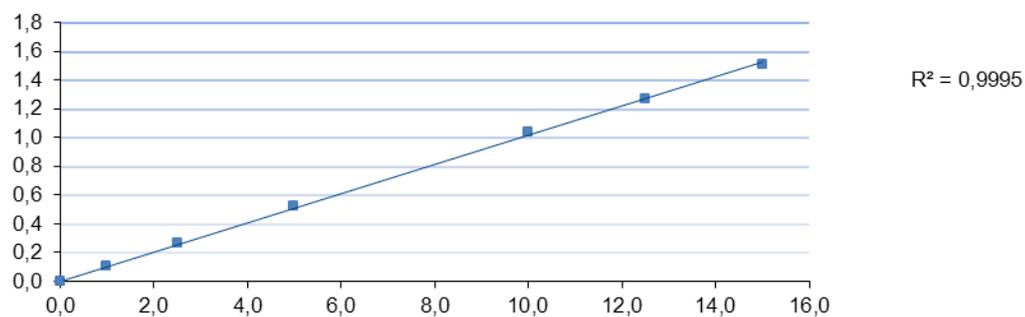
## CURVAS DE CALIBRACIÓN

A 6. Curva de calibración de enrofloxacin en buffer Clark & Lubs 50mM, pH=1.2



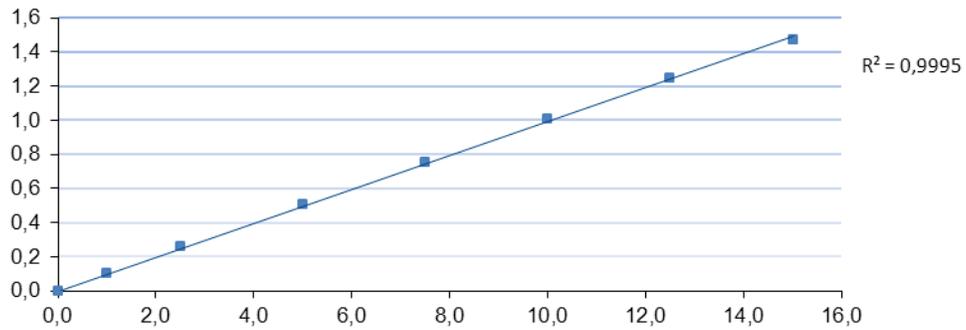
Enrofloxacin(µg/ml)	Abs (277 nm)
0,0	0,0000
1,0	0,1241
2,5	0,3056
5,0	0,6607
10,0	1,2134
15,0	1,7603

A 7. Curva de calibración de enrofloxacin en buffer HAc/Ac<sup>-</sup> 50mM, pH=5



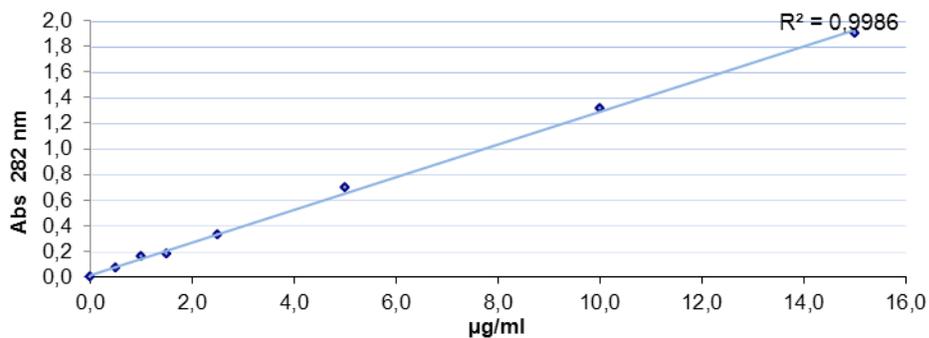
Enrofloxacin(µg/ml)	Abs (277 nm)
0,0	0,0000
1,0	0,1028
2,5	0,2615
5,0	0,5255
10,0	1,0358
12,5	1,2652
15,0	1,5083

## A 8. Curva de calibración de enrofloxacin en buffer fosfato 100mM, pH=7.4



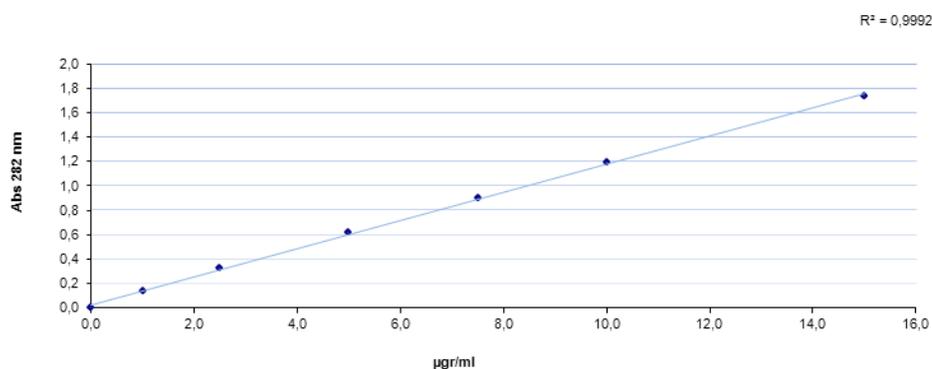
Enrofloxacin(µg/ml)	Abs (277 nm)
0,0	0,0000
1,0	0,0995
2,5	0,2581
5,0	0,5059
7,5	0,7528
10,0	1,0098
12,5	1,2493
15,0	1,4674

## A 9. Curva de calibración de enrofloxacin en etanol



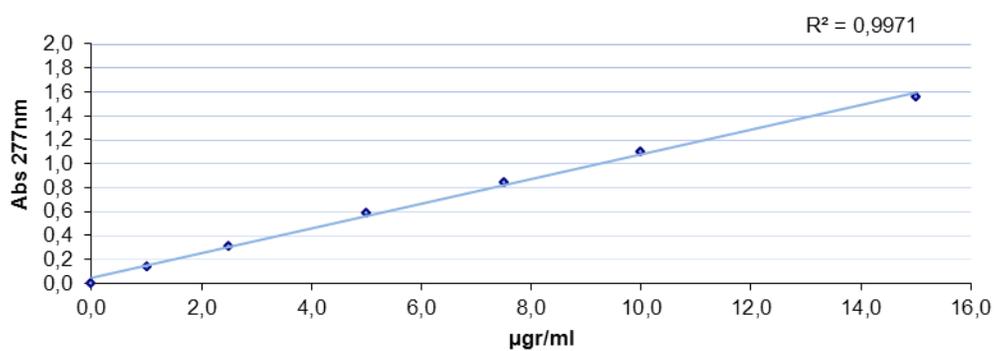
Enrofloxacin(µg/ml)	Abs (277 nm)
0,0	0,0000
0,5	0,0667
1,0	0,1569
1,5	0,1854
2,5	0,3344
5,0	0,6991
10,0	1,3149
15,0	1,8973

## A 10. Curva de calibración de enrofloxacin en propanol



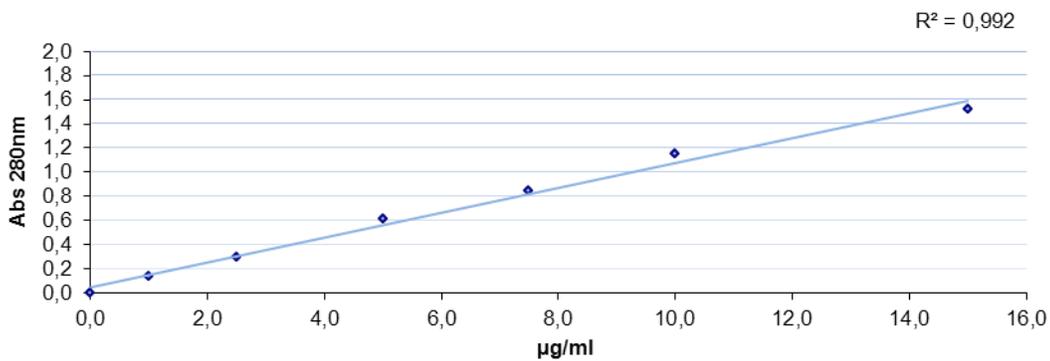
Enrofloxacin(µg/ml)	Abs (277 nm)
0,0	0,0000
1,0	0,1372
2,5	0,3223
5,0	0,6206
7,5	0,9013
10,0	1,1883
15,0	1,7316

## A 11. Curva de calibración de enrofloxacin en etilenglicol



Enrofloxacin(µg/ml)	Abs (277 nm)
0,0	0,0000
1,0	0,1417
2,5	0,3083
5,0	0,5860
7,5	0,8449
10,0	1,1010
15,0	1,5541

## A 12. Curva de calibración de enrofloxacin en propilenglicol/EtOH 1:1



Enrofloxacin( $\mu\text{g/ml}$ )	Abs (277 nm)
0,0	0,0000
1,0	0,1404
2,5	0,2927
5,0	0,6084
7,5	0,8446
10,0	1,1482
15,0	1,5217

A 13. 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	Sal (500mM)	Encapsulación (%)
A	KCl	$28.2 \pm 3.2$
B	$\text{CaCl}_2$	$36.6 \pm 0.5$

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

**Tabla 13.** Calculo de los valores estadísticos del Test T

Muestra A	Muestra B
36.9	26.0
36.2	30.5
⋮	⋮

Revise que no haya líneas en blanco al final de las muestras.

Resumen de datos			
	A	B	Total
n	2	2	4
$\sum X$	73.1	56.5	129.6
$\sum X^2$	2672.05	1606.25	4278.3
SS	0.245	10.125	79.26
promedio	36.55	28.25	32.4

Prom <sub>a</sub> -Prom <sub>b</sub>	t	Grados de libertad
8.3	+3.65	2

P	Una cola	0.0337725
	Dos colas	0.067545

	Observado	Intervalos de confianza	
		0.95	0.99
Promedio <sub>a</sub>	36.55	± 4.4485	± 22.281
Promedio <sub>b</sub>	28.25	± 28.5975	± 143.235
Prom <sub>a</sub> -Prom <sub>b</sub>	8.3	± 9.7914	± 22.5884
Muestras independiente			

para GL=2 y t=3.65, le corresponde en tabla un t= 2.920 y una P=0.95, suficiente para afirmar que las diferencias son significativas.

Donde:

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

$$\sigma_p = \sqrt{[(SSa + SSb)/(na+nb-2)]}$$

$$t = (Proma - Promb) / (\sigma_p * \sqrt{(1/na) + (1/nb)})$$

$$\text{Grados de libertad} = na + nb - 2$$

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=3.650)

Se procede al “Planteamiento de la hipótesis”

- **Hipótesis alterna (Ha):** Los porcentajes de encapsulamiento obtenidos para diferentes formulaciones biopoliméricas, 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.