



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

---

**TRABAJO DE TESIS DOCTORAL**

*Síntesis, caracterización y aplicaciones de  
copolímeros fumáricos en sistemas de liberación  
transdérmicos*

---

**Lic. Magalí Pasqualone**

**Directora: Dra. M. Susana Cortizo**

**Codirector: Dr. H. Alfredo Andreetta**

**2016**



*Este trabajo doctoral ha sido realizado bajo la dirección de la Dra. M. Susana Cortizo y la codirección del Dr. H. Alfredo Andreetta en el Grupo Macromoléculas del Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA) de la ciudad de La Plata, provincia de Buenos Aires, Argentina; dependiente de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).*

*Su realización ha sido posible gracias a las Becas Doctorales Tipo I y II otorgadas por CONICET y al financiamiento de la UNLP mediante los proyectos 11/X515 y 11/X644.*

*A su vez, una parte de esta tesis ha sido desarrollada durante una estancia de investigación bajo la dirección de la Dra. Marta Fernández-García en el grupo de Ingeniería Macromolecular del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (ICTP) de Madrid, España, dependiente del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).*





*A mi madre, por su cariño, su alegría y su fortaleza.*

*A mi padre, por su nobleza, su inteligencia y su ternura.*

*A mi abuelo Ulisse, por su picardía, su complicidad y su compañía.*

*A los que vendrán, por la motivación, la ilusión y los sueños.*

*A Dios, por TODO.*

*A todos ellos, por demostrarme que el verdadero amor nunca deja de ser.*



## RESUMEN

En este trabajo doctoral se presentan la síntesis y el empleo de copolímeros fumáricos en la elaboración de membranas con el objetivo de ser utilizados como material para el desarrollo de parches transdérmicos.

Los copolímeros fueron obtenidos por copolimerización radical empleando energía de microondas a partir de acetato de vinilo y dos monómeros fumáricos: el fumarato de diisopropilo y el fumarato de di-2-octilo, siendo este último un monómero fumárico de cadena lateral larga sintetizado en el laboratorio. Los copolímeros obtenidos fueron caracterizados utilizando diversas técnicas y asimismo se analizó la presencia de reacciones de transferencia al polímero durante la copolimerización.

Además, se estudió la copolimerización radical del fumarato de di-2-octilo con acetato de vinilo en solución empleando la técnica de polimerización radical controlada denominada polimerización por adición-fragmentación y transferencia de cadena reversible (RAFT), utilizando como agente de transferencia de cadena un xantato obtenido en el laboratorio y lográndose buenos resultados en el control del índice de polidispersidad y peso molecular de los copolímeros.

Se seleccionaron distintos copolímeros y con ellos se elaboraron membranas a través del método de *solvent-casting*. A partir de las distintas películas se seleccionó el material más adecuado para el fin deseado mediante el estudio de apariencia, morfología, propiedades adhesivas e hinchamiento.

También se elaboraron membranas conteniendo un bifosfonato, el risedronato (una droga osteogénica, obtenida por síntesis en el laboratorio y caracterizada previo a su uso) en dos relaciones de concentración bifosfonato/copolímero: 6% p/p y 12% p/p. La apariencia y distribución de la droga en las películas se analizó visualmente y mediante Microscopía Óptica, obteniéndose mayor heterogeneidad en la dispersión de risedronato en las películas del copolímero obtenido mediante polimerización controlada, respecto al obtenido por microondas. Se evaluó, además, la posible existencia de interacciones droga-copolímero mediante Espectroscopia Infrarroja con Transformadas de Fourier y Calorimetría Diferencial de Barrido. Complementariamente se realizó la

determinación del porcentaje de carga de la droga en la matriz y el estudio de estabilidad del risedronato en solución acuosa.

Paralelamente, se desarrolló un método cromatográfico para la detección del mencionado bifosfonato empleando Cromatografía Líquida de Alta Eficacia, estudiándose, a su vez, los parámetros del método tales como repetibilidad, linealidad, exactitud y sensibilidad. Los valores obtenidos arrojaron que el método resultó efectivo destacándose, a su vez, por la sencillez de sus condiciones experimentales en relación a los métodos existentes.

Por último, los ensayos de liberación *in vitro* del bifosfonato se realizaron en un equipo disolutor y los perfiles de liberación de la droga fueron analizados mediante distintos modelos teóricos a fin de obtener información acerca del mecanismo de transporte involucrado en el proceso. El análisis de los coeficientes de correlación mostró que los Modelos de Weibull y de Ritger-Peppas presentaron las mejores correlaciones, demostrando este último que el mecanismo interviniente en el proceso de liberación es un caso de transporte conocido como Super Caso II.

Los resultados obtenidos para el copolímero AcV-co-FDO-MO-3 lo presentan como un excelente candidato para ser reemplazo de los actuales copolímeros comerciales derivados de ésteres acrílicos destinados a la elaboración de parches transdérmicos.



## AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por ser mis guías, compañeros y consejeros. Gracias por su amor incondicional.

A mis abuelos: Ulisse, Manuela y Telmo, quienes a la distancia siempre están presentes; y a mi *nonnita* Maribel, la más inquieta de la familia, dueña de unas admirables ganas de vivir.

A mis amigas Majo, Carla, Magda, Dana, Kari y Nadia, por escucharme, comprenderme, aceptarme y alentarme.

A mis Directores de Tesis, Susana y Alfredo, por su acompañamiento y su excelente calidad no sólo científica sino también humana. Gracias por respetar mis tiempos y mis formas.

A mis compañeros del Grupo Macromoléculas durante estos años: Tamara, Juan Manuel, Juan, Marcos, Laura, Gimena, Fernando, el Negro, Soledad, Lara, Leticia, Luz y Lucas. Gracias por regalarme momentos de mates y risas.

A todos los miembros del INIFTA: becarios, investigadores, personal técnico y administrativo por la buena disposición que siempre han demostrado.

A todos los miembros del grupo de Ingeniería Macromolecular del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (ICTP) de Madrid, España: Manolo, Juan, Daniel, Alberto, Martita, Rubén, David, y muy especialmente a su directora, la Dra. Marta Fernández-García por recibirme, aceptarme y hacerme sentir una de ellos.

A Sergio, por el préstamo del equipo HPLC al Grupo Macromoléculas.

A quienes me brindaron su ayuda siempre que la he necesitado: particularmente a Agustín por su ayuda con el equipo HPLC y a Claudia, Marcos y Egly por su ayuda con el Microscopio Óptico.

A Pascual, María Rosa y Verónica, porque sin ustedes, nada de esto hubiese sido posible.

A todos aquellos que de manera directa o indirecta han contribuido a esta tesis.

Finalmente, y fundamentalmente, a Dios por haber colocado a cada uno de ustedes en mi camino.



# ÍNDICE

<b>CAPÍTULO 1: Introducción, Hipótesis y Objetivos</b>	Pág. 1
1.1 Introducción	Pág. 2
1.2 Hipótesis de Trabajo	Pág. 5
1.3 Objetivos	Pág. 6
<b>CAPÍTULO 2 : MATERIALES Y MÉTODOS</b>	Pág. 7
<b>2.1 Monómeros y agente de transferencia de cadena</b>	Pág. 8
2.1.1 Monómeros	Pág. 8
2.1.1.1 Acetato de vinilo	Pág. 8
2.1.1.1.1 Purificación del monómero	Pág. 8
2.1.1.1.2 Control de pureza y caracterización del monómero	Pág. 8
2.1.1.2 Fumarato de diisopropilo	Pág. 9
2.1.1.3 Fumarato de di-2-octilo	Pág. 9
2.1.1.3.1 Síntesis	Pág. 9
2.1.1.3.2 Identificación y caracterización del monómero	Pág. 10
2.1.2 Agente de transferencia de cadena	Pág. 11
2.1.2.1 Síntesis del S-1-metoxicarbonietil O-etil xantato	Pág. 11
2.1.2.2 Caracterización del S-1-metoxicarbonietil O-etil xantato	Pág. 13
<b>2.2 Síntesis de copolímeros</b>	Pág. 14
2.2.1 Síntesis de copolímeros empleando energía de microondas	Pág. 14
2.2.1.1 Procedimiento experimental de la copolimerización por microondas	Pág. 14
2.2.1.2 Caracterización de los copolímeros	Pág. 15
2.2.2 Síntesis de copolímeros en solución. Polimerización por adición-fragmentación y transferencia de cadena reversible (RAFT)	Pág. 16
2.2.2.1 Procedimiento experimental de la copolimerización en solución	Pág. 16
2.2.2.2 Caracterización de los copolímeros	Pág. 18

<b>2.3 Elaboración de membranas</b>	Pág. 19
2.3.1 Películas de copolímero	Pág. 19
Método de elaboración	Pág. 19
2.3.2 Caracterización	Pág. 20
2.3.2.1 Apariencia y morfología	Pág. 20
2.2.2.2 Ensayos de adhesión	Pág. 21
Prueba del pulgar	Pág. 21
2.2.2.3 Estudio de hinchamiento	Pág. 21
2.2.2.4 Evaluación de la eficacia del método de <i>solvent-casting</i>	Pág. 22
2.3.3 Películas de copolímero conteniendo risedronato	Pág. 23
2.3.3.1 Risedronato	Pág. 23
2.3.3.2 Método de incorporación de risedronato	Pág. 23
2.3.3.3 Apariencia	Pág. 24
2.3.3.4 Estudio de las interacciones droga-copolímero	Pág. 24
<b>2.4 Ensayos de liberación <i>in vitro</i></b>	Pág. 25
2.4.1 Determinación de risedronato por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia	Pág. 25
2.4.1.1 Método cromatográfico	Pág. 25
2.4.1.2 Repetibilidad	Pág. 26
2.4.1.3 Linealidad	Pág. 26
2.4.1.4 Exactitud	Pág. 27
2.4.1.5 Sensibilidad. Límite de concentración y detección	Pág. 27
2.4.2 Determinación del porcentaje de carga de la droga en la matriz	Pág. 28
2.4.3 Estabilidad del risedronato en solución acuosa	Pág. 29
2.4.4 Perfiles de liberación	Pág. 30
2.4.5 Modelos teóricos	Pág. 31
2.4.5.1 Modelo de cinética de orden cero	Pág. 31
2.4.5.2 Modelo de cinética de primer orden	Pág. 32

2.4.5.3 Modelo de Higuchi	Pág. 32
2.4.5.4 Modelo de Weibull	Pág. 33
2.4.5.5 Modelo de Ritger-Peppas	Pág. 34
<b>CAPÍTULO 3 : RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	Pág. 37
<b>3.1 Monómeros y agente de transferencia de cadena</b>	Pág. 38
3.1.1 Monómeros	Pág. 38
3.1.1.1 Acetato de vinilo	Pág. 38
3.1.1.2 Fumarato de diisopropilo	Pág. 39
3.1.1.3 Fumarato de di-2-octilo	Pág. 41
3.1.1.3.1 Síntesis	Pág. 41
3.1.1.3.2 Identificación y caracterización del monómero	Pág. 41
3.1.2 Agente de transferencia de cadena	Pág. 43
3.1.2.1 Síntesis del S-1-metoxicarbonietil O-etil xantato	Pág. 44
3.1.2.2 Caracterización del S-1-metoxicarbonietil O-etil xantato	Pág. 48
<b>3.2 Síntesis de copolímeros</b>	Pág. 49
3.2.1 Síntesis de copolímeros empleando energía de microondas	Pág. 49
3.2.2 Síntesis de copolímeros en solución. Polimerización por adición-fragmentación y transferencia de cadena reversible (RAFT)	Pág. 63
<b>3.3 Elaboración de membranas</b>	Pág. 70
3.3.1 Películas de copolímero	Pág. 70
Método de elaboración	Pág. 71
3.3.2 Caracterización	Pág. 71
3.3.2.1 Apariencia y morfología	Pág. 72
3.3.2.2 Ensayos de adhesión	Pág. 76
Prueba del pulgar	Pág. 76
3.3.2.3 Estudio de hinchamiento	Pág. 78
3.3.2.4 Evaluación de la eficacia del método de <i>solvent-casting</i>	Pág. 80
3.3.3 Películas de copolímero conteniendo risedronato	Pág. 82

3.3.3.1 Risedronato	Pág. 82
3.3.3.2 Método de incorporación de risedronato	Pág. 88
3.3.3.3 Apariencia	Pág. 88
3.3.3.4 Estudio de las interacciones droga-copolímero	Pág. 92
<b>3.4 Ensayos de liberación <i>in vitro</i></b>	Pág. 95
3.4.1 Determinación de risedronato por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia	Pág. 95
3.4.1.1 Método cromatográfico	Pág. 95
3.4.1.2 Parámetros cromatográficos	Pág. 100
3.4.1.2.1 Repetibilidad	Pág. 102
3.4.1.2.2 Linealidad	Pág. 103
3.4.1.2.3 Exactitud	Pág. 105
3.4.1.2.4 Sensibilidad. Límite de concentración y detección	Pág. 106
3.4.2 Determinación del porcentaje de carga de la droga en la matriz	Pág. 107
3.4.3 Estabilidad del risedronato en solución acuosa	Pág. 109
3.4.4 Perfiles de liberación	Pág. 112
3.4.5 Modelos teóricos	Pág. 114
<b>CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES</b>	Pág. 117
<b>Conclusiones</b>	Pág. 118
<b>REFERENCIAS</b>	Pág. 120
<b>ÍNDICE DE ESQUEMAS, IMÁGENES, FIGURAS Y TABLAS</b>	Pág. 133
ESQUEMAS	Pág. 134
IMÁGENES	Pág. 135
FIGURAS	Pág. 137
TABLAS	Pág. 138



## CAPÍTULO 1

# INTRODUCCIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## 1.1 Introducción

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano y representa alrededor del 15% de la masa total del cuerpo adulto.<sup>1</sup> Es una membrana heterogénea y sumamente compleja que cumple variadas funciones tales como: barrera protectora a los agentes externos, mantenimiento homeostático del cuerpo, funciones excretoras y una importante función censora a las influencias externas como calor, presión, dolor; entre otros. Está compuesta por tres capas: epidermis (a su vez integrada por estratos), dermis e hipodermis (o subcutis), en las cuales se encuentran diversos tipos celulares además de anexos cutáneos, terminaciones nerviosas y prolongaciones del sistema circulatorio.<sup>1,2</sup> Si bien la piel se caracteriza por una alta impermeabilidad, no es absolutamente impermeable a las sustancias directamente aplicadas sobre ella, lo cual ha dado origen a los tratamientos tópicos de administración. El proceso de absorción está controlado por la capa más externa de la epidermis denominada estrato córneo cuyo espesor es de alrededor de 15-20  $\mu\text{m}$ ,<sup>3</sup> y cuya composición bioquímica es sumamente compleja.<sup>4</sup>

Desde la antigüedad el hombre ha aplicado sobre la piel diversos productos con fines médicos y cosméticos; pero no fue hasta fines de la década de 1970 que la tecnología de liberación transdérmica bajo la forma de parches transdérmicos fue introducida en el mercado.<sup>5</sup> Estos sistemas de liberación de fármacos son una ruta alternativa a la administración oral debido a la reducción de los problemas gastrointestinales que conlleva el evitar el pasaje de las drogas por el tracto digestivo. Además, tienen asociada una amplia variedad de ventajas dentro de las cuales pueden mencionarse la posibilidad de auto-aplicación, el control del sitio y área de aplicación, cantidad de droga cargada y velocidad de absorción; además de no producir acostumbamiento y permitir la gradual liberación del principio activo desde el sistema, alcanzando niveles más estables en plasma en función del tiempo con menor variabilidad respecto a las rutas de administración oral.<sup>6,7</sup>

Debido a la alta complejidad de este órgano humano, en las preparaciones destinadas al uso cutáneo el vehículo presenta una mayor influencia respecto a cualquier otra membrana.<sup>8</sup> Los polímeros han sido ampliamente empleados como

vehículos en los sistemas destinados a la aplicación dérmica y transdérmica utilizándose tanto como matrices y adhesivos en parches transdérmicos, como agentes gelificantes en geles y como excipientes en cremas y emulsiones, entre otros.<sup>8</sup> Actualmente se conocen una amplia variedad de polímeros con posibilidad de ser empleados el desarrollo de sistemas de liberación transdérmicos que abarca desde polímeros naturales, hasta sintéticos y semisintéticos.<sup>9</sup>

En el caso particular de los parches transdérmicos, a partir del diseño estructural de los mismos puede indicarse la siguiente clasificación:<sup>10</sup>

- Sistemas de reservorio o Sistema controlado de permeación con membrana
- Sistemas matriciales
- Sistema de difusión controlada vía matriz
- Sistema de difusión controlada mediante micro reservorios

De los anteriormente expuestos, los sistemas matriciales son los únicos que están conformados principalmente por dos partes: una capa inferior de sostén y una superior elaborada a partir de una dispersión de la droga en una matriz polimérica la cual puede, a su vez, ser de dos tipos: adhesiva o no adhesiva. En el caso de que la dispersión del principio activo se realice en un polímero no adhesivo, es necesaria la inclusión de una capa de un adhesivo en la parte superior a fin de lograr el correcto contacto entre el dispositivo y la piel.

Tanto las matrices adhesivas como los adhesivos incorporados como capa externa en los parches transdérmicos corresponden al tipo denominado *adhesivos sensibles a la presión* (PSAs por las siglas en inglés para Pressure Sensitive Adhesives). Estos materiales son capaces de generar adhesión a la piel (u otra superficie) al ser presionados suavemente sobre ella y permanecer en contacto una vez que se dejó de ejercer la fuerza.<sup>11</sup> Además de las propiedades adhesivas, un material a ser empleado como PSA debe ser estable en relación a las condiciones ambientales (humedad y temperatura), sencillo de obtener, tener una apariencia estética, buenas propiedades adhesivas y no dejar residuo en la piel una vez retirado.<sup>12</sup>

Actualmente se conocen numerosas clases de adhesivos pero entre los más utilizados en el desarrollo de sistemas de liberación transdérmicos se encuentran los poliisobutilenos, los polisiloxanos (siliconas) y los copolímeros acrílicos.<sup>13</sup> Estos polímeros deben poseer otros requerimientos importantes en relación al uso tales como ser biológicamente inertes, no irritantes ni sensibilizantes de la piel, sin toxicidad sistémica<sup>12</sup> y presentar compatibilidad con la droga y tolerancia a los excipientes<sup>10</sup>.

La pérdida de masa ósea asociada con la edad o la post-menopausia en las mujeres es actualmente considerada como uno de los principales problemas de salud. La pérdida del hueso en ausencia de fracturas, se denomina osteopenia y se considera un prerrequisito para la aparición de la osteoporosis, la cual es responsable del creciente número de fracturas observadas en la edad adulta.<sup>7</sup> En este contexto, los tratamientos preventivos tales como la terapia de reemplazo hormonal con estrógenos o el uso de bifosfonatos,<sup>14-16</sup> resultan beneficiosos dado que la disminución en la pérdida de hueso conlleva una disminución en el riesgo de las fracturas asociadas a ella.<sup>7</sup>

Los bisfosfonatos son compuestos sintéticos estructuralmente relacionados al pirofosfato, contienen en su estructura el puente P-C-P y son inhibidores de la resorción del hueso mediada por osteoclastos.<sup>17</sup> Además de su actividad preventiva en el tratamiento de la osteoporosis, estos compuestos han sido utilizados para el tratamiento de varias enfermedades del hueso tales como la enfermedad de Paget y la metástasis del hueso.<sup>18,19</sup> También se ha demostrado que los bifosfonatos son inhibidores de la *farnesil pirofosfato sintasa* sobre *Trypanosoma cruzi*, el agente responsable de la enfermedad de Chagas.<sup>20,21</sup>

Sin embargo, el empleo de bisfosfonatos vía administración oral presenta algunos inconvenientes tales como problemas gastrointestinales y una pobre biodisponibilidad,<sup>7,22</sup> lo cual motiva a la implementación de sistemas de administración por la vía transdérmica.

## 1.2 Hipótesis de trabajo

Es grande la importancia que tienen los sistemas terapéuticos transdérmicos (STT por sus siglas) del tipo parches transdérmicos para ser utilizados con fines medicinales y cosméticos. Algunos ejemplos de los usos medicinales que tienen estos sistemas son: en cardiopatías isquémicas,<sup>23</sup> dolores crónicos en pacientes terminales,<sup>24</sup> terapias hormonales,<sup>25</sup> tabaquismo,<sup>26</sup> entre otros.

La mayoría de los fármacos que se utilizan en estos sistemas son altamente hidrofóbicos y liposolubles. El diseño de un sistema de liberación transdérmico para bifosfonatos resulta más complejo como consecuencia de la alta polaridad e hidrofiliidad de la droga, lo que limita su absorción por piel como consecuencia de la capa lipídica del estrato córneo. A pesar de ello algunos investigadores<sup>27,28</sup> han desarrollado este tipo de sistemas para alendronato (uno de los bifosfonatos conocidos) empleando copolímeros comerciales y una adecuada formulación para permitir la correcta permeación transdérmica.

Así, el presente plan propone desarrollar un sistema de liberación tipo parche transdérmico para un bifosfonato en particular denominado risedronato (piridinil bifosfonato de uso terapéutico),<sup>29</sup> empleando copolímeros fumáricos sintetizados a partir de acetato de vinilo y monómeros fumáricos. El primer monómero fue seleccionado a partir de su extenso empleo en reacciones de copolimerización con ésteres acrílicos para producir materiales de aplicación en sistemas de liberación transdérmicos;<sup>12</sup> mientras que los monómeros fumáricos fueron seleccionados en función del conocimiento de su reactividad en reacciones de polimerización y de sus propiedades, extensamente estudiadas en el grupo Macromoléculas de INIFTA.<sup>30,31</sup>

Precisamente es por sus propiedades que los monómeros fumáricos pueden ser considerados como potenciales candidatos para reemplazar a los ésteres acrílicos, remarcando además la importancia a nivel local de éstos debido a su fácil obtención a partir de anhídrido maleico (disponible en nuestro país), lo cual representa una disminución en los costos finales si se considera una proyección comercial a futuro.

## 1.3 Objetivos

### Objetivo General

El propósito de la investigación es desarrollar un sistema de liberación transdérmico basado en un copolímero fumárico para liberación de una droga osteogénica.

### Objetivos Específicos

1. Síntesis de copolímeros basados en un éster fumárico y acetato de vinilo con propiedades adecuadas para sistemas de liberación transdérmicos.
2. Caracterización y evaluación de las propiedades químicas y físicas de los materiales poliméricos sintetizados.
3. Preparación y caracterización de las matrices conteniendo la droga.
4. Estudio cinético de liberación de la droga y su interpretación mediante modelos teóricos adecuados.

## CAPÍTULO 2

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 2.1 Monómeros y agente de transferencia de cadena

### 2.1.1 Monómeros

A continuación se describen las síntesis y/o purificaciones y posterior caracterización de los monómeros empleados en este trabajo. La caracterización se llevó a cabo mediante diversas técnicas, siendo común a todos ellos la Resonancia Magnética Nuclear de Protones ( $^1\text{H}$ -RMN) debido a que las señales de los hidrógenos pertenecientes a los monómeros (en particular la señal de los hidrógenos vinílicos) se consideraron como referencia para el control de pureza de los copolímeros obtenidos.

#### 2.1.1.1 Acetato de vinilo

##### 2.1.1.1.1 Purificación del monómero

El acetato de vinilo (AcV;  $\geq 99,0\%$ , Aldrich) utilizado en las reacciones de polimerización empleando energía de microondas se purificó por destilación a presión reducida, recolectándose el destilado en un balón protegido de la luz y sumergido en un baño de hielo para evitar la homopolimerización del monómero.

Por otra parte, el AcV correspondiente a las reacciones de copolimerización en solución se purificó mediante pasaje por una columna conteniendo alúmina básica (Fluka).

##### 2.1.1.1.2 Control de pureza y caracterización del monómero

La pureza del monómero destilado se evidenció por Cromatografía en Capa Fina (CCF o TLC por las siglas en inglés para Thin Layer Chromatography) en placas Silica gel 60 F254 (Merck) sobre las cuales se sembraron AcV destilado, el residuo de la destilación y un patrón de hidroquinona (Mallinckrodt®) disuelta en acetona (99,8%, Anedra). Se utilizó  $\text{CHCl}_3$  (99,98%, Dorwill) como fase móvil y como revelador una lámpara UV-vis.

## 2.1 Monómeros y Agente de Transferencia de Cadena

El control del AcV purificado por columna de alúmina básica se efectuó mediante  $^1\text{H}$ -RMN en un equipo Bruker 300 MHz con  $\text{CDCl}_3$  como solvente a  $25\text{ }^\circ\text{C}$  con 100 scans de acumulación.

## 2.1.1.2 Fumarato de diisopropilo

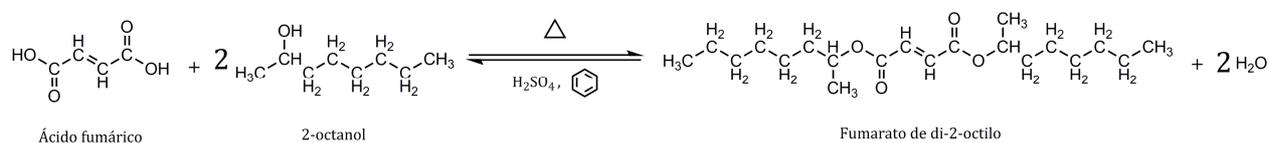
El Fumarato de diisopropilo fue sintetizado previamente mediante una reacción de esterificación de Fischer<sup>32</sup> a partir de ácido fumárico (Maleic S.A.) e isopropanol (99,9% RA (ACS), Anedra).

El control de pureza del monómero y su caracterización se realizaron mediante la determinación de las señales en los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN obtenidos en un equipo Bruker 300 MHz con  $\text{CDCl}_3$  como solvente, a  $27\text{ }^\circ\text{C}$  con 32 y 1989 scans de acumulación respectivamente.

## 2.1.1.3 Fumarato de di-2-octilo

## 2.1.1.3.1 Síntesis

El fumarato de di-2-octilo (FDO) se sintetizó a través de una reacción de esterificación de Fischer mediante la adaptación de una técnica empleada en la síntesis del fumarato de diisopropilo.<sup>33</sup> La reacción general de obtención del monómero se indica en el siguiente esquema:



**Esquema 2.1:** Reacción general de obtención del fumarato de di-2-octilo

**2.1 Monómeros y Agente de Transferencia de Cadena**Técnica experimental:

En 1 balón de 1 litro se colocaron 510,0 ml de benceno (Uso cromatográfico, Sintorgan), 476,5 ml de 2-octanol (2,99 moles; 97%, Sigma-Aldrich), 130,000 gr. de ácido fumárico (1,2 moles, Maleic S.A., previamente recristalizado desde HCl 1 M) y 31,9 ml de ácido sulfúrico concentrado (95-97%, Merck). Se adosó a la boca del balón un refrigerante, y la mezcla se llevó a reflujo con agitación mecánica durante 22,5 hs. (temperatura del baño: 85 °C).

Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se retiró el balón del baño calefactor y, una vez alcanzada la temperatura ambiente, el ácido sulfúrico y el ácido fumárico sin reaccionar se extrajeron con lavados empleando una solución de bicarbonato de sodio saturada. Se realizaron extracciones hasta que no se observó variación de pH en la fase acuosa. Finalmente, se efectuó un lavado con agua destilada de la fase orgánica para eliminar los restos de sales.

La fase orgánica se traspasó a un balón al cual se le adosó un equipo de destilación simple para eliminar el azeótropo agua-benceno. El benceno y el alcohol excedentes se eliminaron por destilación a presión reducida: P= 50mm Hg; fracción Benceno: 18,5-19 °C; fracción 2-octanol: 103-104 °C. El producto no fue factible de purificar por destilación a presión reducida; sin embargo, su posterior caracterización arrojó que poseía pureza suficiente para su empleo.

**2.1.1.3.2 Identificación y caracterización del monómero**

El monómero sintetizado fue identificado y caracterizado mediante Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) en un equipo Nicolet 380 FTIR (Thermo Electron Corporation, Madison WI, USA) realizando la medición entre 4.000 y 400  $\text{cm}^{-1}$  con 4  $\text{cm}^{-1}$  de resolución y 32 scans de acumulación. Para el análisis del espectro se utilizó el programa EZOMNIC (EZOMNIC 7.4.127, Thermo Fisher Scientific Inc, Madison, WI, USA).

Los espectros  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN utilizando un equipo Bruker 300 MHz en  $\text{CDCl}_3$  a 27 °C con un número de scans de 32 y 5000 respectivamente.

## 2.1 Monómeros y Agente de Transferencia de Cadena

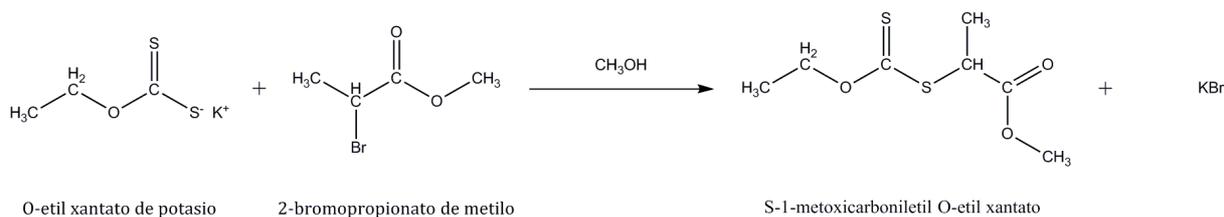
La medición del índice de refracción del producto se realizó en un Refractómetro de Abbe (Carl Zeiss 110798) a 20 °C.

## 2.1.2 Agente de transferencia de cadena\*

## 2.1.2.1 Síntesis del S-1-metoxicarboniletil O-etil xantato

La síntesis del agente de transferencia de cadena (CTA por las siglas en inglés para Chain Transfer Agent) se realizó tomando como base una técnica descrita en literatura,<sup>34</sup> la cual fue modificada y optimizada para conseguir un mayor rendimiento de reacción y pureza del producto.

El Esquema 2.2 muestra la reacción general de obtención del S-1-metoxicarboniletil O-etil xantato:



**Esquema 2.2:** Reacción de obtención del S-1-metoxicarboniletil O-etil xantato

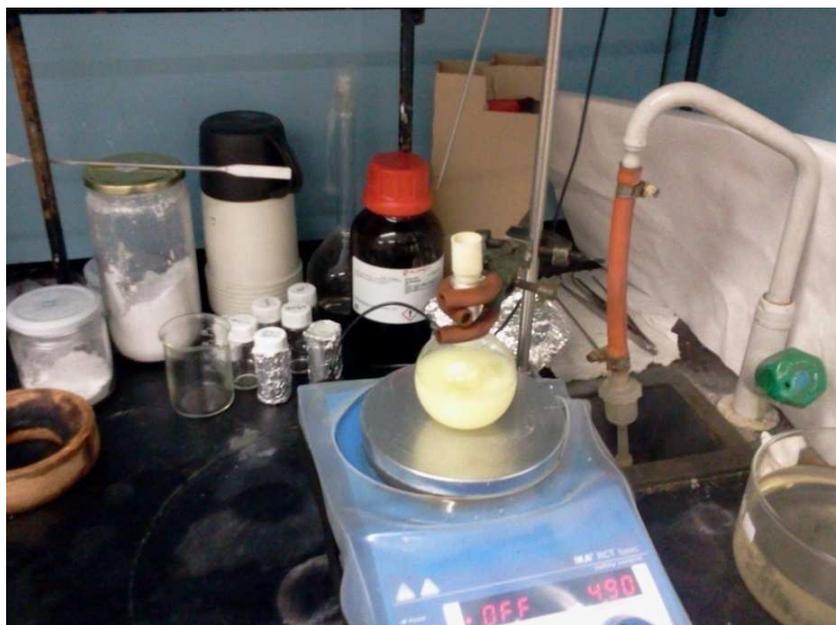
Técnica experimental:

En un balón se colocaron 16,5 ml de metanol sobre los cuales se agregaron 0,86 ml de 2-bromopropionato de metilo (7,7 mmoles; 98%, Sigma-Aldrich). La mezcla se agitó magnéticamente y se adicionaron 1,362 gr. de O-etil-ditiocarbonato de potasio (también denominado O-etil xantato de potasio, 8,49

\* Esta parte del trabajo doctoral ha sido desarrollada durante una estancia de investigación bajo la dirección de la Dra. Marta Fernández-García en el grupo de Ingeniería Macromolecular del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (ICTP) de Madrid, España, dependiente del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

## 2.1 Monómeros y Agente de Transferencia de Cadena

mmoles; 96%, Sigma-Aldrich) en porciones pequeñas durante media hora. La mezcla se dejó agitando toda la noche a temperatura ambiente. (Imagen 2.1)



**Imagen 2.1:** Síntesis del S-1-metoxicarboniletil O-etil xantato

Posteriormente se eliminó el solvente de reacción, y al sólido obtenido (KBr, exceso del ditiocarbonato y un aceite que es el producto) fueron agregados 25 ml de éter etílico. La mezcla se mantuvo en agitación durante unas horas y a continuación se filtró utilizando una placa filtrante N° 3. El filtrado conteniendo el producto se extrajo tres veces con agua destilada para eliminar las trazas de sales y luego se secó con desecante, el cual a continuación fue retirado por filtración con papel de filtro. El éter fue eliminado mediante evaporador rotatorio, obteniéndose un líquido viscoso de color amarillo cuyo análisis por TLC -empleando una mezcla hexano:  $\text{CHCl}_3$  1:1 como fase móvil y una lámpara UV-Vis como método de revelado- evidenció la presencia de restos de 2-bromopropionato de metilo. Considerando que este reactivo tiene un punto de ebullición de 51,5 °C a

**2.1 Monómeros y Agente de Transferencia de Cadena**

19 mmHg,<sup>35</sup> se procedió a su eliminación mediante evaporador rotatorio a una presión de 20mBa a 40 °C durante 45 minutos.

El seguimiento de la purificación se llevó a cabo mediante TLC y el control de pureza final del CTA se realizó mediante <sup>1</sup>H-RMN registrándose los espectros en un equipo Bruker 300MHz a 25 °C en CDCl<sub>3</sub> y con 32 scans de acumulación. Se observó la ausencia de las señales características del 2-bromopropionato de metilo y de los solventes utilizados en el proceso de síntesis.

**2.1.2.2 Caracterización del S-1-metoxicarboniletil O-etil xantato**

La caracterización del CTA sintetizado se realizó a través de <sup>1</sup>H-RMN, en las condiciones anteriormente mencionadas.

## 2.2 Síntesis de copolímeros

Las reacciones de copolimerización radical de los fumaratos de diisopropilo y di-2-octilo con acetato de vinilo se realizaron bajo dos técnicas: en masa empleando energía de microondas y en solución; ésta última se llevó a cabo en condiciones convencionales y empleando una técnica de polimerización radical controlada.

### 2.2.1 Síntesis de copolímeros empleando energía de microondas

#### 2.2.1.1 Procedimiento experimental de la copolimerización por microondas

La copolimerización empleando energía de microondas se efectuó en masa de manera similar a una metodología utilizada por Oberti T y colaboradores<sup>36</sup>. Se empleó peróxido de benzoílo (PB) (Merck, PA) como iniciador, el cual fue purificado por recristalización previo a su uso.<sup>37</sup>

#### Técnica experimental:

Se colocaron en un erlenmeyer de 25 ml el PB (40 mM; 60 mM según corresponda) y los monómeros en relación volumétrica 75:25 (AcV: Fumarato) en un volumen total de 6,0 ml. Se adaptó un septum al estándar del recipiente de reacción y se realizó un burbujeo con N<sub>2</sub> durante 20 minutos en baño de hielo liberando la presión por medio de una aguja hipodérmica. Una vez obtenida la atmósfera inerte en el recipiente de reacción, se finalizó el burbujeo y la muestra se retiró del baño de hielo. Cuando ésta alcanzó la temperatura ambiente, se llevó a un horno microondas doméstico (Zenith - ZVP-2819), sometiéndola a una potencia de 140 W a distintos tiempos. Transcurrido el tiempo de reacción, el recipiente se retiró del horno y, una vez a temperatura ambiente, el polímero resultante fue precipitado por agregado de 5 ml de metanol. El copolímero aislado se purificó, según el fumarato empleado en la reacción, mediante disolución con agitación

durante 24 hs en tolueno (99%, Anedra) o hexano (99,4%, Anedra), y posterior precipitado desde ampolla de decantación sobre metanol (99,9%, Anedra). Se descartó el sobrenadante realizando posteriormente el secado hasta peso constante del producto precipitado.

El porcentaje de conversión (%C) del copolímero se calculó gravimétricamente a partir de la siguiente ecuación:

$$\%C = (\text{masa copolímero} / (\text{masa AcV} + \text{masa fumarato})) \times 100 \quad \text{Ecuación 2.1}$$

### 2.2.1.2 Caracterización de los copolímeros

Los pesos moleculares promedio en peso y en número ( $M_w$  y  $M_n$  respectivamente) y el índice de polidispersidad ( $M_w/M_n$ ) de los copolímeros obtenidos se evaluaron mediante Cromatografía de Exclusión Molecular (SEC por las siglas en inglés para Size-Exclusion Chromatography) en un equipo LKB-2249 a 25 °C. Se utilizó un set de 4 columnas  $\mu$ -Styragel® en serie, con tamaño de poro  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $100 \text{ \AA}$  utilizando  $\text{CHCl}_3$  (99,99% (ASC), J.T. Baker) como fase móvil. La concentración del polímero analizado fue de aproximadamente 10 mg/ml y la velocidad de flujo de 0,5 ml/min. Se emplearon dos detectores en serie:<sup>38</sup> uno UV-Vis Shimadzu SPD-10A a una longitud de onda de 254 nm y otro detector infrarrojo Miram IA seleccionado a  $5,75 \mu\text{m}$ , frecuencia característica del grupo carbonilo presente a lo largo de la cadena del polímero. La calibración se realizó a partir de estándares de polimetilmetacrilato (Polymer Laboratories y Polysciences, Inc).

La composición de los copolímeros fue calculada a partir de los desplazamientos de los distintos tipos de hidrógenos presentes en los comonómeros utilizando espectroscopia  $^1\text{H-RMN}$  en un equipo Varian-200MHz (Mercury 200) a 45 °C aproximadamente, en  $\text{CDCl}_3$  para el AcV-co-FDO-MO y AcV-co-FIP-MO.

El análisis de los grupos funcionales se realizó mediante Espectroscopía Infrarroja con Transformadas de Fourier (FTIR) empleando un equipo Nicolet 380

FTIR (Thermo Electron Corporation, Madison WI, USA) entre 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$  y 32 scans de acumulación. El análisis del espectro se efectuó mediante el software EZOMNIC 7.4.127, Thermo Fisher Scientific Inc, Madison, WI, USA).

La temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) se determinó mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) en un equipo Shimadzu-TA60. Las muestras de alrededor de 5 mg se midieron a 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  desde -30 hasta 150  $^{\circ}\text{C}$  realizándose tres ciclos: calentamiento-enfriamiento-calentamiento.

## **2.2.2 Síntesis de copolímeros en solución. Polimerización por adición-fragmentación y transferencia de cadena reversible (RAFT)\***

### **2.2.2.1 Procedimiento experimental de la copolimerización en solución**

Las reacciones de copolimerizaciones en solución se llevaron a cabo empleando acetato de etilo como solvente a 80  $^{\circ}\text{C}$  y como iniciador se empleó 2,2'-azobisisobutironitrilo (AIBN, Fluka) previamente purificado por recristalización desde metanol.<sup>39</sup>

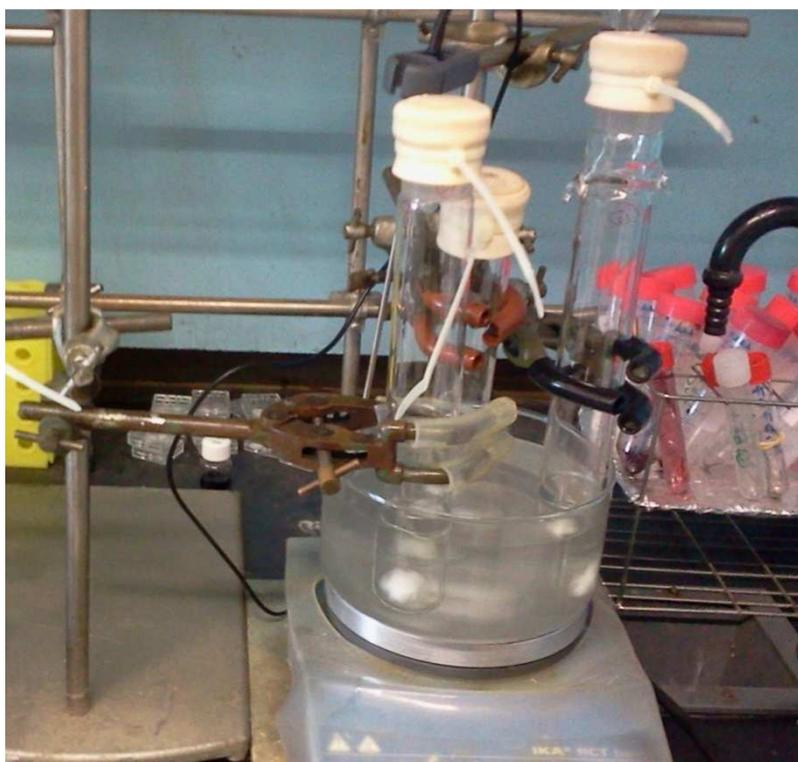
Las relaciones molares empleadas entre los reactivos fueron monómero: CTA: iniciador = 100:1:0,5 y 100:0:0,5 correspondiendo la primera relación a reacciones de polimerización controlada tipo RAFT y la segunda a copolimerizaciones convencionales en solución. A su vez, los comonómeros se colocaron en relaciones acetato de vinilo: fumarato de di-2-octilo 75:25 y 50:50; con una masa total de monómeros de aproximadamente 5 gr. en 25 ml de solvente con un tiempo de reacción de 24hs.

---

\* Esta parte del trabajo doctoral ha sido desarrollada durante una estancia de investigación bajo la dirección de la Dra. Marta Fernández-García en el grupo de Ingeniería Macromolecular del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (ICTP) de Madrid, España, dependiente del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Técnica experimental:

Los monómeros, el iniciador, el CTA y el solvente se colocaron en tubos de vidrio, lo cuales fueron cerrados con septum, asegurados con un precinto y burbujeados con Argón durante 10 minutos en baño de hielo. Posteriormente, se retiraron del baño de hielo y, una vez alcanzada la temperatura ambiente, se llevaron a un baño de silicona a 80 °C con agitación magnética durante el tiempo de reacción correspondiente, como se aprecia en la Imagen 2.2.



**Imagen 2.2:** Reacciones de polimerización en solución

Una vez alcanzado el tiempo de reacción, se eliminó el solvente mediante evaporador rotatorio y se realizó una purificación por disolución/precipitación en hexano/metanol. Esta forma resultó en el mejor procedimiento de purificación en relación a la precipitación directa desde el solvente de reacción.

El control de pureza se realizó mediante  $^1\text{H}$ -RMN, observando la ausencia de las señales pertenecientes a los hidrógenos vinílicos de los monómeros.

El porcentaje de conversión (%C) se calculó gravimétricamente a partir de la Ecuación 2.1.

### 2.2.2.2 Caracterización de los copolímeros

Los pesos moleculares promedio en peso ( $M_w$ ) y la distribución de pesos moleculares se evaluaron por Cromatografía de Exclusión Molecular (SEC), empleando un sistema cromatográfico (Waters Division Millipore) equipado con un detector de índice de refracción Waters 410. Se utilizó un set de columnas Styragel® (HR2, HR3, y HR4E HR5E, Waters Division Millipore), tetrahidrofurano (THF, Scharlau) como eluyente a un caudal de 1 ml/min a 35 °C. La calibración se realizó mediante estándares de Polimetilmetacrilato (Polymer Laboratories, Laboratories, Ltd.).

La composición de los copolímeros se determinó por  $^1\text{H}$ -RMN empleando un equipo Bruker 300 MHz con  $\text{CDCl}_3$  como solvente (en algunos copolímeros se empleó DMSO deuterado) a 25 °C y 64 scans de acumulación y TMS como patrón interno de referencia.

El control de pureza se efectuó mediante la técnica descrita, controlando la ausencia de las señales de los H vinílicos de los monómeros de partida.

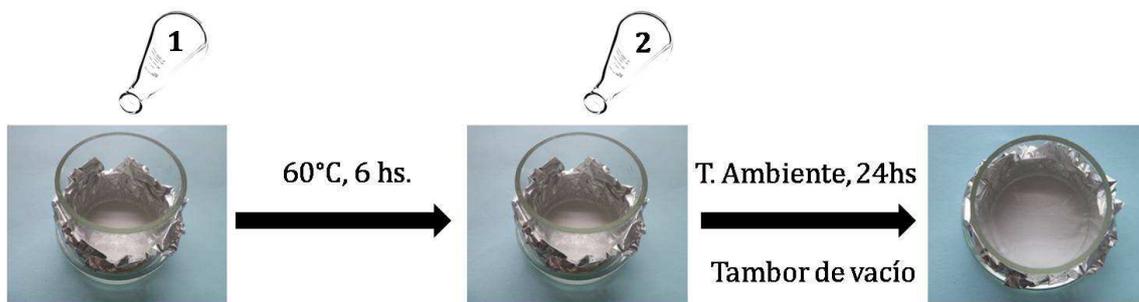
## 2.3 Elaboración de membranas

### 2.3.1 Películas de copolímero

#### Método de elaboración

Las películas fueron elaboradas mediante el método de *solvent-casting*, el cual se basa en la disolución del copolímero en un solvente adecuado seguido del volcado de la solución obtenida en un molde y la posterior evaporación del disolvente, permitiendo así la formación del film.

Las membranas se realizaron a partir de la técnica descrita por Biswajit Mukherjee y colaboradores<sup>40</sup> empleando como sostén una membrana de alcohol polivinílico (PVA) sobre la cual se deposita una solución del copolímero solo o conteniendo la droga.



1 - Solución PVA en agua - etanol (90 :10)

2 - Solución del copolímero en Acetato de Etilo

**Esquema 2.3:** Procedimiento de elaboración de las películas

El Esquema 2.3 muestra los pasos de la elaboración de las membranas: se tomaron como molde secciones de tubos de vidrio (4,7 cm de diámetro interno y 5 cm. de altura, medidos con micrómetro Mauser), cuyas bases fueron recubiertas

previamente con papel aluminio. Sobre cada una de estas se formó una película de PVA (PS, Merck, 72000, grado de hidrólisis >98%) a partir de una solución aproximadamente 6% p/v en agua: etanol 90:10, con un tiempo de secado de 6 hs a 60 °C (alternativamente puede realizarse el secado a 30 °C durante 24 hs). Se obtuvieron membranas de soporte uniformes de PVA sobre cada una de las cuales se depositó una solución obtenida a partir de 0,5 gr. del copolímero en 4,0 ml de acetato de etilo (99,9%, Anedra) (tiempo de solubilización: 24 hs con agitación). La masa de copolímero seleccionada corresponde al valor que en relación al diámetro del molde, arroja películas de aproximadamente 200 µm de espesor, dimensión esperada para parches transdérmicos.<sup>41</sup>

Una vez volcada la solución en el molde (con posterior lavado de los matraces con 1,5 ml de acetato de etilo), el solvente se dejó evaporar a temperatura ambiente durante 24 hs. Las trazas de solvente fueron eliminadas por secado en tambor de vacío.

### 2.3.2 Caracterización

La caracterización de las membranas se realizó con la finalidad de seleccionar un material cuyas propiedades resulten más apropiadas para ser potencialmente empleado en la elaboración de sistemas de liberación transdérmicos.

#### 2.3.2.1 Apariencia y morfología

La apariencia y transparencia de las películas se evaluaron visualmente, mientras que la morfología superficial y el corte se estudiaron mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM, por las siglas en inglés para Scanning Electron Microscopy) en un equipo Phillips 505, The Netherlands; con una aceleración de voltaje de 20 kV, y las imágenes fueron analizadas mediante Soft Imaging System ADDAII.

El espesor de las membranas fue determinado empleando un micrómetro Mauser.

### 2.3.2.2 Ensayos de adhesión

Con el objetivo de evaluar la capacidad adhesiva en la piel de las películas de copolímero obtenidas y generar un criterio más riguroso de selección de los materiales, se llevaron a cabo ensayos de adhesión a través de una prueba cualitativa denominada “la prueba del pulgar” (*thumb test* en inglés) para evidenciar la adhesión inicial (*tack*, cuya traducción sería “pegajosidad”) y determinar cuán eficaz es la unión entre el adhesivo sensible a la presión y la piel.<sup>42</sup>

#### Prueba del pulgar

El pulgar fue puesto en contacto con la muestra durante un breve tiempo y luego retirado rápidamente. De esta forma, fue posible estimar la facilidad, rapidez y fuerza con la cual el adhesivo es capaz de adherirse a la piel.<sup>43</sup>

Los resultados se expresaron según las siguientes categorías: ADHESIVO, POCO ADHESIVO y NO ADHESIVO. A su vez, se evaluó la existencia de residuo una vez retirado el pulgar de la membrana como: CON RESIDUO o SIN RESIDUO. Los ensayos se realizaron a simple ciego y con un número de sujetos n=10.

### 2.3.2.3 Estudio de hinchamiento

La capacidad de absorción de líquido (hinchamiento, *swelling*) del material se determinó mediante el siguiente procedimiento:<sup>30</sup> inicialmente se realizó el pesaje de porciones de membrana previamente secadas en tambor de vacío ( $w_o$ ) y posteriormente se llevó a cabo su inmersión en buffer fosfato (pH=7,4) a 25 °C. A tiempos definidos, las membranas fueron retiradas y pesadas nuevamente esta vez en estado húmedo ( $w_d$ ). El contenido de agua absorbida por la película se calculó como la diferencia entre  $w_d$  y  $w_o$ , mientras que el porcentaje de *swelling* se definió como:

$$\%Sw = \frac{w_d - w_o}{w_o} * 100 \quad \text{Ecuación 2.2}$$

El mecanismo mediante el cual ocurre el proceso de transporte de agua a través de la matriz polimérica se estimó mediante el empleo del modelo de Ritger-Peppas utilizando la siguiente ecuación:<sup>44</sup>

$$\frac{W_t}{W_\infty} = k t^n \quad \text{Ecuación 2.3}$$

donde cada uno de los parámetros corresponden a:

$W_t$  y  $W_\infty$ : cantidades de agua absorbidas al tiempo  $t$  y en el equilibrio respectivamente.

$k$ : constante propia del sistema y que depende de las características estructurales del polímero y de las interacciones de éste con el solvente.

$n$ : exponente cuyo valor es indicativo del tipo de mecanismo mediante el cual se desarrolla el transporte del medio hacia la matriz polimérica.

#### 2.3.2.4 Evaluación de la eficacia del método de *solvent-casting*

Con la finalidad de evaluar la cantidad real de copolímero en las películas, y de esta forma estimar la eficacia del método de *casting* empleado, se prepararon soluciones ( $n=5$ ) de copolímero en ausencia de risedronato cada una con la masa correspondiente a una película en 4,0 ml de acetato de etilo (99,9%, Anedra). Las masas de polímero empleadas en las soluciones fueron determinadas empleando una balanza analítica Mettler H20T (precisión  $\pm 0,01$  mg) a 25 °C. Luego de 24 horas, las soluciones fueron volcadas (con posterior lavado de los matraces con 1,5 ml de solvente) sobre moldes de papel aluminio previamente pesados. Se dejó evaporar el solvente y las trazas se eliminaron en tambor de vacío hasta peso constante. Las masas de copolímero final obtenidas se refirieron a las pesadas inicialmente y se estimó la eficacia del método.

### 2.3.3 Películas de copolímero conteniendo risedronato

#### 2.3.3.1 Risedronato

En la primera etapa del proceso de desarrollo del material, se realizaron la síntesis y caracterización del risedronato monosódico (RI) a partir de una técnica descrita previamente<sup>45</sup> empleando como reactivos el 3-piridinacetronitrilo ( $\geq 97\%$ , Fluka), ácido metansulfónico (85%, Sigma Aldrich) y tricloruro de fósforo ( $\geq 99\%$ , Merck).

Previo a su uso, el bifosfonato se caracterizó mediante  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN en un equipo Varian Mercury 200 MHz en agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) registrándose los espectros a  $35\text{ }^\circ\text{C}$ , y también se llevó a cabo el control de pureza mediante la medición del punto de fusión.

El espectro infrarrojo del RI se obtuvo por Espectroscopia Infrarroja de Reflectancia Difusa por Transformada de Fourier (DRIFT, por las siglas en inglés para Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform), en un equipo Shimadzu IR Affinity-1 con 40 scans de acumulación entre  $4000$  y  $500\text{ cm}^{-1}$ .

También se determinó el espectro UV-vis del RI en un espectrofotómetro UV-vis Perkin Elmer Lambda 35, entre  $200$  y  $500\text{ nm}$  con una resolución de  $1\text{ nm}$  a partir de una solución del bifosfonato en agua destilada.

#### 2.3.3.2 Método de incorporación de risedronato

El RI es soluble en soluciones acuosas, pero mayormente insoluble en disolventes orgánicos tales como el etanol (prácticamente insoluble) y el isopropanol (insoluble).<sup>46</sup> Esta característica plantea una dificultad a la hora de incorporar la droga a la matriz polimérica utilizando el método de *casting*. Para lograr esto, se procedió a la generación de una dispersión homogénea del bifosfonato en la solución del copolímero: el RI pesado en balanza analítica Mettler H20T (precisión  $\pm 0,01\text{ mg}$ ) a  $25\text{ }^\circ\text{C}$ , fue incorporado a las soluciones del

copolímero en acetato de etilo y dispersado mediante ultrasonido con un Sonicador Bandelin *Sonorex* RK100 durante 15 min.

### 2.3.3.3 Apariencia

Se estudió la apariencia de las membranas conteniendo RI a 6% p/p y 12% p/p (relación RI/copolímero) y se evaluó el grado de homogeneidad de la dispersión del bisfosfonato en las películas mediante apreciación visual y a través de Microscopía Óptica, esta última empleando un microscopio óptico BX51 modelo Olympus con procesador de imagen DP Controller.

El espesor de las membranas fue determinado empleando un micrómetro Mauser.

### 2.3.3.4 Estudio de interacciones droga-copolímero

La posible existencia de interacciones entre el RI y la matriz polimérica se estudió mediante Espectroscopía Infrarroja con Transformadas de Fourier de manera similar a la realizada por otros autores.<sup>47</sup> Los espectros de los copolímeros conteniendo la droga se evaluaron por transmisión en un equipo Shimadzu IRAffinity-1 con 40 scans de acumulación entre 4000 y 500  $\text{cm}^{-1}$  empleando soluciones de copolímero y droga en relación 6% p/p y 12% p/p casteadas sobre moldes de teflón, retiradas en frío y aseguradas con papel en los extremos.

Las señales obtenidas fueron comparadas con las correspondientes al copolímero en ausencia del bifosfonato.

## 2.4 Ensayos de liberación *in vitro*

### 2.4.1 Determinación de risedronato por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia

#### 2.4.1.1 Método cromatográfico

El perfil cromatográfico del RI se obtuvo mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC, por las siglas en inglés de High Performance Liquid Chromatography). Se utilizó un cromatógrafo HP 1100, equipado con una columna ZOBAX Eclipse XDB-C18 (4,6 x 150 mm, 5  $\mu$ m), a 25 °C empleando un detector con arreglo de diodo seleccionado en tres canales paralelos a dos longitudes de onda: 262 nm (longitud de onda de máxima absorción del RI sódico) sin referencia y con referencia a 360 nm simultáneamente y 254 nm (longitud de onda de absorción de los anillos aromáticos) sin referencia como control de posibles impurezas presentes en la muestra. El volumen de inyección fue de 100  $\mu$ l con posterior lavado de la aguja.

Como fase móvil se empleó una mezcla 75 : 25 de buffer fosfato : metanol a una caudal de 1ml/min. El buffer fosfato utilizado presentaba la siguiente composición y características:

Composición: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O: 0,085 M (Schuchardt München); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 0,0022 M (99% Anedra) y (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>N<sup>+</sup> Br<sup>-</sup> (Bromuro de Tetrabutil Amonio, 98%, Sigma-Aldrich): 5 mM. Filtrado en filtro de Nitrocelulosa-Ésteres de Celulosa 0,22  $\mu$ m, 47 mm, msi (Micron Separations Inc.) pH: 7.45; determinado con pH-metro Consort P903.

El metanol (99,9% RA (ACS), Anedra) fue filtrado a través de filtros de Politetrafluoroetileno (PTFE, teflon) 0,45  $\mu$ m, 47 mm, OSMONICS INC. Las filtraciones de solventes se realizaron a través de un portafiltros de vidrio con embudo y abrazadera de 47 mm de diámetro en un kitasato conectado a trompa de agua.

Las soluciones de RI se realizaron en buffer fosfato sin  $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_4\text{N}^+$  Br<sup>-</sup> y previo a su inyección fueron filtradas empleando filtros de Nylon 0,45  $\mu\text{m}$ , 13 mm, OSMONICS INC.

Una vez desarrollado el método cromatográfico se efectuó el estudio de sus parámetros: Repetibilidad, Linealidad, Exactitud (o tendencia) y Sensibilidad. El análisis de la estadística asociada a cada uno se realizó mediante el programa Graph Pad Prism 6.

### 2.4.1.2 Repetibilidad

La repetibilidad del método se evaluó mediante la realización de 6 inyecciones consecutivas de una solución estándar de RI medidas bajo las condiciones del método 2.4.1.1.

Se calcularon el promedio de área, desviación estándar y RSD% (desviación estándar relativa), este último a partir de la siguiente fórmula:

$$RSD\% = \frac{Sd}{X_{media}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2.4}$$

en la cual:

$X_{media}$ : media de las mediciones.

$Sd$ : desviación estándar de las medidas.

### 2.4.1.3 Linealidad

Se prepararon soluciones estándares en buffer fosfato (pH=7,45) a partir de dos soluciones madres preparadas con 0,01 gr. de RI . 2,5H<sub>2</sub>O en 100 ml de buffer fosfato (87 ppm<sup>‡</sup> de RI) y sus respectivas diluciones al 75, 50, 25 y 5% v/v. La calibración se realizó siguiendo el método descrito en 2.4.1.1, con dos inyecciones de cada solución patrón.

A partir de los resultados obtenidos se estimaron los parámetros de la curva (pendiente y ordenada al origen), los intervalos de confianza para los anteriores

---

<sup>‡</sup> ppm =  $\mu\text{g/ml}$

parámetros con  $p=0,05$  (95% confianza), el coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ), el coeficiente de determinación ( $R^2=r^2$ ), se realizó el test de Student para el coeficiente de correlación de Pearson y se determinó el coeficiente de Olkin Pratt.

#### 2.4.1.4 Exactitud

Se elaboraron soluciones conteniendo distintas concentraciones de RI en relación a la cantidad teórica de droga total liberada a partir de las membranas. Las anteriores soluciones se realizaron con las siguientes relaciones: 3 soluciones conteniendo 50% de la cantidad teórica de la droga liberada a partir de una membrana conteniendo 6%p/p de RI, 3 conteniendo el 100% y 3 conteniendo el 150%, todas las masas anteriores referidas a un volumen de 1000 ml (volumen de buffer fosfato empleado en los ensayos de liberación). Cada inyección se realizó por triplicado.

Se calculó la recuperación porcentual a partir de la siguiente fórmula:

$$R = \frac{X_{media}}{X_{verdadero}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2.5}$$

donde

$R$ : recuperación porcentual.

$X_{verdadero}$ : es el valor calculado al preparar las concentraciones.

$X_{media}$ : media de los tres estándares medidos por triplicado.

La desviación estándar relativa (RSD%) de la recuperación se calculó mediante la fórmula descrita en 2.4.1.2.

#### 2.4.1.5 Sensibilidad. Límite de concentración y detección

La sensibilidad del método se evaluó mediante la estimación de los límites de cuantificación ( $L_c$ ) y detección ( $L_d$ ), donde cada uno se define como:

$L_d$ : mínima concentración de analito detectada por el método.

$L_c$ : concentración posible de ser cuantificada por el método.

Para el cálculo de  $L_c$  y  $L_d$  se utilizaron 3 soluciones de RI en buffer fosfato correspondientes a las diluciones al 10%, 5% y 2% v/v de una solución madre de

RI preparada con 0,01 gr. de RI . 2,5 H<sub>2</sub>O en 100 ml en una solución de buffer fosfato, las cuales se realizaron por triplicado con dos inyecciones por punto. A partir de las áreas obtenidas para cada solución se construyó una recta de regresión y se calcularon los valores para el Lc y Ld de la siguiente forma:

$$Ld = \frac{3,3 \sigma}{B} \quad \text{Ecuación 2.6}$$

$$Lc = \frac{10 \sigma}{B} \quad \text{Ecuación 2.7}$$

donde:

*B*: pendiente de la recta de regresión.

$\sigma$ : desviación estándar del y-intercepto de la recta.

### 2.4.2 Determinación del porcentaje de carga de la droga en la matriz

El porcentaje de droga cargada en la matriz se calculó empleando un método indirecto mediante el cual se determinó la droga residual para luego referirla a la masa inicial y así estimar la eficiencia de carga del activo en la membrana.<sup>48</sup> La evaluación del RI incorporado se llevó a cabo a través de la medición de la droga remanente contenida en los recipientes de las soluciones de copolímero conteniendo RI luego de la realización del casteado. Los matraces empleados fueron secados en vacío para la eliminación del solvente residual, y una vez secos, se les colocaron 10,0 ml de buffer fosfato ((Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> . 12 H<sub>2</sub>O: 0,085 M (Schuchardt München); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 0,0022 M (99% Anedra); pH=7,5 medido con pH-metro Consort C830)) a 34,0 °C en estufa de cultivo (SAN JOR, Modelo SL20CDB, precisión ± 0,1°C) durante 48 hs. Como blanco de la determinación se utilizaron los matraces empleados en 2.3.1.2 (considerando que éstos contienen los restos de copolímero

sin bisfosfonato, pudiendo dar así las posibles señales base del sistema). Los ensayos se realizaron a dos relaciones RI/polímero de 6% p/p y 12% p/p por triplicado cada uno.

Transcurridas las 48hs. se tomaron alícuotas de cada matraz y se procedió a la determinación de RI residual por HPLC según las condiciones descritas en 2.4.1.1. La señal del RI se convirtió mediante curva de calibración en masa considerando el volumen de buffer colocado y se refirió a la masa inicialmente cuantificada.

### 2.4.3 Estabilidad del risedronato en solución acuosa

La estabilidad del RI en solución acuosa a la temperatura en las cual se realizaron los ensayos de liberación, se estudió mediante el control del título de 2 soluciones estándares de RI (baja y alta concentración) en buffer fosfato, las cuales fueron mantenidas a 34,0 °C en estufa de cultivo (SAN JOR, Modelo SL20CDB, precisión  $\pm 0,1$  °C) durante 9 días consecutivos. Como blanco se utilizó una solución de buffer fosfato ((Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O: 0,085 M (Schuchardt München); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 0,0022 M (99% Anedra); pH=7,5 medido con pH-metro Consort C830) y se sometió en simultáneo a las mismas condiciones que las soluciones objeto de control.

El título de los patrones se evaluó diariamente por HPLC según 2.3.3.1, al igual que los espectros UV-vis, con el fin de observar la existencia de alguna variación en las bandas de absorción. Las inyecciones de cada solución se realizaron por triplicado con el fin de contemplar posibles variaciones dadas por el método.

### 2.4.4 Perfiles de Liberación

Los perfiles de liberación del RI desde la matriz polimérica se realizaron a partir de dos relaciones RI/polímero: 6% p/p y 12% p/p, cada uno por triplicado. Los ensayos se llevaron a cabo en un disolutor ELECTROLAB TDT 08L (Imagen 2.3) conteniendo en cada vaso 1000 ml de buffer fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ : 0,085 M (Schuchardt München);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 0,0022 M (99% Anedra); pH=7,5 medido con pHmetro Consort C830) con una agitación de  $100 \pm 1$  rpm a  $34 \pm 0,1$  °C cuya distancia entre las paletas y el fondo del vaso fue de 2,5 cm.

La temperatura seleccionada fue levemente inferior a la fisiológica debido a que al ser la piel una superficie en constante contacto con el exterior, su temperatura no corresponde estrictamente con el valor de 37 °C sino que es menor y varía según distintos factores tales como la zona corporal en estudio, las condiciones exteriores y el nivel de reposo/movimiento de los cuerpos a evaluar.<sup>49</sup>



Imagen 2.3: Equipo disolutor

En los ensayos se tomaron alícuotas de 2,0 ml con pipeta automática (Microlit, 0,5-5 ml.) a distintos tiempos con reposición del volumen extraído por buffer fosfato.

Los perfiles de liberación se obtuvieron mediante el análisis de las muestras por HPLC según 2.4.1.1, previa filtración con filtros de Nylon 0,45  $\mu\text{m}$ , 13 mm, OSMONICS INC.

### 2.4.5 Modelos Teóricos

La liberación de RI desde la matriz polimérica se estudió mediante distintos modelos teóricos empleados en el análisis de los mecanismos involucrados en el transporte de principios activos en sistemas transdérmicos. A partir de estos modelos matemáticos, se calcularon el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el coeficiente de determinación ajustado ( $R^2_{\text{ajustado}}$ ) de la recta correspondiente a cada caso como criterio para la determinación del mejor modelo que se adapte a los resultados obtenidos. Los datos experimentales se procesaron mediante el programa Origin® 9.1.

#### 2.4.5.1 Modelo de Cinética de Orden Cero

El modelo de Cinética de Orden Cero describe un comportamiento de liberación del principio activo el cual es independiente a su concentración siendo solamente función del tiempo.<sup>50</sup> La ecuación matemática propia del modelo es la siguiente:

$$Q_t = Q_0 + K_0 t \quad \text{Ecuación 2.8}$$

donde:

$Q_t$ : cantidad de activo liberado en el tiempo  $t$ .

$Q_0$ : cantidad inicial de activo en la solución (generalmente  $Q_0=0$ ).

$K_0$ : constante de orden cero.

$t$ : tiempo.

Con los datos experimentales, se realizó el gráfico  $Q_t$  vs  $t$  y se obtuvo la correspondiente recta de regresión.

### 2.4.5.2 Modelo de Cinética de Primer Orden

En este modelo, durante la liberación del activo, la cantidad liberada a un determinado tiempo es proporcional al remanente en el interior de la matriz:<sup>51,52</sup>

$$\log Q_t = \log Q_0 + \frac{K_1 t}{2,303} \quad \text{Ecuación 2.9}$$

donde:

$Q_t$ : cantidad de activo liberado en el tiempo  $t$ .

$Q_0$ : concentración inicial de activo en la solución (generalmente  $C_0=0$ ).

$K_1$ : constante de primer orden.

$t$ : tiempo

Para evaluar el ajuste de los datos experimentales se realizó el gráfico  $\log Q_t$  en función del tiempo para obtener la recta correspondiente al modelo.

### 2.4.5.3 Modelo de Higuchi

El Modelo de Higuchi<sup>53</sup> plantea matemáticamente el estudio de la relación entre la cantidad de droga liberada por unidad de área con el tiempo para el caso de drogas sólidas dispersas en matrices sólidas. Particularmente, para un sistema planar basado en una matriz polimérica homogénea conteniendo un principio activo, este modelo emplea la siguiente fórmula:

$$Q = \sqrt{D t (2A - C_s) C_s} \quad \text{Ecuación 2.10}$$

donde:

$Q$ : cantidad del principio activo liberado en el tiempo  $t$  por unidad de área expuesta.

$D$ : coeficiente de difusión de la droga en la matriz.

$A$ : cantidad de droga presente en la matriz por unidad de volumen.

$C_s$  : solubilidad de la droga en la matriz polimérica.

$t$  : tiempo.

La ecuación anterior puede simplificarse reordenándola de manera de agrupar todas las constantes y hacer notoria la dependencia con la raíz cuadrada del tiempo:

$$Q = K_H \sqrt{t} \quad \text{Ecuación 2.11}$$

A partir de la anterior expresión obtenida, se graficó la cantidad de droga liberada por área expuesta en función de la raíz cuadrada del tiempo y se estimó el coeficiente de correlación correspondiente a la recta.

#### 2.4.5.4 Modelo de Weibull

El modelo de Weibull tiene su base en la siguiente ecuación empírica:<sup>51</sup>

$$m = 1 - \exp\left[\frac{-(t-T_i)^b}{a}\right] \quad \text{Ecuación 2.12}$$

en la cual:

$m$ : fracción acumulada de droga, puede reescribirse como  $M_t/M_\infty$ :  $M_t$  y  $M_\infty$  los cuales corresponden a la masa de droga al tiempo  $t$  y en el "plateau" de la liberación, respectivamente

$t$ : tiempo.

$T_i$ : tiempo de latencia del proceso de liberación (generalmente es nulo).

$a$ : parámetro en relación a  $T_d$  como  $a=(T_d)^b$ .  $T_d$  corresponde al intervalo de tiempo necesario para liberar el 63,2% de la droga presente en la matriz.<sup>51</sup>

$b$ : parámetro que describe la forma de la curva.

Despreciando  $T_i$ , reescribiendo  $m$  y aplicando logaritmo a la anterior ecuación, se obtiene la siguiente forma lineal:<sup>52</sup>

$$\log[-\ln(1 - (M_t/M_\infty))] = b \log(t) - \log a$$

**Ecuación 2.13**

Graficando  $\log [-\ln(1-(M_t/M_\infty))]$  versus  $\log (t)$  se obtiene la correspondiente recta y su correlación.

#### 2.4.5.5 Modelo de Ritger-Peppas

Ritger y Peppas presentaron en 1987 una ecuación empírica<sup>44</sup> cuya finalidad era describir el comportamiento general de la liberación de principios activos a partir de matrices poliméricas. La ecuación simplificada se presenta a continuación:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k t^n \quad \text{Ecuación 2.14}$$

donde:

$M_t/M_\infty$ : fracción de soluto liberado,  $M_t$  y  $M_\infty$  corresponden a la masa de droga al tiempo  $t$  y en el "plateau" de la liberación, respectivamente.

$k$ : constante.

$t$ : tiempo de liberación.

$n$ : exponente difusivo característico del mecanismo de la liberación.

Esta ecuación se aplica para el primer 60% de la fracción de activo liberada desde la matriz y permite estimar el mecanismo de transporte involucrado (Fickiano o no Fickiano) a partir del valor obtenido para el exponente  $n$  en una geometría definida. Para el caso particular de las membranas diseñadas en esta tesis, la geometría del sistema es plana (película delgada). Para estos sistemas los valores posibles que puede adoptar  $n$  según el mecanismo de transporte existente se describen a continuación:<sup>51</sup>

Mecanismo de Transporte	$n$
Transporte tipo Fickiano	0.50
Transporte anómalo	$0.50 < n < 1.00$
Caso II de transporte	1.00
Super caso II de transporte	$n > 1.00$

**Tabla 2.1:** Valores del exponente  $n$  en el modelo de Ritger-Peppas según el mecanismo de transporte involucrado para la geometría plana.

**Nota** Fuente: Tabla adaptada de Costa,P.; Sousa, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. Eur. J. Pharm. Sci. **2001**,13(2):123-33.

En el primer caso de la Tabla 2.1 el valor  $n = 0.50$  corresponde a un mecanismo de Tipo Fickiano (Caso I) en el cual el transporte está gobernado por un proceso puramente difusivo. La situación en que  $0.50 < n < 1.00$  corresponde a un mecanismo no-Fickiano de tipo anómalo, donde el transporte de la droga está regido por contribuciones dadas por los fenómenos de difusión y de relajación del polímero.<sup>54</sup>

El Caso II de transporte se define para  $n = 1.00$  y corresponde al Modelo de Cinética de Orden Cero donde el mecanismo predominante es el de hinchamiento o relajación de las cadenas poliméricas. Un valor de  $n = 1.00$  indica que la liberación de la droga corresponde a una cinética de Orden Cero independientemente de la geometría, solamente para el caso de películas éste valor es coincidente con el Caso II de transporte. Para las formas cilíndricas y esféricas de dispositivos, los valor de  $n$  referentes al Caso II de transporte son 0.89 y 0.85 respectivamente.<sup>54</sup>

Por último, cuando  $n > 1.00$  se observa una forma extrema de transporte denominada Super Caso II que puede explicarse como la consecuencia de un proceso de plastificación en la capa gel del sistema producto del aumento de la

movilidad de las cadenas poliméricas resultado de una reducción en las fuerzas atractivas entre ellas.<sup>55</sup>

Matemáticamente, para realizar el análisis con los datos experimentales, se aplica logaritmo a ambos lados de la ecuación del modelo y se obtiene:

$$\log\left(\frac{M_t}{M_\infty}\right) = \log k + n \log t \quad \text{Ecuación 2.15}$$

de donde es posible obtener  $n$  como la pendiente de la recta  $\log(M_t/M_\infty)$  vs  $\log t$ .

## CAPÍTULO 3

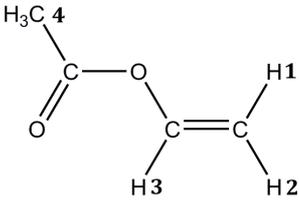
# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 3.1 Monómeros y agente de transferencia de cadena

### 3.1.1 Monómeros

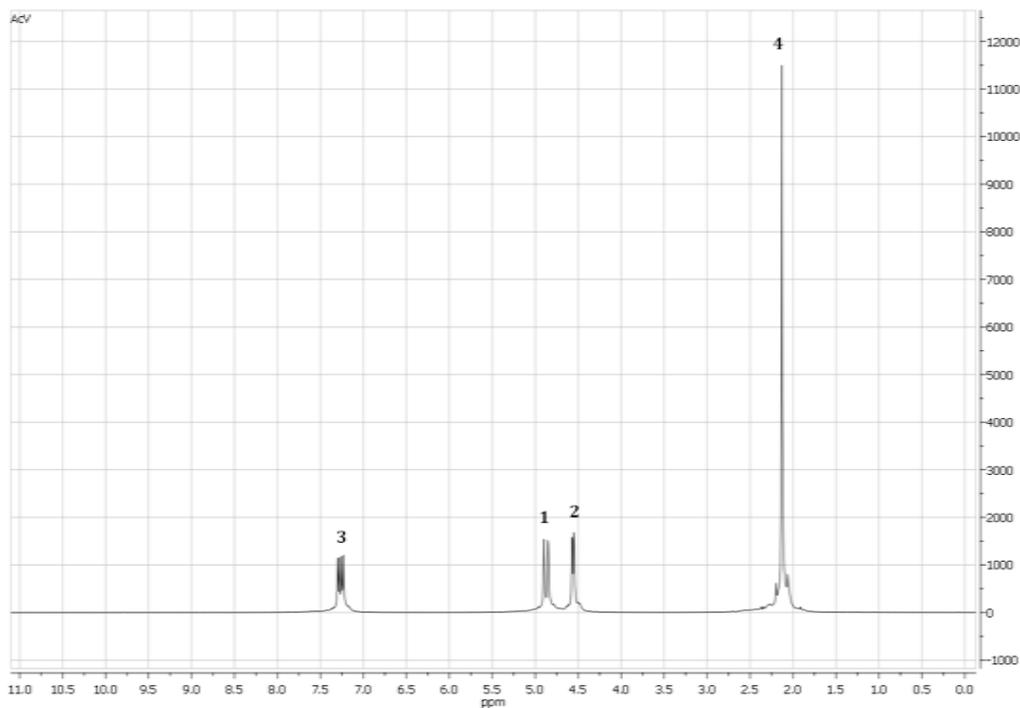
#### 3.1.1.1 Acetato de vinilo

El control de pureza del AcV purificado por destilación fraccionada, realizado mediante TLC, evidenció la presencia de hidroquinona únicamente en el residuo de destilación. Por su parte, el AcV purificado por columna se analizó mediante  $^1\text{H}$ -RMN, observándose solamente de las señales correspondientes a los hidrógenos monoméricos. Las señales del monómero con sus correspondientes asignaciones en la estructura del compuesto se detallan en la Tabla 3.1 las cuales se correlacionan con el espectro obtenido que se muestra en la Figura 3.1.

<p><b>Estructura del acetato de vinilo</b></p>	
<p><b><math>^1\text{H}</math>-RMN (CDCl<sub>3</sub>) <math>\delta</math> (ppm) (multiplicidad, integración) (asignación)</b></p>	<p>4,88 (doble d, 1H) <b>(1)</b>; 4,57 (doble d, 1H) <b>(2)</b>; 7,27 (doble d, 1H) <b>(3)</b>; 2,14 (s, 3H) <b>(4)</b></p>

**Tabla 3.1:** Asignación de señales del espectro  $^1\text{H}$ -RMN del AcV

## 3.1 Monómeros y Agente de Transferencia de Cadena

Figura 3.1: Espectro  $^1\text{H}$ -RMN del AcV

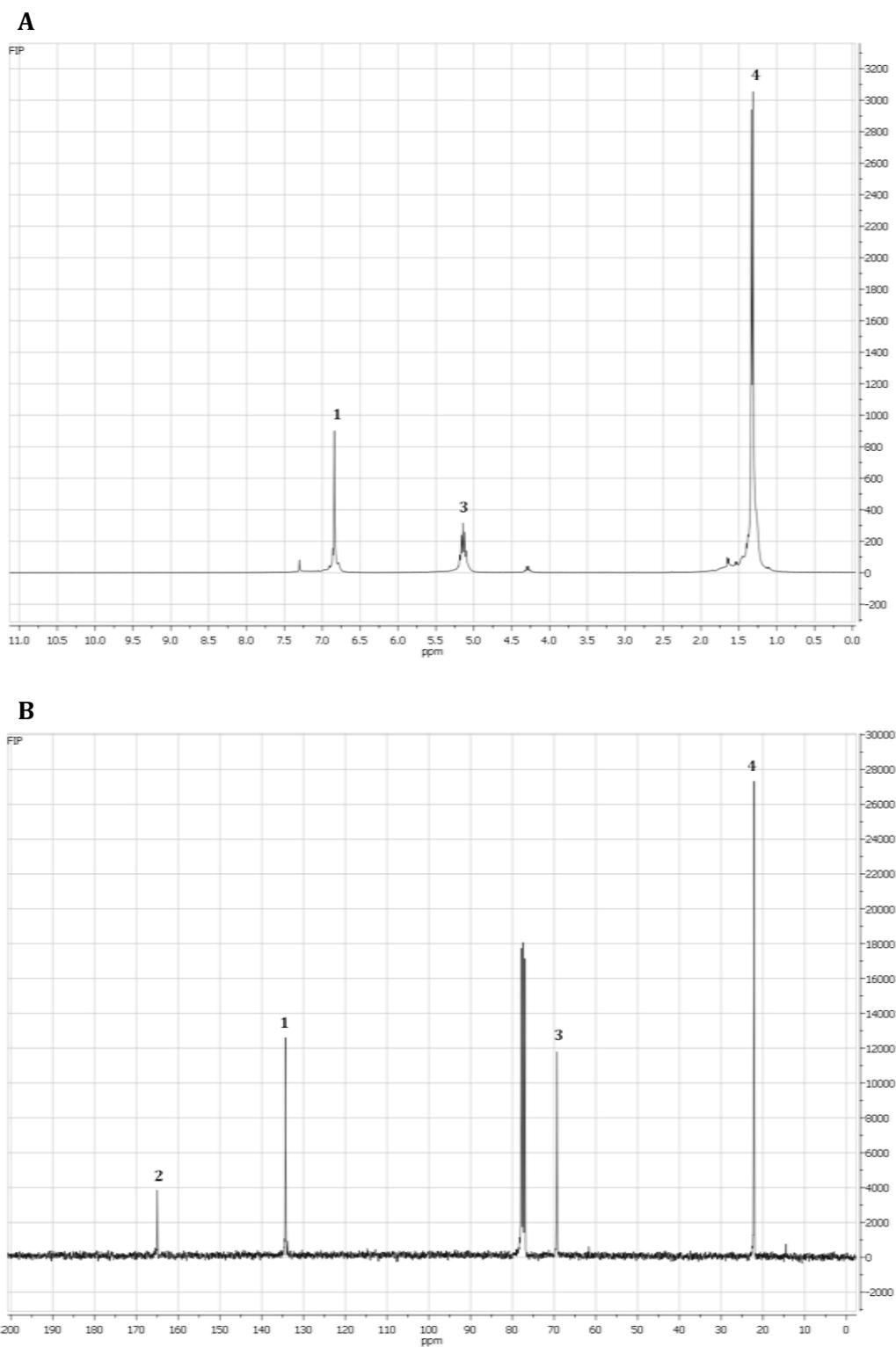
## 3.1.1.2 Fumarato de diisopropilo

Las señales observadas en la caracterización y control de pureza del FIP, realizados empleando  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN, se detallan en la Tabla 3.2 y los espectros y sus correspondientes asignaciones se muestran en la Figura 3.2.

<b>Estructura del Fumarato de diisopropilo</b>	
<b><math>^1\text{H}</math>-RMN(<math>\text{CDCl}_3</math>) <math>\delta</math> (ppm) (multiplicidad, integración) (asignación)</b>	6,84 (s, 2H) <b>(1)</b> ; 5,14 (m, 2H) <b>(3)</b> ; 1,32 (d, 12H) <b>(4)</b>
<b><math>^{13}\text{C}</math>-RMN(<math>\text{CDCl}_3</math>) <math>\delta</math> (ppm) (asignación)</b>	134,3 <b>(1)</b> ; 164,9 <b>(2)</b> ; 69,3 <b>(3)</b> ; 22,1 <b>(4)</b>

Tabla 3.2: Asignación de señales de los espectros  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN del FIP

## 3.1 Monómeros y Agente de Transferencia de Cadena

Figura 3.2: Espectros  $^1\text{H}$ -RMN (A) y  $^{13}\text{C}$ -RMN (B) del FIP

## 3.1 Monómeros y Agente de Transferencia de Cadena

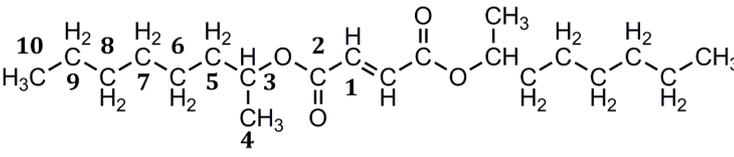
## 3.1.1.3. Fumarato de di-2-octilo

## 3.1.1.3.1 Síntesis

La reacción de síntesis del monómero fue llevada a cabo según la descripción detallada en la sección 2.2.1.3.1 y arrojó un rendimiento del 76%, valor similar al obtenido en otras reacciones de síntesis de dialquil fumaratos mediante esterificación de Fischer.<sup>31,56</sup>

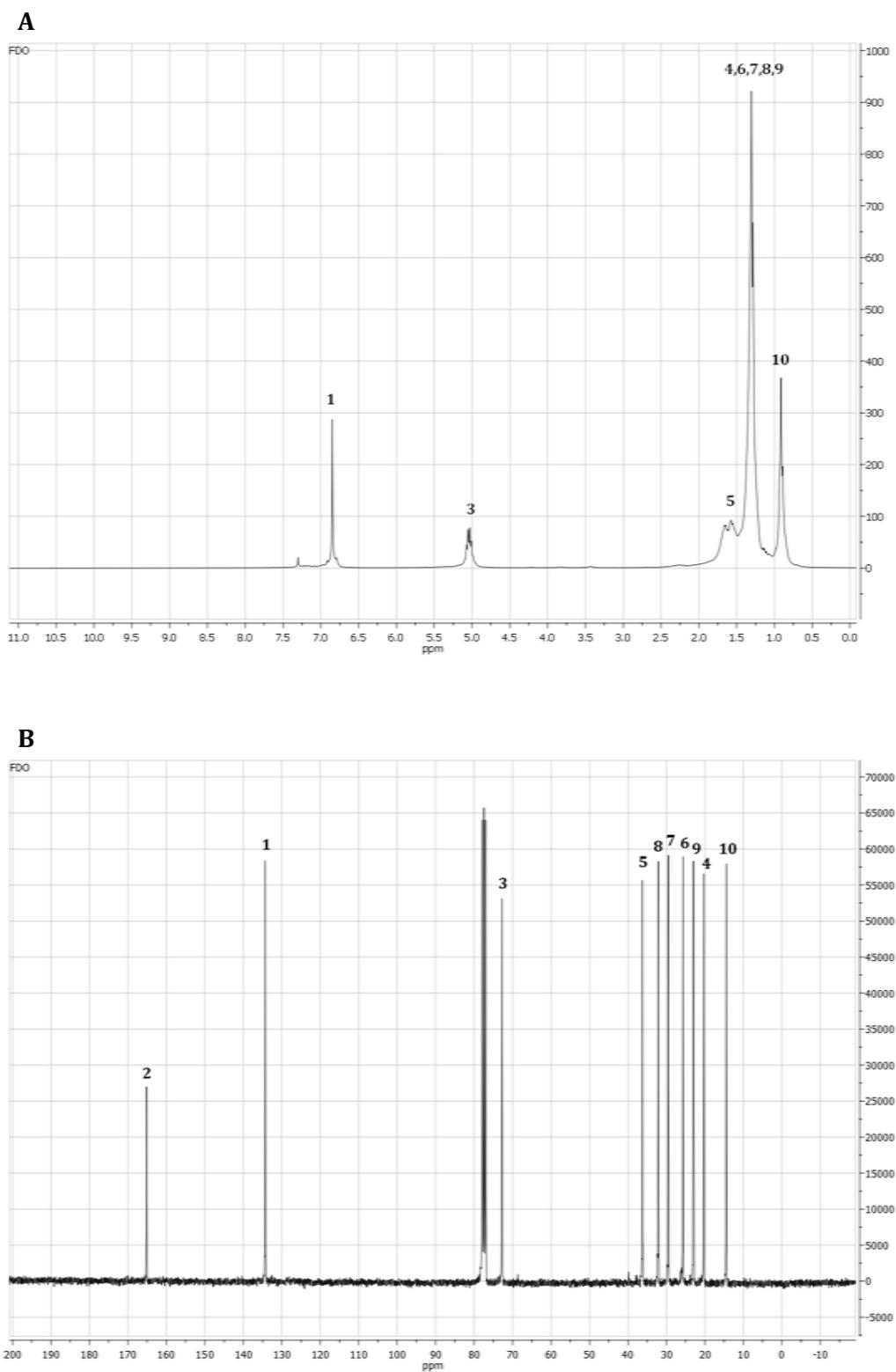
## 3.1.1.3.2 Identificación y caracterización del monómero

El producto obtenido en la síntesis fue un líquido viscoso incoloro cuya medición de índice de refracción arrojó un valor de  $n_D^{20}$ : 1,4506. El monómero fue identificado y caracterizado mediante las técnicas de  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN y FTIR; obteniéndose las señales que se indican a continuación en la Tabla 3.3. Las asignaciones correspondientes pueden observarse en los espectros  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN presentados en la Figura 3.3 (espectros A y B, respectivamente) y el espectro FTIR de la Figura 3.4.

<p><b>Estructura del Fumarato de di-2-octilo</b></p>	
<p><b><math>^1\text{H}</math>-RMN(CDCl<sub>3</sub>) <math>\delta</math> (ppm) (multiplicidad, integración) (asignación)</b></p>	<p>6,85 (s, 2H) <b>(1)</b>; 5,04 (m, 2H) <b>(3)</b>; 1,30 (m, 22H) <b>(4,6,7,8,9)</b>; 1,60 (m, 4H) <b>(5)</b>; 0,90 (t, 6H) <b>(10)</b></p>
<p><b><math>^{13}\text{C}</math>-RMN(CDCl<sub>3</sub>) <math>\delta</math> (ppm)(asignación)</b></p>	<p>134,2 <b>(1)</b>; 165,1 <b>(2)</b>; 72,7 <b>(3)</b>; 20,3 <b>(4)</b>; 36,2 <b>(5)</b>; 25,7 <b>(6)</b>; 29,5 <b>(7)</b>; 32,1 <b>(8)</b>; 22, 9 <b>(9)</b>; 14,4 <b>(10)</b></p>
<p><b>FTIR <math>\nu</math> cm<sup>-1</sup> (asignación)</b></p>	<p>1720(C=O); 1647 y 981 (RHC = CHR, trans); 1258 y 1120 (acil-O-R).</p>

**Tabla 3.3:** Asignación de señales de los espectros  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN y FTIR del FDO

## 3.1 Monómeros y Agente de Transferencia de Cadena

Figura 3.3: Espectros  $^1\text{H}$ -RMN (A) y  $^{13}\text{C}$ -RMN (B) del FDO

## 3.1 Monómeros y Agente de Transferencia de Cadena

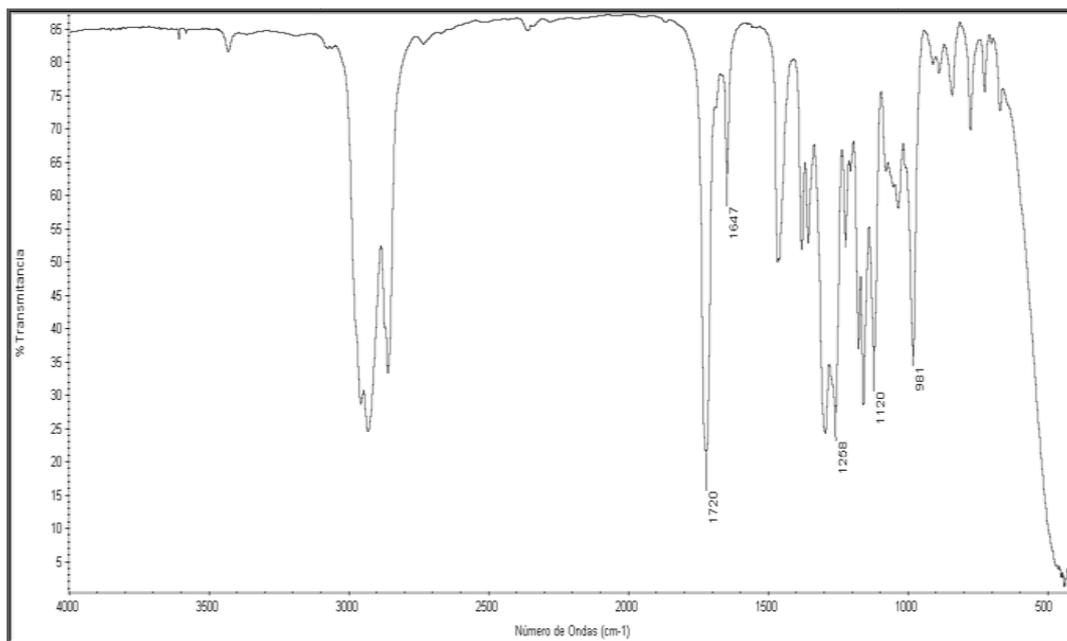


Figura 3.4: Espectro FTIR del FDO

## 3.1.2 Agente de transferencia de cadena\*

Las polimerizaciones por adición fragmentación y transferencia de cadena reversible (RAFT por las siglas en inglés para reversible addition-fragmentation chain transfer) emplean como agente de transferencia de cadena (CTA) moléculas con estructura similar a los ditiocompuestos. Diversos tipos de CTA han sido diseñados, sintetizados y evaluados considerando distintas arquitecturas y los efectos de éstas en el producto de polimerización. En literatura<sup>57,58</sup> se presentan variados ejemplos del empleo de xantatos como CTA en polimerizaciones de

---

\* Esta parte del trabajo doctoral ha sido desarrollada durante una estancia de investigación bajo la dirección de la Dra. Marta Fernández-García en el grupo de Ingeniería Macromolecular del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (ICTP) de Madrid, España, dependiente del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

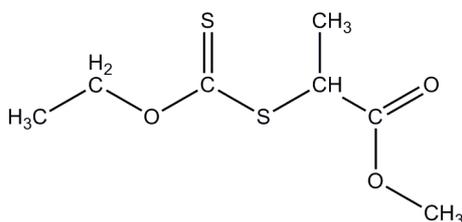
## 3.1 Monómeros y Agente de Transferencia de Cadena

monómeros vinílicos y acrílicos, particularmente en la homopolimerización del AcV.<sup>59,60</sup>

Los fumaratos son monómeros etilénicos 1,2 disustituídos y si bien se caracterizan por presentar una baja capacidad de homopolimerización,<sup>61</sup> pueden copolimerizar mediante mecanismo radicalario.<sup>62,63</sup> A partir de esta consideración, se procedió a la selección y posterior síntesis de un xantato para ser empleado como CTA en reacciones de copolimerización RAFT.

## 3.1.2.1 Síntesis del S-1-metoxicarboniletil O-etil xantato

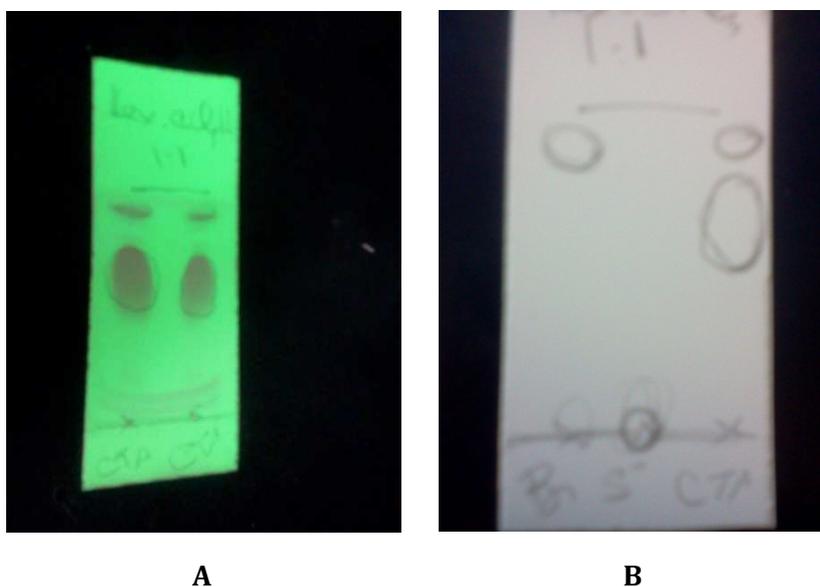
La síntesis del S-1-metoxicarboniletil O-etil xantato (estructura en Esquema 3.1.) fue realizada bajo las condiciones descritas en la sección 2.1.2.1. Finalizado el tiempo de reacción, el crudo obtenido se estudió por TLC sembrando por duplicado una muestra de éste (Figura 3.5, A), en la cual puede apreciarse la existencia de otro compuesto además del producto esperado. La elaboración de una TLC sembrando los reactivos de partida y el crudo de reacción (Figura 3.5, B) evidenció que el compuesto presente correspondía a un exceso de halogenuro sin reaccionar. Éste último fue eliminado mediante evaporador rotatorio a 20 mBa a 40 °C durante 45 min.



**Esquema 3.1:** Estructura del S-1-metoxicarboniletil O-etil xantato

## 3.1 Monómeros y Agente de Transferencia de Cadena

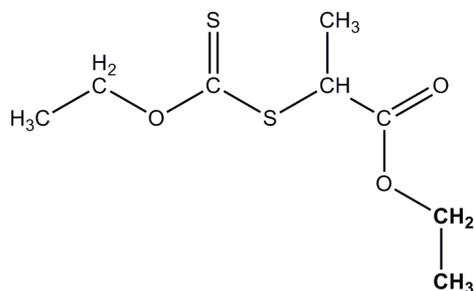
El rendimiento alcanzado en la síntesis fue del 85% y el producto obtenido fue un líquido amarillento de aspecto aceitoso. En la Figura 3.6 (espectro en rojo) se aprecian las señales del producto advirtiéndose la ausencia de las correspondientes al halogenuro, obteniéndose por lo tanto, al agente de transferencia de cadena con pureza suficiente para su empleo en reacciones de polimerización.



**Figura 3.5:** TLC del crudo de reacción en la síntesis del S-1-metoxicarboniletil O-etil xantato: A- siembra por duplicado del crudo de reacción. B- siembra de izquierda a derecha: 2-bromopropionato de metilo, O-etil xantato de potasio y crudo de reacción.

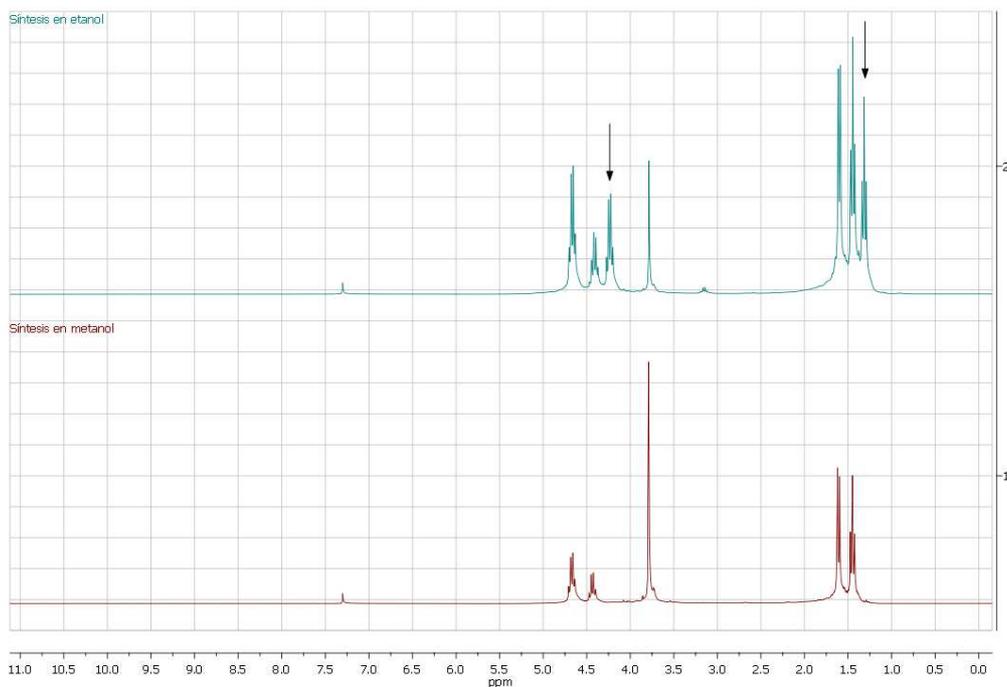
Una síntesis en condiciones alternativas a la anterior, empleando etanol como solvente, llevó a la obtención una mezcla de xantatos como puede apreciarse en la Figura 3.6. Las señales marcadas concuerdan tanto en los valores de desplazamiento químico como en la integración con la porción etoxi incorporada del S-1-etoxicarboniletil O-etil xantato (indicada en negrita en el Esquema 3.2). Esto plantea una posible reacción de transesterificación a lo largo del proceso de síntesis entre el producto y el solvente de reacción.

## 3.1 Monómeros y Agente de Transferencia de Cadena



**Esquema 3.2:** Estructura del S-1-etoxicarboniletil O-etil xantato

La Figura 3.6 presenta los espectros  $^1\text{H}$ -RMN correspondientes a los productos de síntesis del CTA empleando como solvente etanol (celeste) y metanol (rojo), indicando en el primero las señales correspondientes a la porción etoxi del S-1-etoxicarboniletil O-etil xantato.



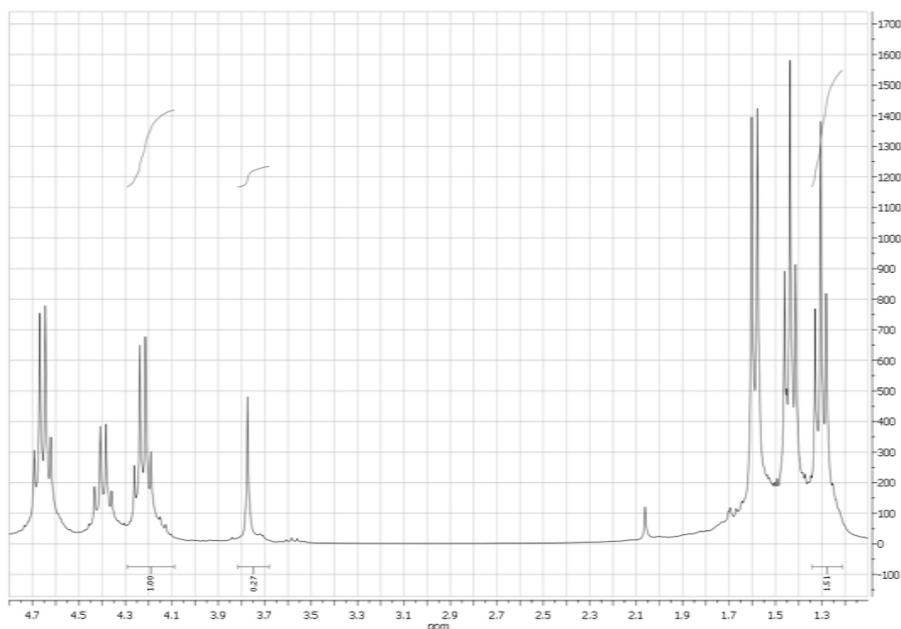
**Figura 3.6:** Espectros  $^1\text{H}$ -RMN de los productos de la síntesis del S-1-metoxicarboniletil O-etil xantato en etanol como solvente (celeste) y metanol (rojo)

## 3.1 Monómeros y Agente de Transferencia de Cadena

El estudio de la integración de las señales propias de cada compuesto permitió determinar la proporción relativa de ambos productos. Se obtuvo un valor de 1,00 y 1,51 para los H del CH<sub>2</sub> ( $\delta = 4,22$  ppm) y CH<sub>3</sub> ( $\delta = 1,30$  ppm) de la porción etoxi respectivamente, y un valor de 0,27 para los H del CH<sub>3</sub> del metoxi ( $\delta = 3,7$  ppm) perteneciente a la otra especie. El análisis de la composición de la mezcla fue realizado empleando la siguiente fórmula:

$$F_{CTA\ metoxi} = \frac{I_{CH_3\ metoxi}}{I_{CH_3\ etoxi} + I_{CH_3\ metoxi}} \quad \text{Ecuación 3.1}$$

donde  $F_{CTA\ metoxi}$  es la fracción molar del S-1-metoxicarboniletil O-etil xantato presente en la mezcla,  $I_{CH_3\ metoxi}$  corresponde a la integración del grupo metilo de la porción metoxi del éster en el xantato anterior,  $I_{CH_3\ etoxi}$  a la integración del metilo de la porción etoxi del éster en el S-1-etoxicarboniletil O-etil xantato y la suma de ambos refiere al total de moléculas de xantatos. El resultado obtenido arrojó una relación entre las especies presentes en la mezcla S-1-etoxicarboniletil O-etil xantato: S-1-metoxicarboniletil O-etil xantato de 85:15.

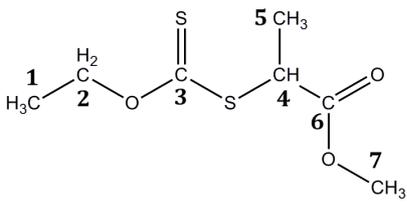


**Figura 3.7:** Espectro <sup>1</sup>H-RMN de la mezcla de CTAs

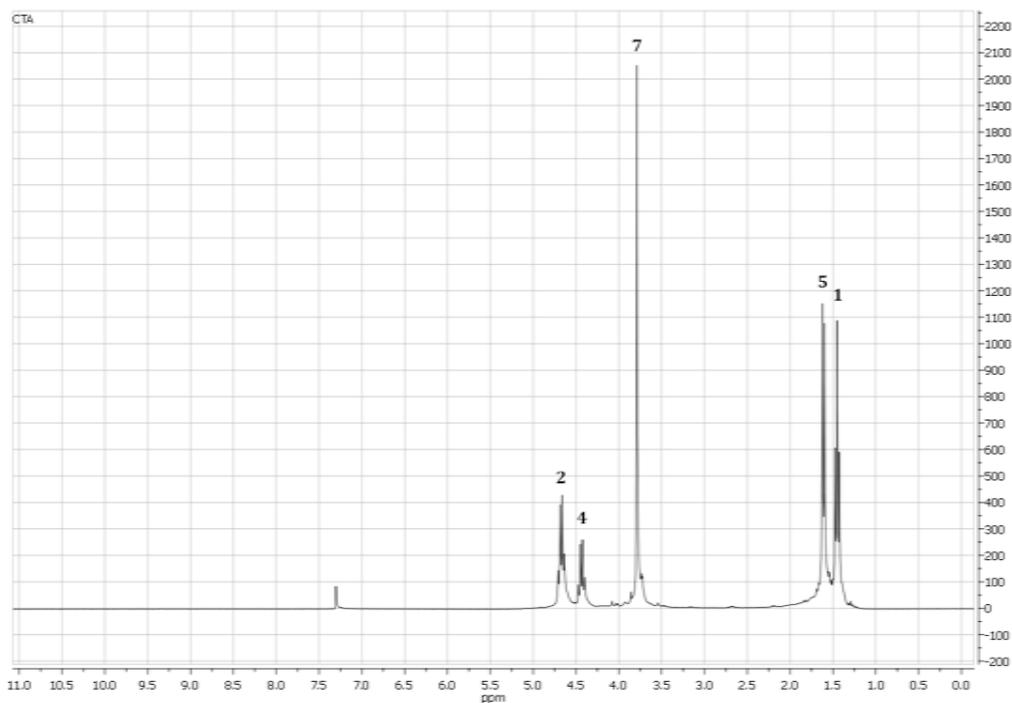
## 3.1 Monómeros y Agente de Transferencia de Cadena

## 3.1.2.2 Caracterización del S-1-metoxicarboniletil O-etil xantato

Las señales obtenidas por  $^1\text{H}$ -RMN en la identificación y control de pureza del CTA se detallan en la Tabla 3.4, mientras que el espectro del compuesto con sus respectivas asignaciones se presenta en la Figura 3.8.

<p><b>Estructura del</b> <b>S-1-metoxicarboniletil O-etil xantato</b></p>	
<p><math>^1\text{H}</math>-RMN(<math>\text{CDCl}_3</math>) <math>\delta</math> (ppm) (multiplicidad, integración) (<b>asignación</b>)</p>	<p>1,45 (t,3H) (<b>1</b>), 4,67 (c,2H) (<b>2</b>), 4,44 (c, 1H) (<b>4</b>), 1,61 (d,3H)(<b>5</b>), 3,79 (s,3H) (<b>7</b>)</p>

**Tabla 3.4:** Asignación de señales del espectro  $^1\text{H}$ -RMN del S-1-metoxicarboniletil O-etil xantato



**Figura 3.8:** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN del S-1-metoxicarboniletil O-etil xantato

## 3.2 Síntesis de copolímeros

En esta sección se presentan los resultados obtenidos para las reacciones de copolimerización radical en masa de FIP y FDO con AcV empleando energía de microondas, y las copolimerizaciones en solución para el caso del FDO con AcV de manera convencional y también controlada por polimerización por adición-fragmentación y transferencia de cadena reversible (RAFT).

### 3.2.1 Síntesis de copolímeros empleando energía de microondas

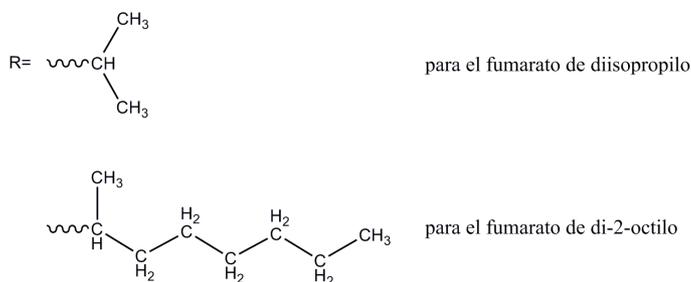
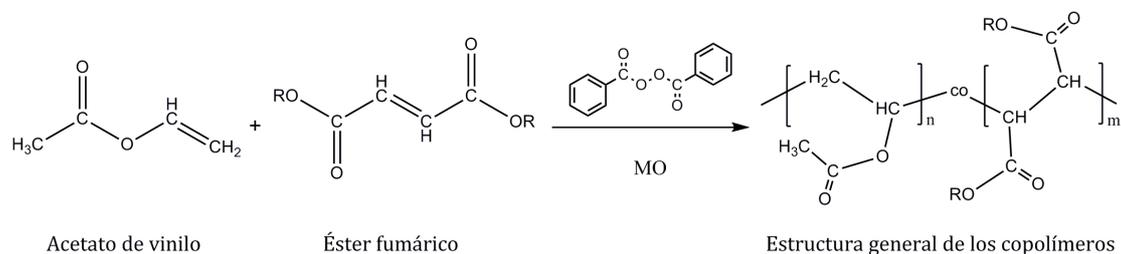
En los últimos años se han descrito en literatura diversas reacciones de homopolimerización y copolimerización radicalaria de monómeros fumáricos empleando energía de microondas como una fuente alternativa de energía para favorecer las reacciones de polimerización de estos monómeros, obteniéndose resultados satisfactorios.<sup>56,63</sup>

Las reacciones de copolimerización empleando energía de microondas presentadas en este trabajo se llevaron a cabo bajo las condiciones descritas en la sección 2.2.1.1. La técnica de polimerización en masa, es decir, en ausencia de solvente; fue seleccionada teniendo en cuenta que el aumento de temperatura producido en la reacción puede llevar al solvente a alcanzar su punto de ebullición y por lo tanto, producir explosiones y/o proyecciones del sistema.

La elección del peróxido de benzoílo como iniciador radical de las copolimerizaciones se realizó en base a los resultados obtenidos por Cortizo<sup>31</sup> a partir del estudio de la homopolimerización radical del FIP empleando energía de microondas y utilizando como iniciadores PB y AIBN. En ese estudio, se reportó un aumento significativo en el porcentaje de conversión cuando se utiliza PB, lo cual fue atribuido a la mayor eficiencia de este iniciador hacia el monómero fumárico en comparación al otro iniciador estudiado: AIBN.

En el Esquema 3.3 se presenta la reacción general de obtención y la estructura general de los copolímeros fumáricos.

## 3.2 Síntesis de Copolímeros



**Esquema 3.3:** Reacción general de copolimerización empleando energía de microondas

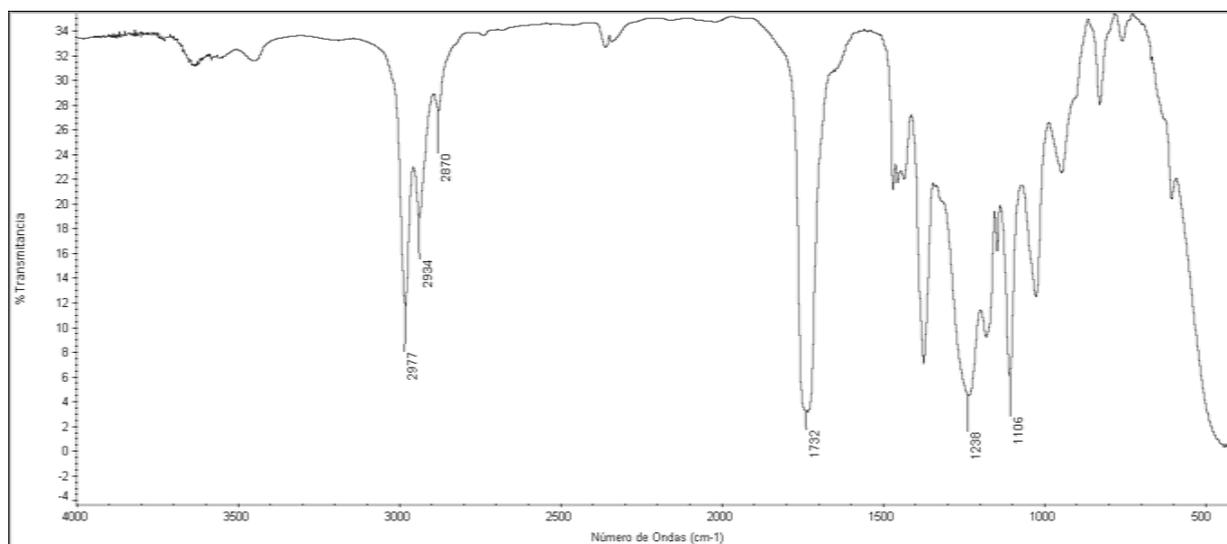
Los resultados de las síntesis se informan en las Tablas 3.5 y 3.6. Es menester mencionar que los porcentajes de conversión (%C) presentados en ellas, refieren al valor calculado gravimétricamente en base a las fracciones solubles (no gel) de los copolímeros. El motivo de la exclusión de las fracciones gel en los datos se basó en que al ser la finalidad del material la preparación de membranas mediante el método de *solvent-casting*, es necesario que ocurra la solubilización del copolímero en el solvente seleccionado para formar así una solución. Las fracciones insolubles no resultan por lo tanto, de utilidad para la aplicación deseada.

El proceso de síntesis comenzó con la obtención y caracterización de un copolímero a partir de los comonómeros AcV y FIP. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3.5:

Copolímero	AcV (%V)	FDR(%V)	PB (mM)	t (min)	% Conv	M <sub>w</sub>	M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub>
AcV-co-FIP-MO	75	25	40	15	58	287000	1,9

**Tabla 3.5:** Resultados de la copolimerización del AcV con FIP a 140 watts de potencia

En la Figura 3.9 se muestra el espectro FTIR del AcV-co-FIP, observándose las bandas correspondientes al enlace C-H alifático en 2977, 2934 y 2870  $\text{cm}^{-1}$ , la señal del grupo carbonilo (C=O) en 1732  $\text{cm}^{-1}$  y, en 1238 y 1106  $\text{cm}^{-1}$ , las bandas del grupo acilo (RO-C=O).

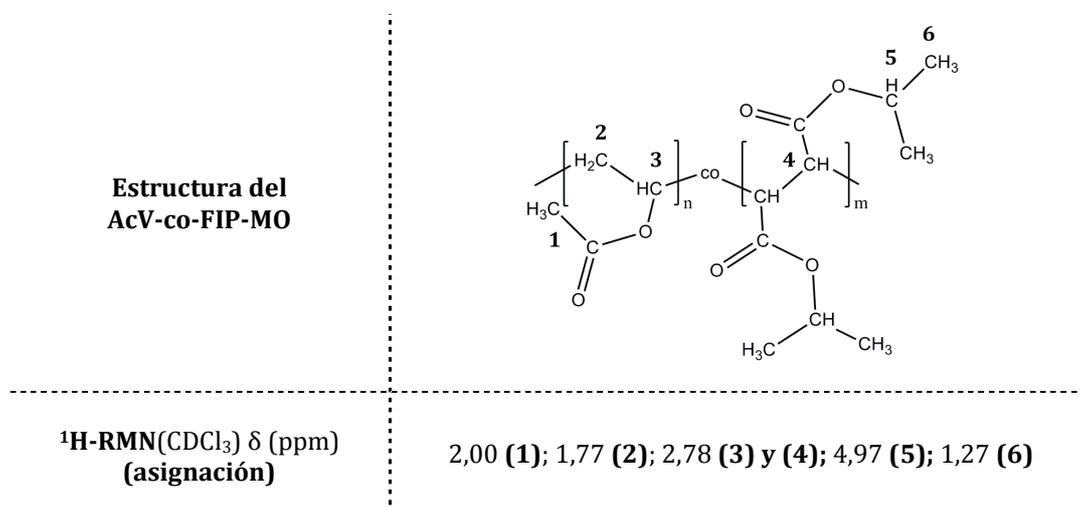


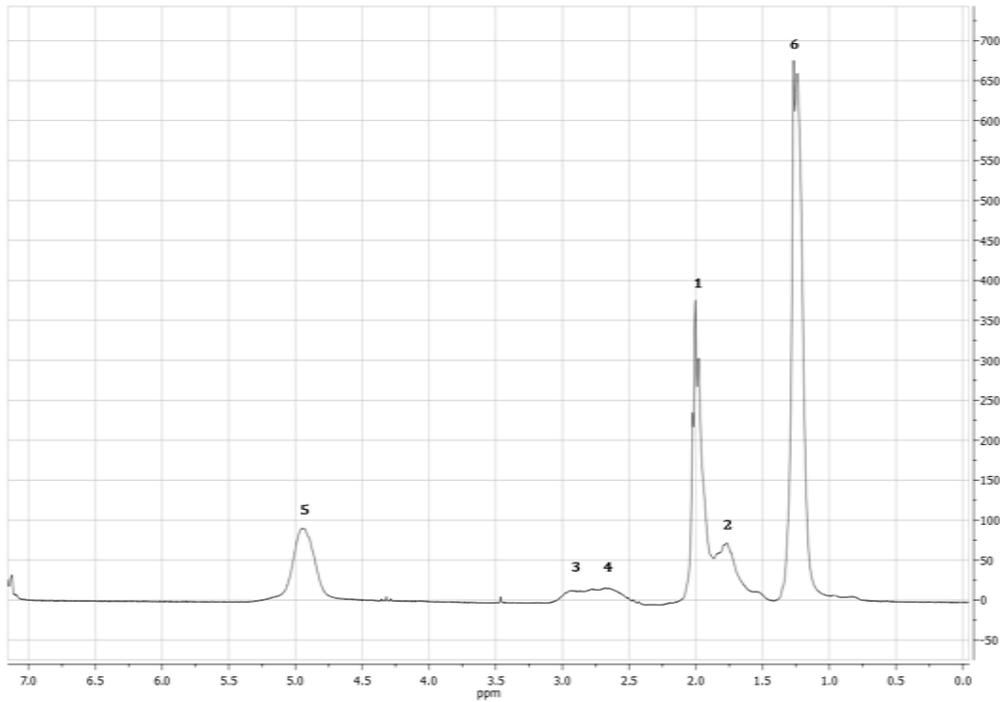
**Figura 3.9:** Espectro FTIR del AcV-co-FIP-MO

La composición de dicho copolímero se calculó empleando  $^1\text{H-RMN}$  a partir de la fórmula explicitada a continuación:

$$F_{FIP} = \frac{\frac{I_6}{12}}{\frac{I_6}{12} + \frac{I_{1,2}}{5}} \quad \text{Ecuación 3.2}$$

Donde  $F_{FIP}$  es la fracción molar del FIP en el copolímero,  $I_{1,2}$  es la integración de las señales de los hidrógenos metilénicos y metílicos de la unidad repetitiva del AcV ( $1,4 \text{ ppm} < \delta < 2,1 \text{ ppm}$ ), mientras que  $I_6$  corresponde a la integración de los H metílicos de la unidad repetitiva FIP ( $\delta = 1,27 \text{ ppm}$ ). En este caso la fracción molar de FIP fue de 0,40.





**Figura 3.10:** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN y asignaciones para el AcV-co-FIP-MO

Sin embargo, se advirtió que las películas preparadas a partir de este material presentaban una alta fragilidad (resultados en la sección 3.3.2 de este trabajo). Este hecho motivó la realización de un cambio en la estrategia sintética del copolímero a través del agregado de otro comonómero y/o reemplazo del FIP con el objetivo de generar un material con propiedades adecuadas en relación al objetivo del trabajo. Para ello, se consideró la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) del copolímero como un indicador para el diseño de una alternativa, teniendo en cuenta que este parámetro afecta directamente las propiedades finales del material. En el caso del AcV-co-FIP-MO, la  $T_g$  observada fue de  $39,3\text{ }^\circ\text{C}$ , valor que es superior al observado para la mayoría de los copolímeros empleados como adhesivos sensibles a la presión en sistemas transdérmicos cuyas  $T_g$  se caracterizan por ser valores bajos e incluso, en ciertos casos, negativos.<sup>64</sup> Los intentos de copolimerización del FIP y AcV con ácido acrílico y ácido fumárico (monómeros con grupos carboxílicos) también arrojaron materiales de alta fragilidad al aportar

estos monómeros rigidez como consecuencia de las interacciones entre los grupos carboxílicos de las cadenas de polímero, las cuales limitan la movilidad de éstas produciendo un aumento en el valor de la Tg.

Es sabido que el valor de la Tg en la estructura polimérica depende de las características del polímero: simetría estructural, flexibilidad de la cadena principal, ramificaciones, interacciones entre cadenas de polímero y tamaño de los grupos pendientes.<sup>65</sup> Ésta última característica fue la seleccionada para proponer la síntesis de un nuevo monómero considerando que el aumento en el tamaño de los grupos pendientes de un polímero conlleva a un aumento en el volumen libre, efecto que provoca una disminución en la Tg.

Otsu y colaboradores<sup>66</sup> en su trabajo sobre homopolimerización de fumaratos con distintas estructuras, encontraron que para el caso del fumarato de 2-etilhexilo su homopolímero presentaba una Tg de -6 °C. Las cadenas con un total de 8 átomos de carbono a cada lado de la estructura del monómero son las responsables de la notable reducción de la temperatura de transición vítrea en relación a otros fumaratos previamente sintetizados, los cuales presentaron - a excepción de los fumaratos de dipropilo y de dibutilo cuyas Tg son 19 °C y 8 °C respectivamente- valores de Tg superiores a la ambiente. Considerando esto, se decidió realizar la síntesis del fumarato de di-2-octilo cuyos resultados fueron descritos previamente en la sección 3.1.1.3.

A partir de dicho monómero y AcV se procedió a la realización de distintas reacciones de copolimerización con el objetivo de lograr la optimización de las condiciones de síntesis y obtener el material más adecuado para el uso proyectado.

Los resultados de las copolimerizaciones se presentan a continuación en la Tabla 3.6:

Copolímero	AcV (%V)	FDR(%V)	PB (mM)	t (min)	% Conv	M <sub>w</sub>	M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub>
AcV-co-FDO-MO-1	75	25	40	10	17	2,1 · 10 <sup>6</sup>	11
AcV-co-FDO-MO-2	75	25	40	5	21	1,4 · 10 <sup>6</sup>	6,4
AcV-co-FDO-MO-3	75	25	60	4	26	629000	7,0

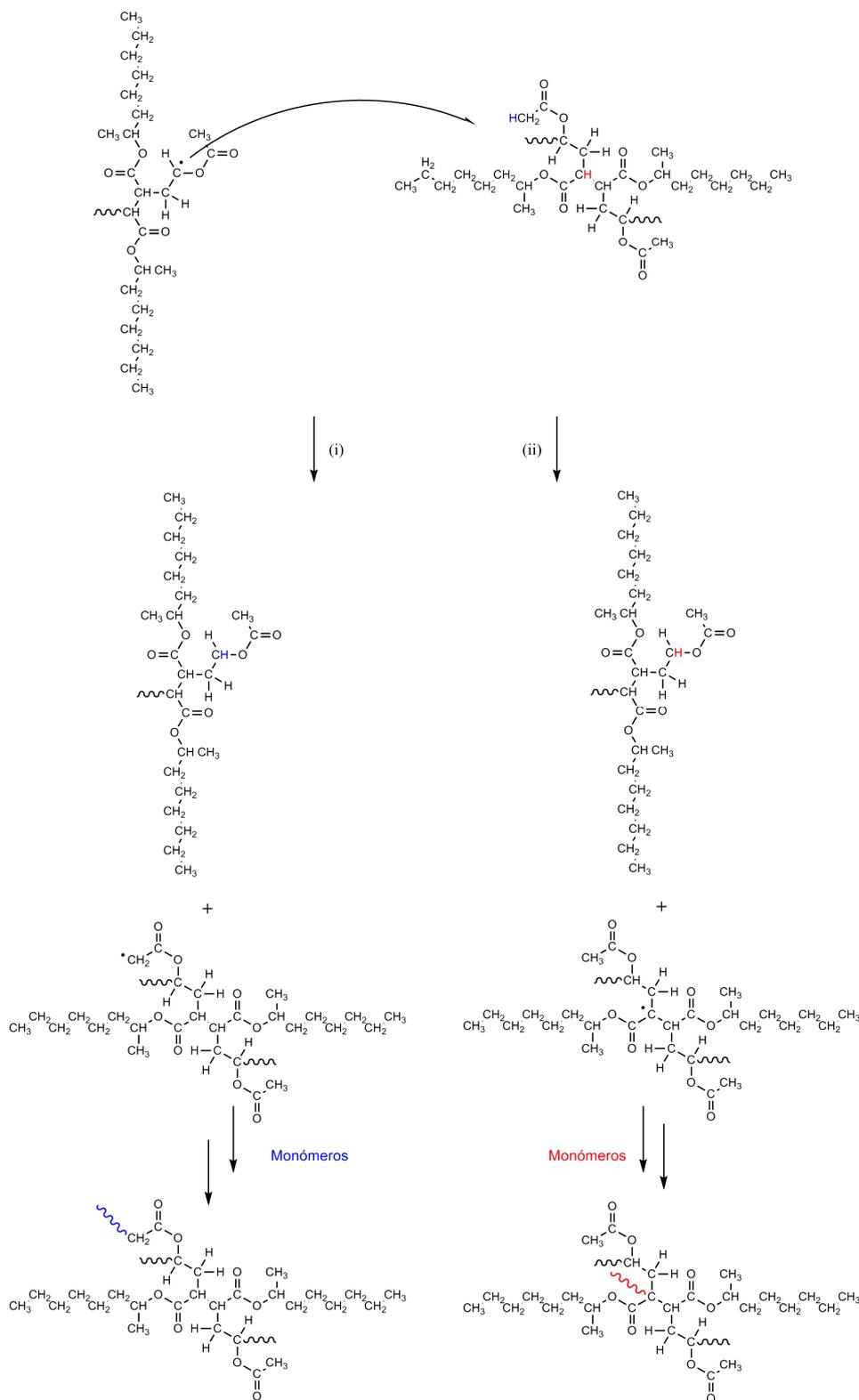
**Tabla 3.6:** Resultados de las copolimerizaciones del AcV con FDO a 140 watts de potencia

La lectura de las Tablas 3.5 y 3.6 arroja diferencias significativas en relación a los copolímeros obtenidos de acuerdo a la estructura del fumarato empleado. En todas las copolimerizaciones empleando FDO se observó la formación de dos fracciones: una soluble y otra insoluble en hexano (solvente termodinámicamente bueno para el copolímero). El porcentaje de conversión indicado en la Tabla 3.6 corresponde a la fracción soluble; la fracción insoluble fue separada y descartada por los motivos anteriormente expuestos. El copolímero AcV-co-FDO-MO-1, si bien fue obtenido bajo similares condiciones de reacción que AcV-co-FIP-MO, presentó una menor conversión, un M<sub>w</sub> significativamente superior (un orden de magnitud), un mayor índice de polidispersidad (M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub>) y la formación de una importante cantidad de fracción gel (porcentaje no informado). La disminución del tiempo de reacción a la mitad condujo a la obtención de AcVcoFDO-MO-2 con una conversión levemente superior (en fracción soluble), un M<sub>w</sub> menor y una notable reducción del M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub>, si bien también produjo cierta cantidad de fracción insoluble (menor que la anterior).

Estas características particulares de los copolímeros de la familia AcV-co-FDO-MO en comparación al AcV-co-FIP-MO -altos pesos moleculares y polidispersidades, producción de fracción gel y por ende baja formación de fracción soluble- sugieren que el mecanismo predominante de terminación del crecimiento de cadena para los copolímeros AcV-co-FDO-MO, es el de transferencia

de cadena al polímero. La formación de fracción insoluble puede ser explicada como consecuencia de reacciones de transferencia de cadena desde un macroradical en crecimiento hacia una cadena de copolímero mediante la abstracción de hidrógenos de carbonos terciarios de la cadena principal e hidrógenos de carbonos pertenecientes a las cadenas alquílicas. F. Heatley y colaboradores<sup>67</sup> demostraron mediante empleo de RMN que en la polimerización del 2-etilhexilacrilato las ramificaciones producidas en el polímero resultante correspondían a abstracciones de hidrógenos de carbonos terciarios de la cadena principal. Por su parte Britton y colaboradores<sup>68</sup> estudiaron la polimerización del acetato de vinilo y encontraron evidencia mediante <sup>13</sup>C-RMN de reacciones de transferencia de cadena al polímero vía abstracción de hidrógenos de carbonos terciarios y de grupos metilos laterales (del polímero y monómero), siendo en este caso mayor la contribución de éstos últimos.

Por lo tanto, en base a los resultados previamente mencionados, puede considerarse que la producción de fracción insoluble en los copolímeros AcV-co-FDO-MO podría explicarse a través de la formación de ramificaciones como consecuencia de reacciones de transferencia de cadena que darían lugar a estructuras entrecruzadas (fracción gel), generando paralelamente a una fracción soluble con un alto peso molecular. En el Esquema 3.4 se muestran las reacciones de transferencias de cadena propuestas para el copolímero AcV-co-FDO, las cuales corresponden al ataque del macroradical en crecimiento sobre un átomo de hidrógeno de un carbono terciario de la cadena principal (i) o del grupo metílico del monómero AcV (ii). Como resultado, en ambos casos se obtiene una nueva especie radical que por posterior adición de monómero originará una estructura ramificada, la cual podría dar lugar a una especie entrecruzada según las condiciones de reacción. Por último, el aumento de la cantidad de iniciador provoca en el AcV-co-FDO-MO-3 un descenso en el  $M_w$ , un pequeño aumento de la polidispersidad y un incremento de la conversión en un 5%, todas consecuencias coherentes en relación al cambio realizado.



**Esquema 3.4:** Esquema de las transferencias de cadena al polímero vía abstracción de hidrógenos de carbonos terciarios (i) y de grupos metílicos del AcV (ii)

Como el objetivo del presente trabajo es la obtención de un copolímero para ser empleado como matriz en un sistema de liberación transdérmico, fue necesario lograr la optimización de la ruta sintética orientada a la producción de un material cuya fracción soluble sea relativamente alta, además de tener un peso molecular adecuado a fin de minimizar efectos de viscosidad en la solución que se desea “castear”. Esto último lleva a la selección, en la familia de los copolímeros derivados de FDO, del AcV-co-FDO-MO-3 como material de partida en el desarrollo de las películas. El porcentaje de conversión alcanzado en la síntesis del AcV-co-FIP-MO (%C=58) permitió la obtención de cantidad suficiente de copolímero para la elaboración de membranas y la evaluación de sus propiedades. Sin embargo, la conversión correspondiente a la fracción soluble del AcV-co-FDO-MO-3 necesaria para la elaboración de las películas resultó notablemente baja (menos del 30%). Este hecho motivó la búsqueda de una forma de obtención de mayor masa de copolímero manteniendo las condiciones de reacción. A priori, el escalado de la reacción parecería ser la forma más natural para la síntesis de una mayor cantidad de producto, pero el inconveniente se halla en que el escalado en las reacciones que emplean energía de microondas resulta bastante complejo si se pretenden mantener las mismas condiciones de reacción.<sup>69</sup>

Como alternativa -y con el fin de mantener una rigurosidad en las condiciones experimentales- se procedió a la realización de distintas síntesis en las mismas condiciones del AcV-co-FDO-MO-3, el aislamiento de cada una de ellas y una posterior purificación conjunta, caracterizándose el material final obtenido por SEC (pesos moleculares y distribución de pesos), <sup>1</sup>H-RMN (composición) y DSC (determinación de Tg). Un inconveniente surgido de esta elección de trabajo radicó en el hecho de que los equipos de microondas domésticos se caracterizan por no presentar un control estricto en las condiciones de reacción lo cual implica una reproducibilidad incierta.<sup>69,70</sup> Con la finalidad de evaluar el grado de reproducibilidad del método, y por ende valorar si es aceptable proceder a la reunión de los productos de distintas síntesis, se llevaron a cabo repeticiones de la copolimerización para la obtención de AcV-co-FDO-MO-3 y se analizaron las características de cada polímero, además de realizar una evaluación estadística de

la dispersión de pesos moleculares e índices de polidispersidad entre las fracciones. A continuación en la Tabla 3.7 se muestran los resultados obtenidos:

Copolímero	AcV (%V)	Fum(%V)	% Conv	M <sub>w</sub>	M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub>
AcV-co-FDO-MO-3.1	75	25	26	629000	7,0
AcV-co-FDO-MO-3.2	75	25	20	565900	8,7
AcV-co-FDO-MO-3.3	75	25	24	427670	6,3
AcV-c-o-FDO-MO-3.4	75	25	19	528000	6,7

**Tabla 3.7:** Resultados para las distintas síntesis del AcV-co-FDO-MO-3

Un análisis estadístico de las fracciones arroja los siguientes valores expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar:

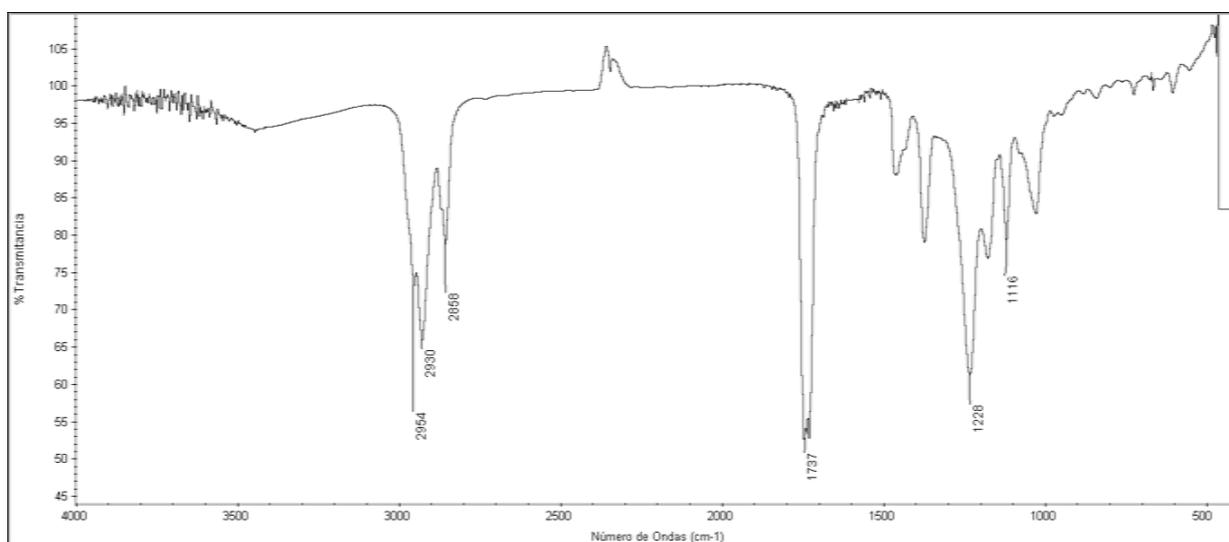
$$M_w = 537642 \pm 84324 \quad M_w/M_n = 7,2 \pm 1,1$$

Estos valores corresponden a una variación, en las repeticiones de la copolimerización, del 15,7% en el peso molecular promedio en número ( $M_w$ ) y de 15,3% en el índice de polidispersidad ( $M_w/M_n$ ). Considerando que las síntesis anteriores se efectuaron en un microondas doméstico, una variación de alrededor del 16% en el peso molecular y de 15% en su distribución podría considerarse que el método consta de reproducibilidad suficiente para la obtención de fracciones con similares características. Una vez que las fracciones fueron colectadas, se purificaron por disolución/ precipitación.

El  $M_w$  y  $M_w/M_n$  determinados por SEC resultaron numéricamente diferentes a los estadísticos presentados anteriormente; esto sucede como consecuencia de la

purificación realizada en la cual siempre ocurre la pérdida de determinadas fracciones de pesos moleculares bajos.

La pureza de los copolímeros obtenidos se controló mediante la ausencia de señales de monómeros en la detección UV-vis e IR durante la medida de los pesos moleculares por SEC, teniendo en cuenta que los monómeros fumáricos presentan absorción en las longitudes de onda de los detectores mencionados, debido a su estructura conjugada (detector UV-vis) y su grupo carbonilo (detector IR). Adicionalmente, la ausencia de monómeros se confirmó por FTIR verificando la ausencia de las bandas en  $1647\text{ cm}^{-1}$  correspondientes al estiramiento  $\text{C}=\text{C}$  presente en los monómeros empleados. En la Figura 3.11 se muestra el espectro FTIR perteneciente al copolímero AcV-co-FDO-MO, en el cual se observan las señales a  $2954$ ,  $2930$  y  $2858\text{ cm}^{-1}$  para la unión  $\text{C-H}$  alifático,  $1737\text{ cm}^{-1}$  para la señal característica del  $\text{C}=\text{O}$ , y a  $1228$  y  $1116\text{ cm}^{-1}$  para el grupo  $\text{RO-C}=\text{O}$ .

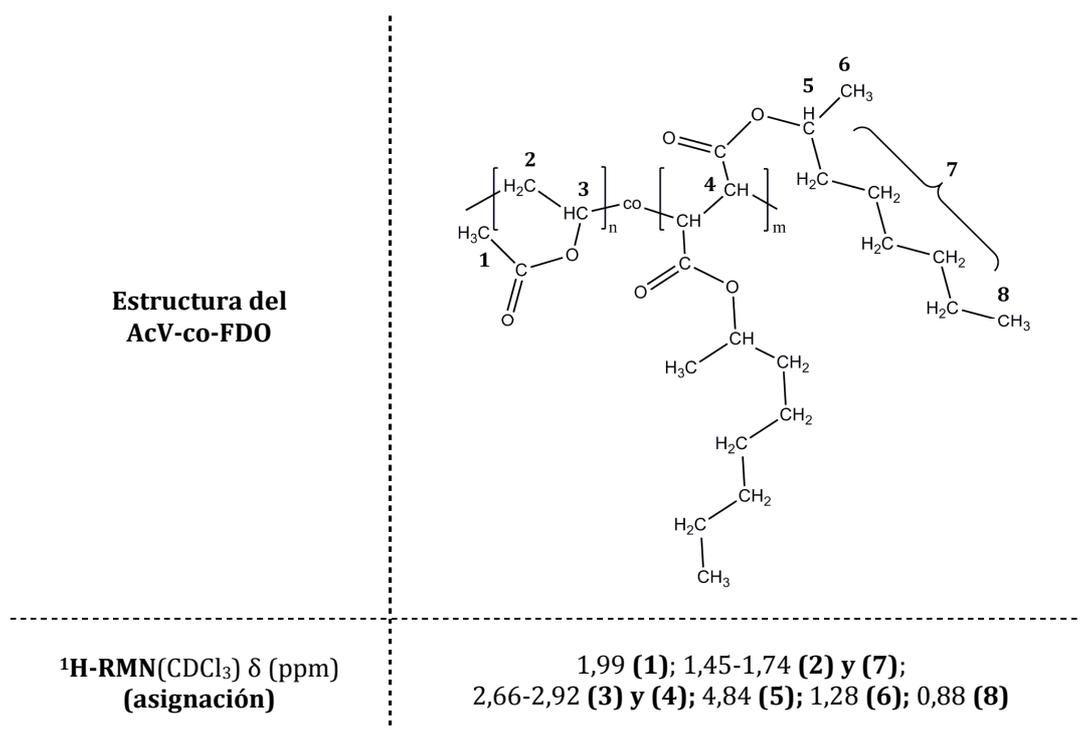


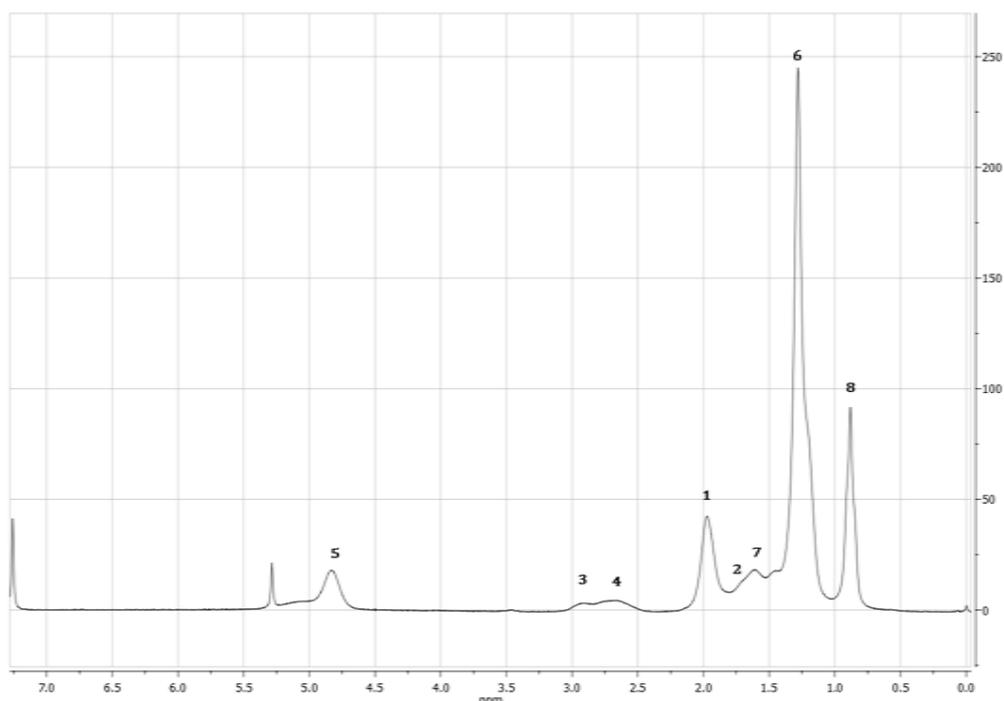
**Figura 3.11:** Espectro FTIR AcV-co-FDO-MO

La fracción molar de comonómeros en el copolímero se calculó mediante  $^1\text{H}$ -RMN a partir de ecuación expuesta a continuación.

$$F_{FDO} = \frac{I_8}{\frac{I_8}{2} + I_1} \quad \text{Ecuación 3.3}$$

donde,  $F_{FDO}$  representa la fracción molar de FDO en el copolímero,  $I_1$  e  $I_8$  corresponden a las integraciones de los desplazamientos de los hidrógenos identificados con la misma numeración que se observa en la Figura 3.12, la cual presenta el espectro  $^1\text{H}$ -RMN del AcV-co-FDO con sus respectivas asignaciones.





**Figura 3.12:** Espectro general de  $^1\text{H}$ -RMN y asignaciones para el AcV-co-FDO-MO

### 3.2.2 Síntesis de copolímeros en solución. Polimerización por adición-fragmentación y transferencia de cadena reversible (RAFT)\*

Las reacciones de polimerización por adición-fragmentación y transferencia de cadena reversible (RAFT) han sido empleadas cada vez más en los últimos tiempos en la síntesis de homopolímeros y copolímeros de arquitecturas definidas, en particular la de copolímeros en bloque. Sin embargo, la utilidad de la técnica no sólo se limita a los casos anteriormente mencionados sino que puede emplearse además en la síntesis de copolímeros estadísticos con el objetivo de obtener materiales con un bajo índice de polidispersidad.<sup>71</sup>

En esta sección se desarrolla el estudio de la copolimerización previamente realizada con energía de microondas entre AcV y FDO mediante la técnica de RAFT en solución, empleando un CTA del tipo xantato; resultando novedosa la aplicación de ésta técnica de copolimerización controlada para monómeros fumáricos. Vale remarcar que se han llevado a cabo diversos intentos de homopolimerización RAFT de FIP y de FDO empleando las condiciones mencionadas en la sección 2.2.2.1 sin éxito hasta el momento.

La elección de las condiciones de reacciones fue determinada por las características tanto de las especies químicas intervinientes como de la técnica de copolimerización empleada. La técnica de copolimerización en solución fue seleccionada en base a los resultados obtenidos en las anteriores copolimerizaciones en masa (sección 3.3.1) del FDO. En ellas, los productos presentaban una alta polidispersidad debida a reacciones de transferencia de cadena (Tabla 3.5 y Esquema 3.4), las cuales pueden reducirse disminuyendo la viscosidad del medio de reacción realizando las copolimerizaciones en solución.

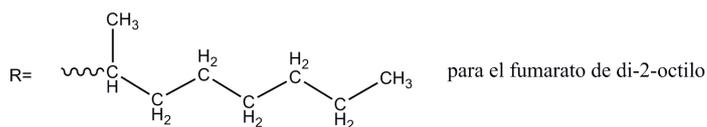
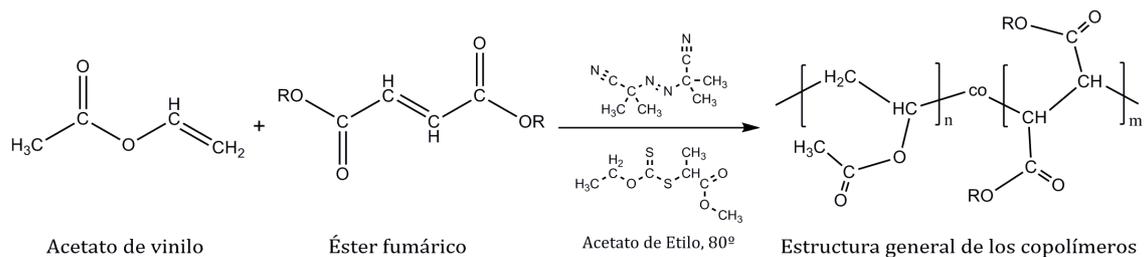
---

\* Esta parte del trabajo doctoral ha sido desarrollada durante una estancia de investigación bajo la dirección de la Dra. Marta Fernández-García en el grupo de Ingeniería Macromolecular del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (ICTP) de Madrid, España, dependiente del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

## 3.2 Síntesis de Copolímeros

Queda como trabajo a futuro evaluar la eficacia del CTA en reacciones en masa empleando energía de microondas.

A continuación se presenta la reacción general de las reacciones de copolimerización RAFT:



**Esquema 3.5:** Reacción general de copolimerización RAFT

Las reacciones de polimerización en solución presentan, sin embargo, un inconveniente que es la posibilidad de reacciones de transferencia de cadena al solvente. Para controlar este factor se analizaron los datos disponibles en literatura de las constantes de transferencia de cadena ( $C_s$ ) para la polimerización de AcV (no hay datos para el FDO) en distintos solventes, con el fin de seleccionar el más adecuado (Tabla 3.8). El análisis de dichos valores advierte que el acetato de etilo y el benceno presentan los menores valores de  $C_s$ . Se seleccionó el primero como solvente de reacción por ser un “buen” solvente tanto para el monómero como para el polímero y presentar, a su vez, baja toxicidad.

Solvente	$C_s \times 10^4$
	AcV
benceno	1,07-20
tolueno	17,8-69,0
acetona	1,5-12,0
cloroformo	125,18-170
acetato de etilo	1,07-3,4
metanol	2,26-6,0

**Tabla 3.8:** Constantes de transferencia (60 °C) para el AcV en distintos solventes

**Nota** Fuente: Valores extraídos de Young, L. Y. Capítulo II: Polymerization and depolymerization. En *Polymer Handbook*, 2<sup>da</sup> ed., Brandrup, J.; Immergut, E. H., Eds.; John Wiley : New York, N.Y., 1975, pp 67-92.

Por otro lado, en relación al iniciador radical, en el esquema de la reacción general de polimerización controlada (Esquema 3.5) puede observarse que se empleó AIBN mientras que en las copolimerizaciones empleando energía de microondas se utilizó PB. Este cambio en el iniciador se basó en el hecho de que existen trabajos científicos los cuales demostraron que el empleo de ciertos peróxidos puede derivar en una oxidación del xantato empleado como CTA: Marrière y colaboradores<sup>72</sup> indicaron para una variedad de xantatos la formación de sulfinas como productos de oxidación utilizando el ácido m-cloroperbenzoico como agente oxidante en diclorometano como solvente de reacción a 0 °C en un período de tiempo comprendido entre 5-15 min. A temperatura ambiente (4 semanas), las sulfinas anteriormente producidas dieron origen a dos tipos de compuestos: tiocarbonatos y ditioperoxycarbonatos. Esto conllevó a que en este trabajo la selección del iniciador para las copolimerizaciones RAFT haya resultado un azocompuesto, si bien existen ejemplos en literatura<sup>73,74</sup> de polimerizaciones RAFT utilizando peróxidos en iniciaciones redox y empleando xantatos como CTA.

Las reacciones de polimerización por adición-fragmentación y transferencia de cadena reversible se caracterizan por producir el crecimiento simultáneo de las cadenas de polímero, generando así una baja polidispersidad. El mecanismo de estas reacciones está mediado por un agente de transferencia de cadena (CTA), el cual corresponde a un compuesto ditiocarbónico, ya que es esta estructura la capaz de generar los intermediarios radicales responsables del crecimiento controlado de las cadenas.<sup>75</sup> El mecanismo propuesto,<sup>76</sup> consta de cuatro etapas y se muestra en el Esquema 3.6:

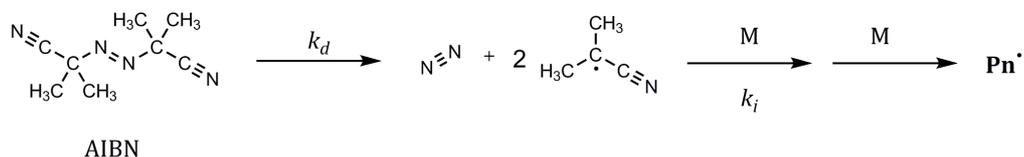
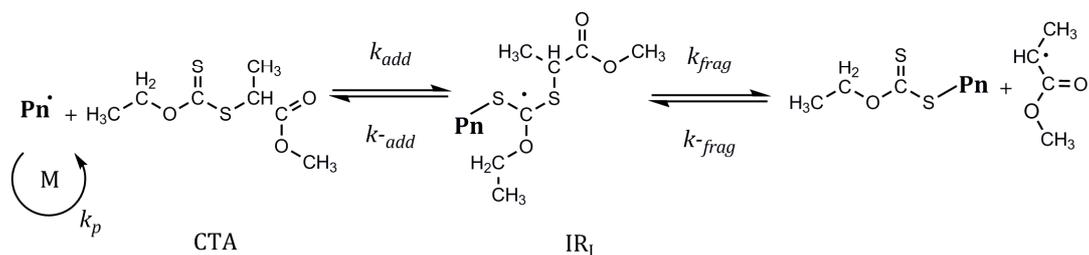
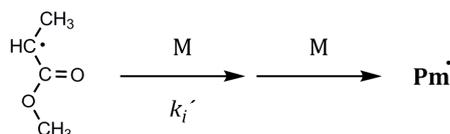
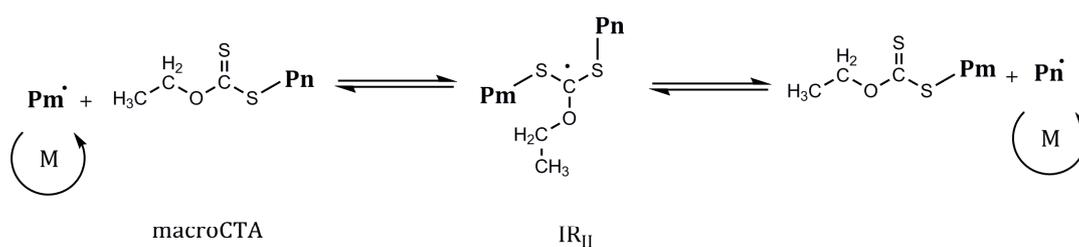
a) Iniciación: corresponde a la descomposición térmica del iniciador (AIBN en este caso), la cual provoca la generación de radicales que adicionan moléculas de monómero dando origen a especies radicales que a continuación reaccionarán con el CTA.

b) Transferencia de cadena: Las especies activas generadas en la primera etapa se adicionan al CTA para dar origen a un intermediario radical ( $IR_I$ ) que sufrirá una fragmentación generando un radical y manteniendo en su estructura una cadena latente de polímero.

c) Re-iniciación: El radical anteriormente generado, adiciona moléculas de monómeros dando origen a una nueva cadena de polímero.

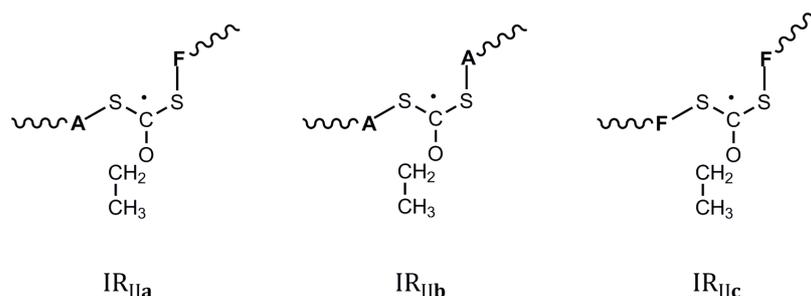
d) Equilibrio entre cadenas de polímero activas y latentes: Las cadenas activas de polímero se adicionan nuevamente al ahora macroCTA para producir un nuevo intermediario radical ( $IR_{II}$ ), el cual sufre nuevamente una fragmentación para liberar las cadenas de polímero adicionadas a su estructura.

De esta forma, las cadenas poliméricas oscilan en un equilibrio constante entre un estado latente y uno activo en el cual pueden continuar adicionando monómero.<sup>75</sup>

**Iniciación****Transferencia de cadena****Re-iniciación****Equilibrio entre cadenas de polímero activas y latentes****Terminación****Esquema 3.6:** Mecanismo propuesto para la reacción de polimerización RAFT

**Nota** Fuente: Gráfico adaptado de Moad, G.; Chiefari, J.; Chong, (Bill) Y.K.; Krstina, J.; Mayadunne, R.; Postma, A.; Rizzardo, E.; Thang, S. Living free radical polymerization with reversible addition-fragmentation chain transfer (the life of RAFT). *Polym. Int.* **2000**, 49(9), 993-1001.

En el caso particular de una copolimerización RAFT estadística, se pueden generar tres tipos de intermediario radical II ( $IR_{II}$ ) considerando si la última unidad del polímero a la cual está unida el macroCTA corresponde a uno de los comonómeros o al otro (Esquema 3.7):<sup>75</sup>



**Esquema 3.7:** Tipos de intermediario radical II de la copolimerización RAFT de dos monómeros **Nota** Fuente: Gráfico adaptado de Favier, A.; Charreyre, M.-T. Experimental Requirements for an Efficient Control of Free-Radical Polymerizations via the Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT) *Process. Macromol. Rapid Commun.* **2006**, 27(9), 653–692.

e) Terminación: Las cadenas de polímero activas, reaccionan entre ellas para dar lugar a cadenas de polímero muertas. En este tipo de copolimerización las reacciones de terminación están disminuidas en favor de la propagación, al ser baja la cantidad de iniciador empleado.<sup>75</sup>

En la Tabla 3.9 se muestran los resultados de las copolimerizaciones RAFT del AcV con FDO:

Copolímero	$f_{AcV}$	$f_{FDR}$	M:CTA:Inic	Tiempo	%Conv	$M_n$	$I_p$	$F_{FDR}$
AcV-co-FDO-Ra	75	25	100:0:0.5	24 hs	93	20539	1,75	0,30
AcV-co-FDO-Rb	75	25	100:1:0.5	24 hs	55	11083	1,42	0,38
AcV-co-FDO-Rc	50	50	100:0:0.5	24hs	41	11998	1,78	0,39
AcV-co-FDO-Rd	50	50	100:1:0.5	24hs	47	9609	1,49	0,34

**Tabla 3.9:** Resultados de las copolimerizaciones RAFT del AcV con FDO

Los porcentajes de conversión fueron calculados gravimétricamente y la fracción molar del fumarato presente en el copolímero se evaluó a partir de la Ecuación 3.2.2. En la anterior tabla puede observarse que la técnica empleada fue satisfactoria para el control de la polidispersidad en los copolímeros sintetizados, advirtiéndose una disminución de aproximadamente 0,3 en los índices de polidispersidad de AcV-co-FDO-Rb y AcV-co-FDO-Rd respecto de sus copolimerizaciones convencionales en idénticas condiciones (AcV-co-FDO-Ra y AcV-co-FDO-Rc respectivamente).

Por su parte, las copolimerizaciones convencionales arrojaron menores valores de polidispersidad que las realizadas empleando energía de microondas, lo cual es esperable en relación a la técnica de polimerización en solución empleada: al ser un medio diluído (aprox. 5 gr. de monómero en 25 ml. de solvente), las reacciones de transferencia al polímero que predominaban en las polimerización en masa pueden suponerse disminuidas por efecto de la dilución.

Respecto de los pesos moleculares, es remarcable que para ambas composiciones los pesos moleculares obtenidos en las polimerizaciones en ausencia del CTA son superiores a los obtenidos utilizando el agente de transferencia de cadena. Esta característica es propia de esta técnica de polimerización controlada y ha sido reportada por otros autores<sup>77, 78</sup>. La obtención de bajos pesos moleculares, si bien puede afectar las propiedades del material en vistas de la aplicación esperada, prueban la utilidad del xantato sintetizado (S-1-metoxicarboniletil O-etil xantato) como agente CTA eficiente para la copolimerización controlada del FDO con AcV.

## 3.3 Elaboración de membranas

### 3.3.1 Películas de copolímero

El objetivo de esta parte del trabajo radicó en la elaboración de una membrana para el desarrollo de un parche transdérmico con un diseño basado en un sistema matricial en el cual la droga se encuentra dispersa en una matriz adhesiva.

En la sección anterior se obtuvieron copolímeros fumáricos empleando energía de microondas y mediante polimerización controlada RAFT. Se seleccionaron distintos polímero y se procedió a la caracterización y evaluación de sus películas como posibles materiales para el empleo en sistemas de liberación transdérmicos. En ciertas partes de esta sección, se referirá además a películas elaboradas a partir de copolímeros obtenidos mediante la técnica RAFT (familia AcV-co-FDO-R) con el fin de evidenciar, en el caso de existir, diferencias entre las características de los materiales como consecuencia de la variación en los pesos moleculares resultantes, considerando que en el caso de los copolímeros obtenidos mediante la técnica RAFT es esperable que la disminución del peso molecular -en alrededor de un orden de magnitud en relación al obtenido a través de polimerización por microondas- conlleve consecuencias en las propiedades del material.

El copolímero que presentó las mejores propiedades fue seleccionado para la posterior elaboración de películas conteniendo RI y se llevó a cabo la caracterización de la dispersión del bifosfonato en la membrana, el análisis de la existencia de interacciones entre el copolímero y el activo y la evaluación del perfil de liberación del bifosfonato desde la matriz polimérica.

### Método de elaboración

Las películas del copolímero se realizaron mediante el método de *solvent-casting* descrito en la sección 2.3.1.1: las soluciones de los copolímeros fueron volcadas sobre películas de PVA previamente formadas, las cuales presentan resistencia frente a los solventes orgánicos.<sup>79</sup> Los copolímeros fumáricos empleados en la elaboración de las películas presentaron las siguientes características:

	$M_w$ (Da)	$M_w/M_n$	$F_{\text{Fumarato}}^a$
<b>AcV-co-FIP-MO</b>	287000	1,9	0,40
<b>AcV-co-FDO-MO-3</b>	419000	5,5	0,37
<b>AcV-co-FDO-R2<sup>b</sup></b>	15700	1,4	0,36

**Tabla 3.10:** Datos de los copolímeros empleados en la elaboración de membranas

<sup>a</sup>Determinado por <sup>1</sup>H-RMN según la ecuación correspondiente descrita en la sección 3.2

<sup>b</sup>Sintetizado bajo las condiciones de AcV-co-FDO-Rb, con un tiempo de reacción de 48hs.%C= 56  
Mn= 11569.

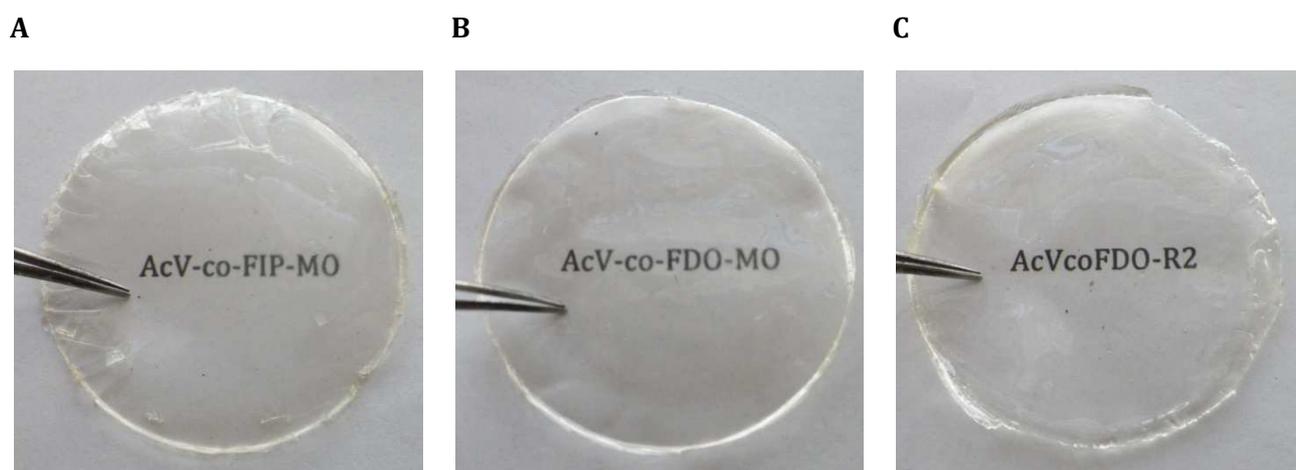
### 3.3.2 Caracterización

A continuación se presenta el proceso de selección del material más adecuado para ser empleado como matriz en sistemas de liberación orientados a la fabricación de parches transdérmicos. El proceso se realizó mediante la caracterización de los materiales y la evaluación de sus propiedades en relación con la finalidad esperada. Para ello, se caracterizaron las películas elaboradas mediante el estudio de su apariencia y morfología, ensayos de adhesión y estudio de hinchamiento.

### 3.3.2.1 Apariencia y morfología

Las películas obtenidas a partir de los copolímeros arrojaron un espesor promedio de  $220 \pm 20 \mu\text{m}$ , fueron homogéneas y considerablemente transparentes como puede apreciarse en la Imagen 3.1. La transparencia es una característica de suma importancia para las membranas a emplearse en los sistemas de liberación transdérmicos, no solo por una cuestión estética, sino porque la transparencia del material permite identificar la existencia de núcleos de cristalización de la droga cargada en la matriz. Para disminuir éstos últimos es necesario proceder a un cambio en la formulación, como bien puede ser el agregado de inhibidores de cristalización en la matriz, tal como puede encontrarse en literatura.<sup>80,81</sup>

Por otro lado, continuando con el análisis visual de las películas fumáricas, en el caso particular del copolímero AcV-co-FIP-MO (Imagen 3.1, A) se advirtieron fracturas y grietas en los bordes de las membranas como consecuencia del proceso de desmolde y posterior manejo de las membranas, las cuales dan idea de la fragilidad propia del material. Por su parte, los copolímeros AcV-co-FDO-MO-3 exhibieron igualmente una superficie homogénea y sin fracturas visibles.



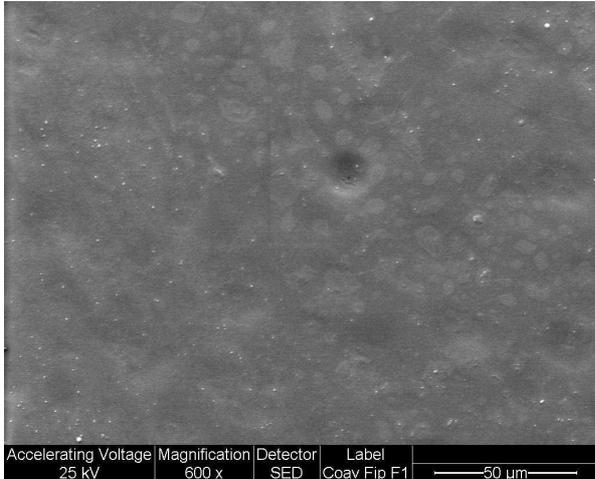
**Imagen 3.1:** Membranas basadas en copolímeros fumáricos: AcV-co-FIP-MO (A), AcV-co-FDO-MO-3 (B) y AcV-co-FDO-R2 (C)

El estudio de la superficie de las membranas por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) demostró también la existencia de fracturas en las películas del AcV-co-FIP-MO (Imagen 3.2, A1) en concordancia con el análisis visual primeramente realizado. Por otro lado, a partir las micrograffias superficiales de las películas, se observó para el AcV-co-FIP-MO que su superficie es plana en comparación con la del AcV-co-FDO-MO-3, en la que se advirtió un suave relieve ondulado probablemente correspondiente al relieve de soporte de papel aluminio del molde de casteo, el cual debió ser adoptado por la capa inferior de PVA y reproducido por el copolímero. Esta característica superficial de las películas elaboradas con el copolímero AcV-co-FDO-MO-3 es coincidente con la observada en la superficie de una película elaborada, a modo de comparación en las mismas condiciones que las fumáricas, a partir de un copolímero acrílico comercial empleado en la fabricación de parches (Imagen 3.2, C1).

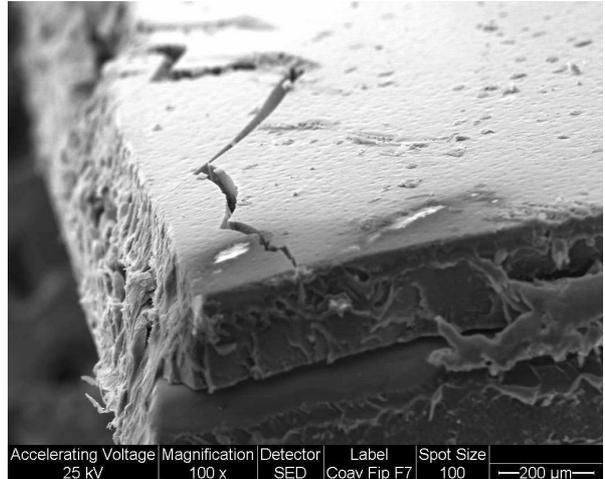
El corte transversal de las películas demuestra una notoria separación de fases para las membranas preparadas a partir del AcV-co-FIP-MO (Imagen 3.2, A2) mientras que para el caso del AcV-co-FDO-MO-3 (Imagen 3.2, B2) y la película del copolímero comercial (Imagen 3.2, C2) esto no ocurre. La unión entre ambas fases (PVA y copolímero) puede comprenderse en término de interacciones entre ambos polímeros mediante la formación de uniones puente de hidrógeno entre los grupos hidroxilos del PVA y los grupos carbonilo de los copolímeros fumáricos (acrílico en el caso del comercial). En base a lo anteriormente expuesto, es esperable que ambas películas fumáricas presentaran el mismo grado de interacción con el PVA, y por ende, una interfase similar. El motivo de estas disímiles características podría explicarse a partir de la estructura química de los copolímeros que las conforman: los grandes grupos pendientes del AcV-co-FDO-MO-3 provocan un aumento en la flexibilidad del polímero, lo cual a su vez posibilita un mejor reordenamiento de las cadenas y así maximizar las interacciones entre ambos componentes. Este incremento de la flexibilidad del AcV-co-FDO-MO-3 en relación al AcV-co-FIP-MO está confirmado por la diferencia entre las temperaturas de transición vítrea que ambos presentaron las cuales fueron de 16,2 °C y 36,3 °C respectivamente.

3.3 Elaboración de membranas

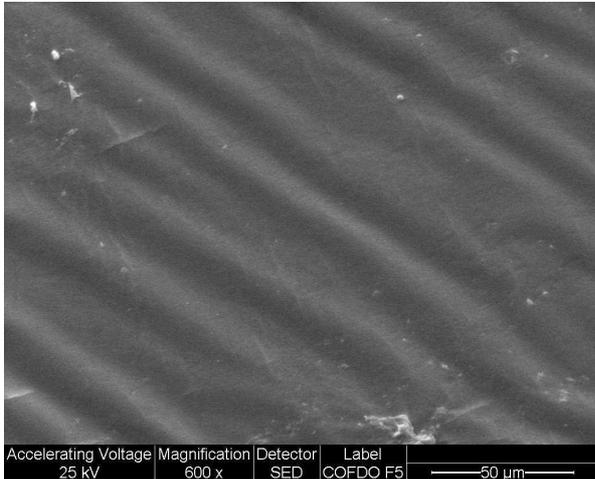
A1



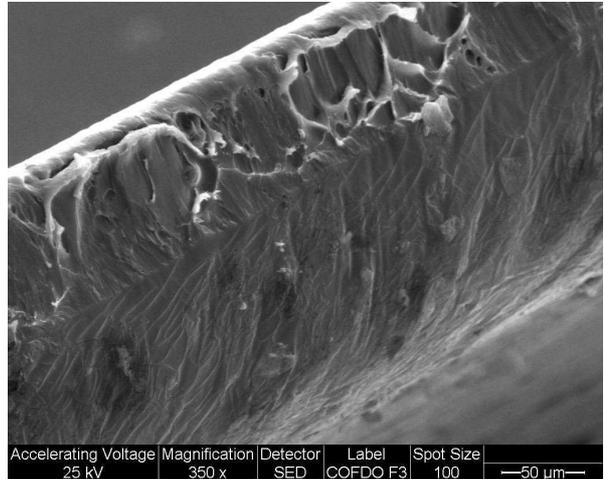
A2



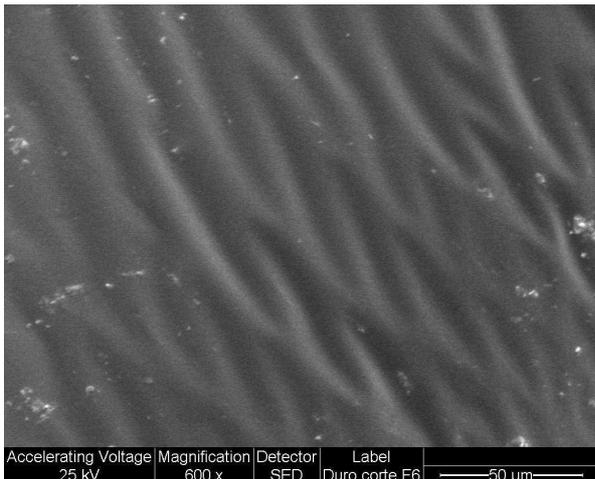
B1



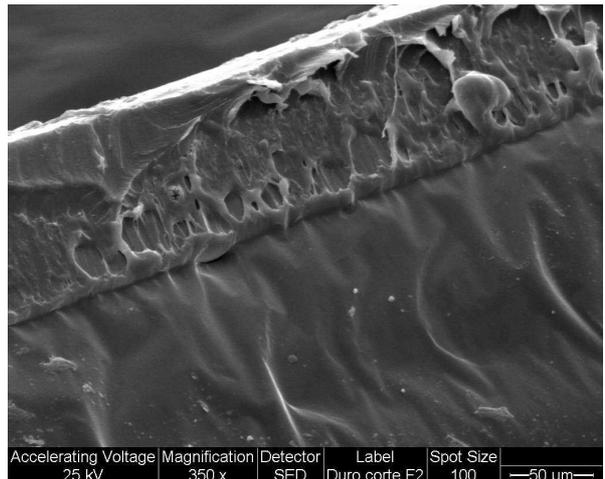
B2



C1

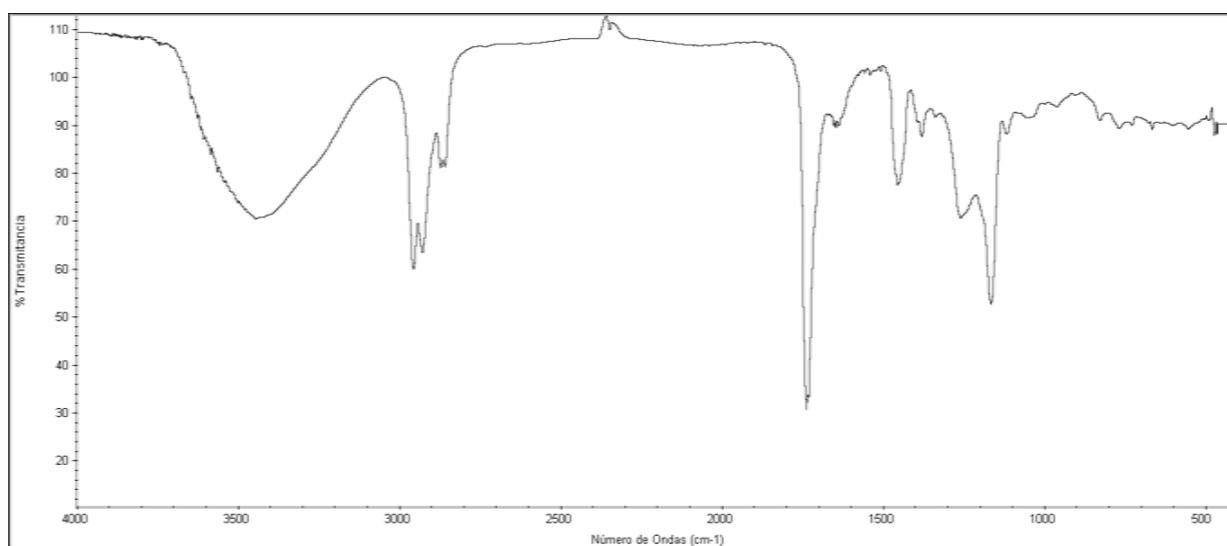


C2



**Imagen 3.2:** Micrografías obtenidas por SEM de las membranas elaboradas a partir de (A) AcV-co-FIP-MO, (B) AcV-co-FDO-MO-3 y (C) copolímero acrílico comercial

Para el caso del copolímero comercial, la unión entre fases se produce correctamente debido a que su naturaleza acrílica provoca que su Tg resulte baja además de presentar, en este caso particular, una funcionalización con grupos hidroxilos que refuerzan la unión con el PVA (Figura 3.13)-posiblemente en su composición se haya empleado el hidroxietilacrilato debido a que es un monómero ampliamente utilizado en este tipo de copolímeros<sup>-79</sup>.



**Figura 3.13:** Espectro FTIR de un copolímero acrílico comercial

La presencia de fracturas en el copolímero AcV-co-FIP-MO sugiere que no es apto para su aplicación en sistemas de liberación transdérmicos: las fracturas aumentan la probabilidad de pérdida de la matriz y afectan la estructura de la membrana produciendo una alteración en la liberación de un principio activo desde la matriz debido a que una fracción de analito será liberado a partir de las fisuras del copolímero.

Por otro lado, el análisis de las películas obtenidas a partir del AcV-co-FDO-MO-3, demostró una superficie y corte homogéneos sin defectos como huecos o poros, lo cual es de suma importancia a la hora de proceder a obtener un perfil de liberación correcto y reproducible.

### 3.3.2.2. Ensayos de adhesión

#### Prueba del pulgar

Las propiedades adhesivas son factores fundamentales en el desarrollo de un sistema de liberación del tipo parche transdérmico.<sup>82</sup>

Con el objetivo de evaluar la apreciación de distintos usuarios frente a las películas elaboradas, se llevó a cabo una prueba cualitativa de adhesión para determinar cuán efectiva es la adhesión entre la membrana y la piel (n=10). Los resultados se presentan a continuación en las siguientes tablas:

MUESTRA	ADHESIVO	POCO ADHESIVO	NO ADHESIVO	TOTAL
AcV-co-FIP-MO	-	3 (30%)	7 (70%)	10 (100%)
AcV-co-FDO-MO-3	9 (90%)	1 (10%)	-	10 (100%)
AcV-co-FDO-R2	10 (100%)	-	-	10 (100%)

**Tabla 3.11:** Resultados de la prueba de adhesión en distintas películas de copolímeros

MUESTRA	DEJA RESIDUO	NO DEJA RESIDUO	TOTAL
AcV-co-FIP-MO	-	10 (100%)	10 (100%)
AcV-co-FDO-MO-3	-	10 (100%)	10 (100%)
AcV-co-FDO-R2	9 (90%)	1 (10%)	10 (100%)

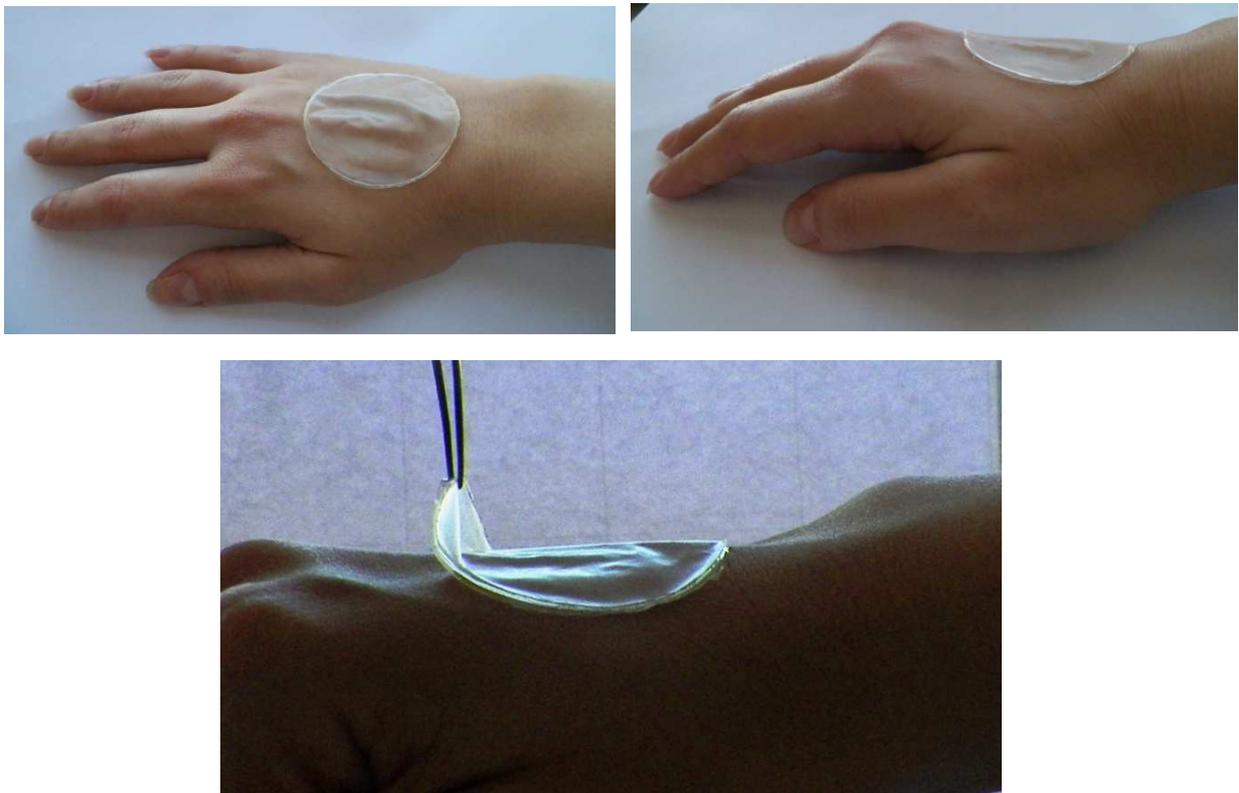
**Tabla 3.12:** Evaluación de la existencia de residuo luego de realizar la prueba de adhesión en distintas películas de copolímeros

Los resultados demostraron que el copolímero AcV-co-FIP-MO presentó una pobre adhesión a la piel mientras que los copolímeros de la familia AcV-co-FDO mostraron ambas buenas propiedades adhesivas. Sin embargo, para el caso de las

## 3.3 Elaboración de membranas

películas con AcV-co-FDO-R2, los usuarios evidenciaron residuo una vez retiradas, lo cual puede explicarse considerando el bajo peso molecular que posee el copolímero. La existencia o ausencia de residuo al retirar la membrana es un indicador de la fuerza cohesiva y elasticidad del polímero.<sup>83</sup> El residuo advertido en el caso del copolímero AcV-co-FDO-R2 puede comprenderse como una consecuencia de su bajo peso molecular, el cual provoca una débil interacción entre las cadenas poliméricas, originando una baja fuerza cohesiva que frente a la fuerza realizada para retirar la membrana de la zona de adhesión, provoca una ruptura en la matriz y el depósito de una porción de ésta en la superficie a la cual se encontraba previamente adherida.

Por su parte, las membranas elaboradas con el AcV-co-FDO-MO-3 no dejaron residuo una vez que fueron despegadas de la piel, convirtiéndose en el material de trabajo seleccionado para la continuación de este trabajo.



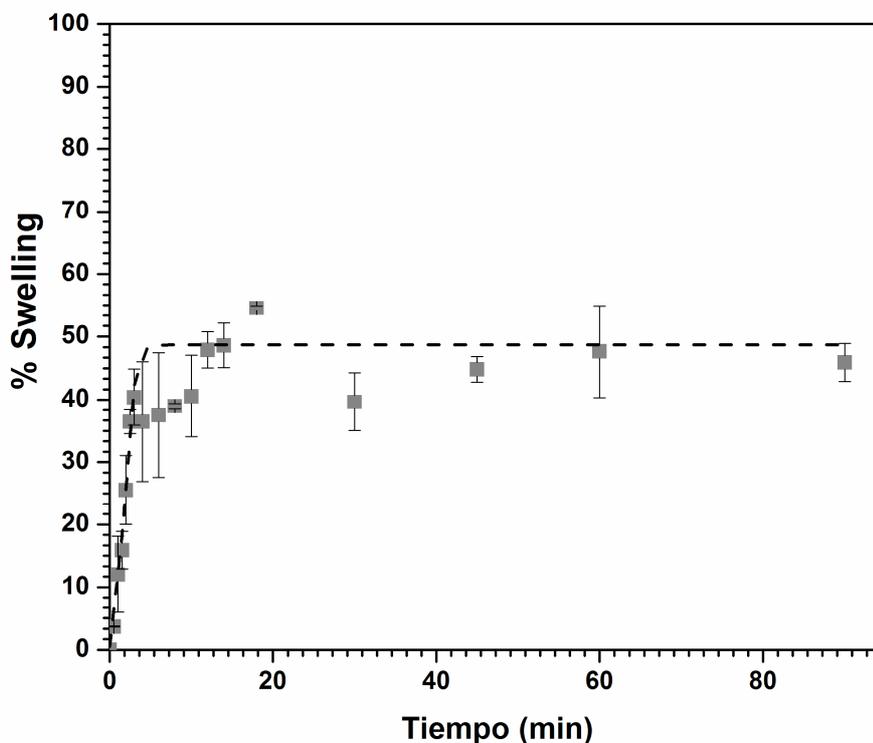
**Imagen 3.3:** Fotografías de una membrana elaborada a partir del AcV-co-FDO-3 y su adhesión a la piel del dorso de la mano

En la Imagen 3.3 se muestran fotografías de la membrana preparada con el copolímero AcV-co-FDO-MO-3 adherida al dorso de la mano (fotografías frontal y de perfil) y su posterior desprendimiento. En las fotografías puede apreciarse que la membrana presenta una correcta adhesión a la piel, y tiene un desprendimiento suave sin provocar su estiramiento.

### 3.3.2.3. Estudio de hinchamiento

El proceso de hinchamiento involucra en su desarrollo el pasaje de la matriz polimérica a una forma gomosa relajada,<sup>84</sup> en la cual las moléculas de agua difunden hacia el interior de la matriz actuando como plastificantes y promoviendo la relajación de las cadenas poliméricas.

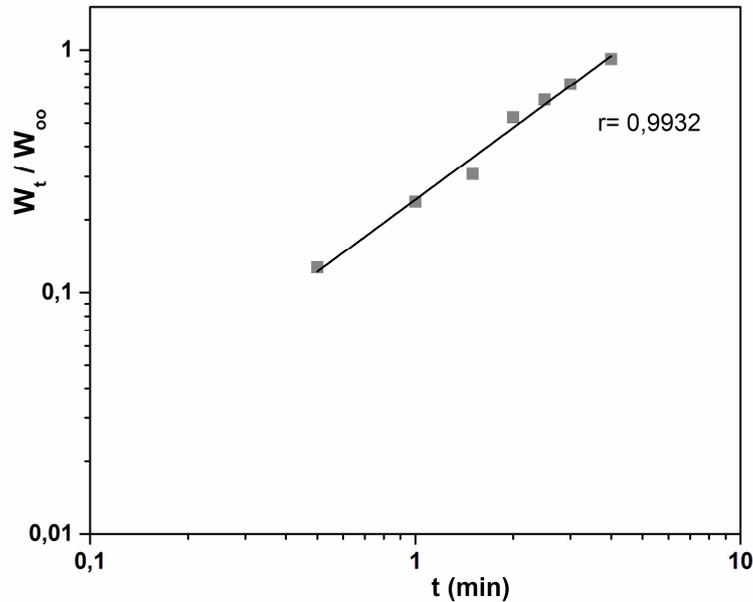
El estudio de hinchamiento de las membranas elaboradas a partir del AcV-co-FDO-MO-3 mostró un rápido incremento durante los primeros 7 minutos, para luego alcanzar el equilibrio con un porcentaje de hinchamiento de 48,7% según se presenta en la Figura 3.14. De la gráfica puede advertirse además, que el *plateau* se mantuvo alrededor del mencionado valor, sin mostrar decrecimiento u otro tipo de comportamiento hasta el tiempo final analizado. En relación al AcV-co-FDO-R2 no se realizaron ensayos de hinchamiento debido a que el valor del peso molecular del copolímero afecta directamente al proceso de *swelling*, favoreciendo la penetración del solvente a la matriz. Esto puede comprenderse considerando que el proceso de difusión de las moléculas de solvente en matrices no porosas está determinado por el volumen libre en éstas,<sup>85</sup> el cual corresponde a zonas no ocupadas por polímero que en este caso correspondería a los extremos de las cadenas poliméricas. A menor peso molecular, existen más cantidad de extremos terminales para una misma masa de copolímero, por lo cual es esperable que las películas elaboradas a partir del AcV-co-FDO-R2 sufran hinchamiento con mayor rapidez. Trasladando este razonamiento al estudio del transporte de un soluto desde la matriz, el aumento de los extremos terminales favorecería una liberación brusca y no sostenida, lo cual no es lo buscado en el diseño de sistemas de liberación de principios activos.



**Figura 3.14:** Hinchamiento de películas elaboradas a partir de AcV-co-FDO-MO-3

Como se mencionó en la sección 2.3.2.3, el ensayo de hinchamiento se realizó con el objetivo de estimar el comportamiento del copolímero frente a las moléculas de solvente como una forma de predecir el mecanismo interviniente en los posteriores ensayos de liberación de RI desde la matriz. Para ello, se empleó la Ecuación 2.3, en su forma logarítmica y de su correspondiente gráfica se calculó el exponente  $n$ , el cual informa acerca del mecanismo involucrado en el transporte del líquido (Figura 3.15). El valor obtenido fue  $n = 1,03$ , lo cual indica que el transporte procede mediante un mecanismo anómalo no-Fickiano en el cual están involucrados tanto aportes propiamente difusivos como aportes correspondientes al proceso de relajación de las cadenas del polímero.<sup>54</sup> En la literatura<sup>55</sup> se menciona que valores del exponente superiores a 1 refieren a un caso de transporte denominado Super Caso II de transporte el cual es producto de un

proceso de plastificación como consecuencia de la reducción de las fuerzas de atracción entre las cadenas del polímero como se describió en 2.4.5.5.



**Figura 3.15:** Gráfica log-log correspondiente a la Ecuación 2.3 para el hinchamiento de membranas elaboradas a partir de AcV-co-FDO-MO-3.

#### 3.3.2.4 Evaluación de la eficacia del método de *solvent-casting*

El método de *solvent-casting* es una técnica ampliamente utilizada en la elaboración de membranas y matrices a partir de polímeros, debido a la practicidad de su uso. Con la finalidad de evaluar la eficacia del mismo, se procedió a la determinación de la posible pérdida de masa durante el proceso y, de ser así, establecer si ésta fue significativa o no respecto a la cantidad teórica que se pretendió incorporar. Se realizaron pruebas según se describe en la sección 2.3.1.2 y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.13. A partir de estos resultados se procedió a la evaluación mediante el Test de Student para una muestra comparando las masas individuales casteadas con la media observada ( $\bar{x}=0,498$  gr ) y desviación estándar ( $sd=0,004$ ) con la media esperada ( $\mu_0=0,5$ ). Los

## 3.3 Elaboración de membranas

resultados arrojaron que para un rango de 95% de confianza no existe diferencia significativa entre la media experimental y la teórica.

	Masa pesada pre-casteo (gr.)	Masa depositada (gr.)	% Masa depositada en la película respecto a la pesada
<b>Película 1</b>	0,50677	0,50337	99,3 %
<b>Película 2</b>	0,50328	0,49965	99,3 %
<b>Película 3</b>	0,50222	0,49681	98,9 %
<b>Película 4</b>	0,50072	0,49706	99,3 %
<b>Película 5</b>	0,50056	0,49220	98,3 %
	<b>Media ± sd</b>	<b>0,498 ± 0,004</b>	<b>99,0 ± 0,4 %</b>

**Tabla 3.13:** Resultados de los ensayos de eficacia en el casteo del copolímero

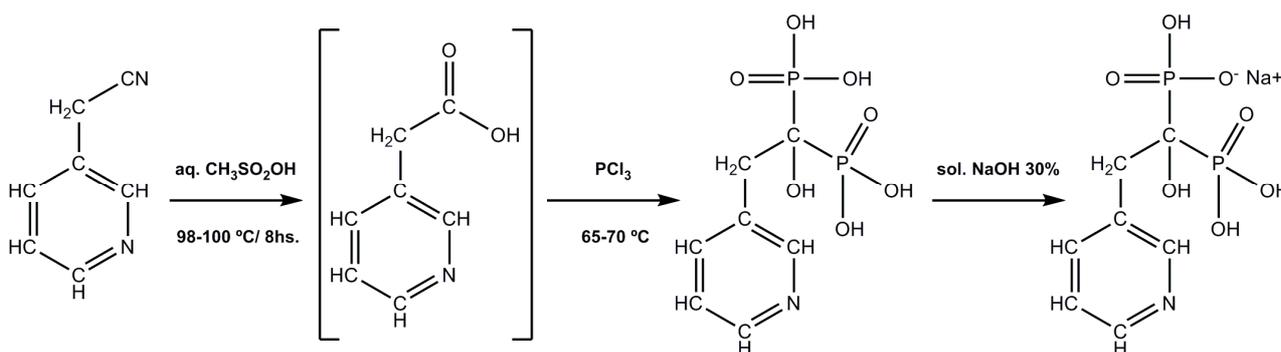
### 3.3.3. Películas de copolímero conteniendo risedronato

A partir de la selección del copolímero AcV-co-FDO-MO-3 como material para la elaboración del sistema de liberación transdérmico, se procedió a la elaboración de películas conteniendo RI.

La masa de bifosfonato a incorporar a la membrana (30 mg.) se decidió a partir de la cantidad de la droga presente en comprimidos comerciales, la cual corresponde a 35 mg para una dosis semanal. Para evaluar si el sistema de liberación transdérmico elaborado a partir del AcV-co-FDO-MO-3 cuenta con la capacidad de poder dispersar altas cantidades de carga de droga, se realizó la incorporación de 60 mg de RI con la finalidad de evaluar el efecto de la concentración en la dispersión de la droga en la matriz del copolímero, en los ensayos de liberación y en los mecanismos de transporte involucrados.

#### 3.3.3.1 Risedronato

El RI fue sintetizado en el laboratorio de acuerdo al siguiente esquema, a partir de los reactivos descritos en la sección 2.3.3.1:



**Esquema 3.8:** Síntesis del RI en el laboratorio

## 3.3 Elaboración de membranas

El rendimiento obtenido en la síntesis fue del 83%, valor concordante con el presentado en literatura (81%)<sup>45</sup> y el producto obtenido fue un sólido blanco. La medida del punto de fusión como determinación de la pureza del producto arrojó que éste funde con descomposición a 220 °C, sin presentar coloración hasta 230 °C, temperatura en la cual se aprecia una coloración amarronada.

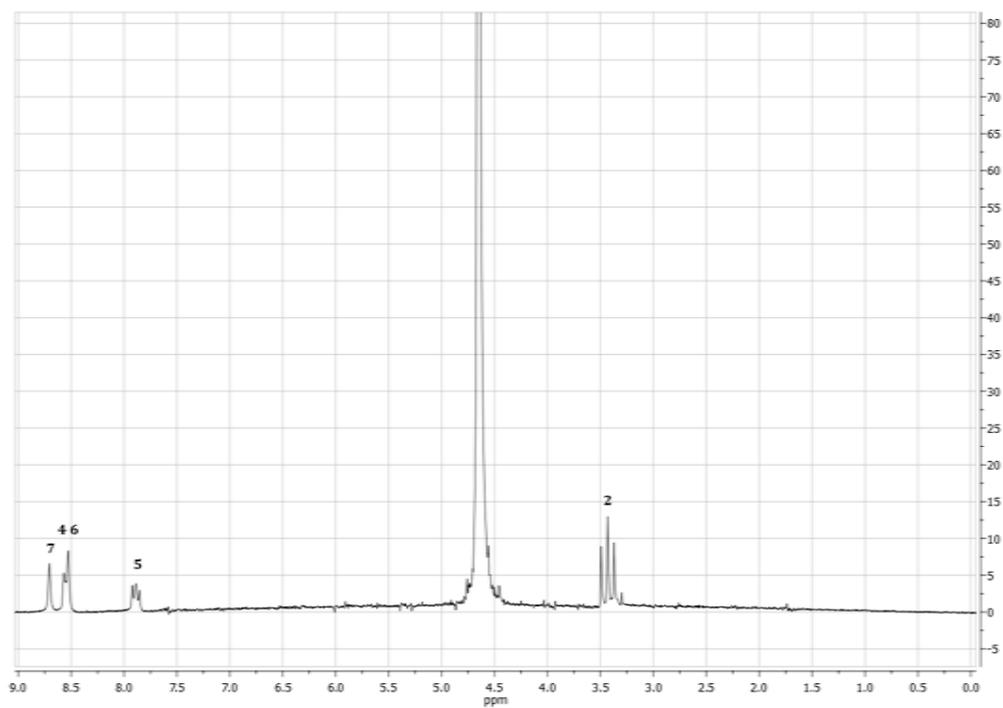
Previo a su uso, el RI sintetizado se analizó mediante <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN y FTIR; las señales y asignaciones según la técnica empleada se presentan en la Tabla 3.14 y los espectros correspondientes se muestran en las Figuras 3.16 y 3.17. Los valores obtenidos son concordantes con los presentados en literatura.<sup>45</sup>

También se realizó la medida del espectro UV-vis, resultado que se presenta en 3.4.1.1 como justificación en la selección de la longitud de onda de trabajo en el desarrollo del método cromatográfico para determinación de RI por HPLC.

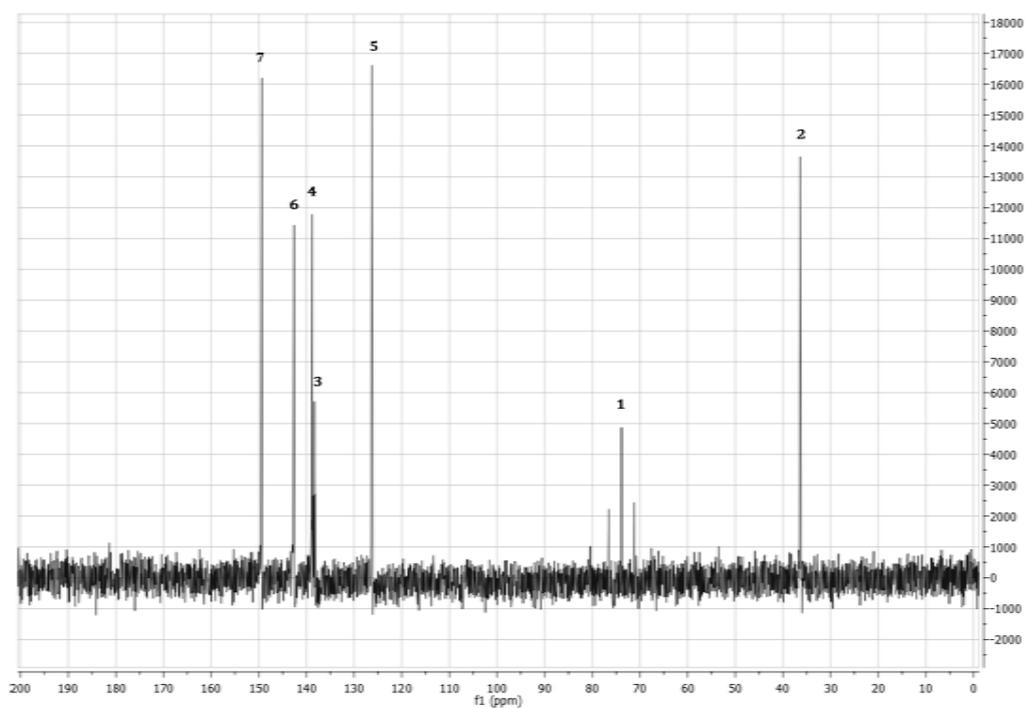
Estructura del risedronato monosódico	
<sup>1</sup> H-RMN (H <sub>2</sub> O) δ (ppm) (multiplicidad, integración) (asignación)	3,43 (t, 2H) <b>(2)</b> ; 7,89 (m, 1H) <b>(5)</b> ; 8,50 (d, 2H) <b>(6)</b> y <b>(4)</b> ; 8,70 (s, 1H) <b>(7)</b>  Las señales de los H pertenecientes a los grupos OH se encuentran superpuestas con la señal del solvente.
<sup>13</sup> C-RMN (CDCl <sub>3</sub> ) δ (ppm)(asignación)	73,87 <b>(1)</b> ; 36,36 <b>(2)</b> ; 126,25 <b>(5)</b> ; 138,34 <b>(3)</b> ; 138,82 <b>(4)</b> ; 142,60 <b>(6)</b> ; 149,35 <b>(7)</b>

**Tabla 3.14:** Asignación de señales de los espectros <sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN del RI

A



B

Figura 3.16: Espectros  $^1\text{H}$ -RMN (A) y  $^{13}\text{C}$ -RMN (B) del RI

## 3.3 Elaboración de membranas

Los anteriores análisis del RI mediante  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN permitieron identificar correctamente la estructura del compuesto y evidenciar la ausencia de impurezas en la muestra. A pesar de ello, el RI es una droga que puede existir en distintas formas de hidratación por lo que posterior al análisis estructural del bifosfonato se procedió al estudio del estado de hidratación del bifosfonato sintetizado. Redman-Furey y colaboradores<sup>86</sup> realizaron la caracterización de tres hidratos de RI (monohidratado, hemipentahidratado e hidratación variable) y de la forma no hidratada, encontrando que las dos primeras formas presentan la banda correspondiente al grupo OH libre alrededor de  $3560\text{ cm}^{-1}$  y  $3620\text{ cm}^{-1}$ . Particularmente la forma monohidratada, según los autores, exhibe una banda aguda alrededor de  $3570\text{ cm}^{-1}$ , mientras que el hemipentahidrato muestra un doblete en  $3561$  y  $3617\text{ cm}^{-1}$  y una banda ancha (al igual que la forma de hidratación variable) centrada en alrededor de  $3332\text{ cm}^{-1}$ .

Los espectros del RI analizados mediante las técnicas de DRIFT y FTIR se compararon con el espectro FTIR de RI aislado a partir de una muestra farmacéutica comercial con la finalidad de advertir más fácilmente el estado de hidratación (Figura 3.17). El análisis de los anteriores, considerando las características descritas por Redman-Furey y colaboradores<sup>86</sup>, advirtieron que el RI sintetizado pertenece a la forma hemipentahidratada, mientras que el RI aislado corresponde al monohidrato. Las bandas pertenecientes a los OH obtenidas para cada uno se presentan a continuación en las siguientes tablas:

RI 2,5.H <sub>2</sub> O (FTIR) según Redman-Furey y colaboradores <sup>86</sup>	RI sintetizado (FTIR)	RI sintetizado (DRIFT)
$3617\text{ cm}^{-1}$	$3618\text{ cm}^{-1}$	$3615\text{ cm}^{-1}$
$3561\text{ cm}^{-1}$	$3568\text{ cm}^{-1}$	$3565\text{ cm}^{-1}$
$3332\text{ cm}^{-1}$	$3360\text{ cm}^{-1}$	$3331\text{ cm}^{-1}$

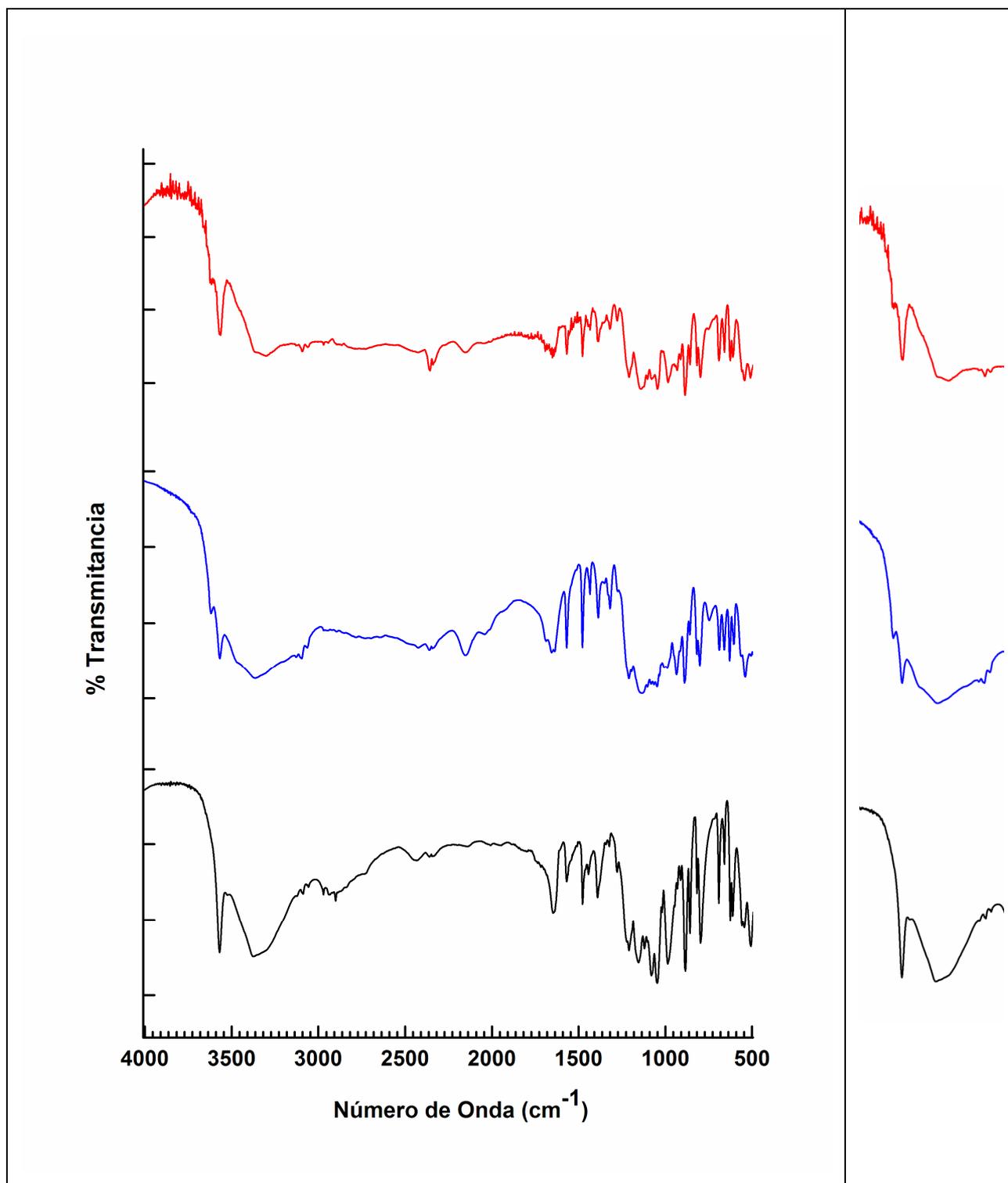
**Tabla 3.15:** Comparación de bandas características del RI hemipentahidrato

RI monohidrato (FTIR) según Redman-Furey y colaboradores <sup>86</sup>	RI aislado de muestra comercial
3570 cm <sup>-1</sup>	3568 cm <sup>-1</sup>

**Tabla 3.16:** Comparación de banda característica del RI monohidrato

A partir de los resultados obtenidos, puede considerarse que el RI sintetizado se obtuvo en la forma de hemipentahidrato. Además, se observa que ambas técnicas (FTIR y DRIFT) mostraron similar capacidad en la identificación de la especie hidratada del RI en función de las bandas pertenecientes a los OH, encontrándose solo una diferencia en la banda del RI sintetizado determinada por FTIR en 3360 cm<sup>-1</sup>. Este resultado sobre la análoga capacidad del FTIR y DRIFT en identificación de grupos funcionales es coincidente con trabajos presentes en literatura donde se comparan ambas técnicas en la caracterización química cualitativa de muestras basada en las ubicaciones de bandas.<sup>87</sup>

En adelante, será el RI . 2,5 H<sub>2</sub>O el que se empleará en el desarrollo de las membranas y los ensayos de liberación ya que el RI aislado del producto comercial presentó impurezas (determinadas por HPLC) a pesar de su purificación por recristalización. Estas trazas, probablemente corresponden a residuos de otros ingredientes propios de la formulación de origen.



**Figura 3.17:** Izquierda: Espectros FTIR del RI sintetizado (rojo obtenido por DRIFT y azul por transmisión en pastilla de KBr) y RI aislado de una muestra comercial (negro).

Derecha: Detalle de la zona correspondiente a los OH libres.

### 3.3.3.2 Método de incorporación de risedronato

Como se mencionó previamente, el RI es insoluble en solventes orgánicos, incluso en el solvente con el cual se efectúa el *casting* de las películas (acetato de etilo). La incorporación del RI a la matriz polimérica se realizó mediante la dispersión del sólido en una solución del copolímero (0,5 gr.) en el solvente elegido (4,0 ml) con ayuda de ultrasonido hasta la obtención de una dispersión homogénea a simple vista.

En este trabajo se llevó a cabo la forma más sencilla de dispersión de un droga sólida en un polímero (una mezcla binaria) debido a que como paso primero en la evaluación del AcV-co-FDO-MO-3 como matriz de liberación transdérmica es necesario estudiar, en ausencia de otro ingrediente de formulación, el comportamiento de la liberación de un principio activo desde la matriz y los fenómenos de transporte involucrados. Al momento de elaborar la formulación final deberá considerarse la adición de determinados componentes a la membrana con el objetivo de favorecer la solubilización de la droga en la matriz y la permeación a través de la piel.<sup>88,89</sup>

A partir del conocimiento del comportamiento del copolímero, podrá en un paso futuro procederse al ajuste de las condiciones de formulación para su posterior optimización.

### 3.3.3.3 Apariencia

Los espesores de las películas conteniendo RI fueron evaluados para las concentraciones de 6% p/p y 12% p/p, obteniéndose los siguientes valores (expresados como media  $\pm$  desvío estándar):

6% p/p:  $280 \pm 62 \mu\text{m}$  (n=5)

12% p/p:  $277 \pm 65 \mu\text{m}$  (n=5)

Los anteriores resultados arrojaron que la variación del espesor entre las películas con las dos relaciones de RI/copolímero no es significativa debido a que la diferencia está dentro de las desviaciones estándar de las muestras las cuales son, a su vez, similares.

La transparencia de las películas de AcV-co-FDO-MO-3 advertida en 3.3.2.1 se empleó con el objetivo de estudiar la dispersión del RI cargado en el copolímero, aprovechando la opacidad que el bifosfonato produce en la matriz como criterio para la determinación de homogeneidad. Siguiendo esta premisa, puede observarse en las fotografías de la Imagen 3.4, y en concordancia con la forma de integración del RI a la película, que el copolímero AcV-co-FDO-MO-3 produce películas con una distribución homogénea de RI para 30 mg (6% p/p) (Imagen 3.4 (A)) y para 60 mg (12% p/p) (Imagen 3.4 (B)).

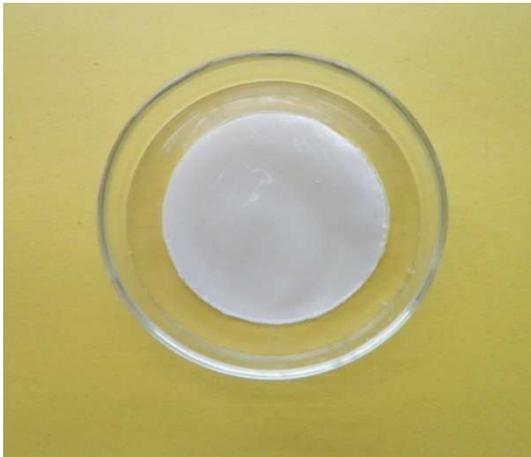
También se obtuvieron películas con AcV-co-FDO-R2, en las que fue apreciada una significativa heterogeneidad en la matriz, la cual posiblemente esté directamente ligada a la diferencia en los pesos moleculares de la muestra (la composición es similar según la Tabla 3.10) los cuales tienen una directa influencia sobre la viscosidad de la solución.<sup>90</sup> Si bien los copolímeros obtenidos mediante la técnica de polimerización controlada efectivamente presentaron menores polidispersidades, sus pesos moleculares son un orden de magnitud menor, por lo que la mala dispersión de la droga en las matrices ensayadas con estos copolímeros podría ser consecuencia de la baja viscosidad resultante de las soluciones. La disminución del volumen de disolución en el método de elaboración de membranas de los 4,0 ml originales a 2,0 ml y 1,0 ml con lavados de 1,0 ml no mejora la dispersión del bisfosfonato, sino que además agrega otro inconveniente que es el aumento en la pérdida de material durante el proceso de casteo.

3.3 Elaboración de membranas

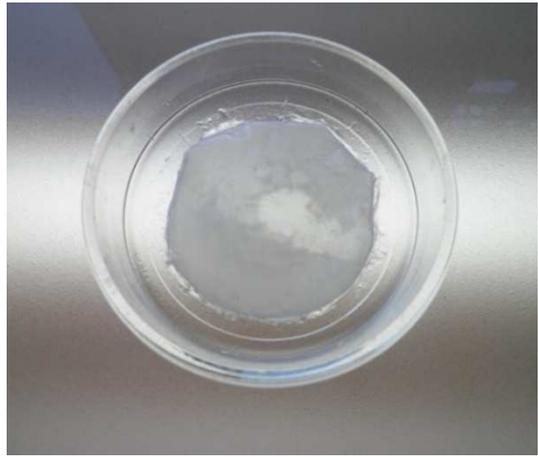
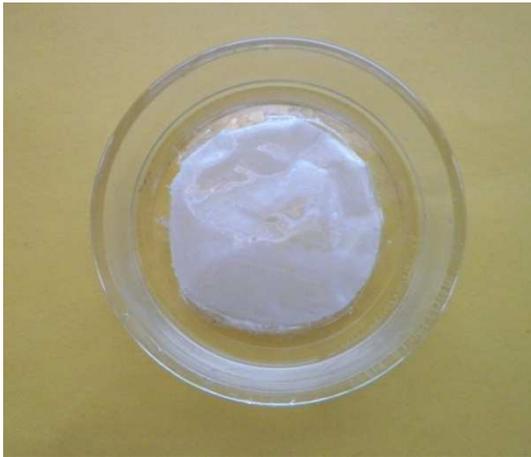
A



B



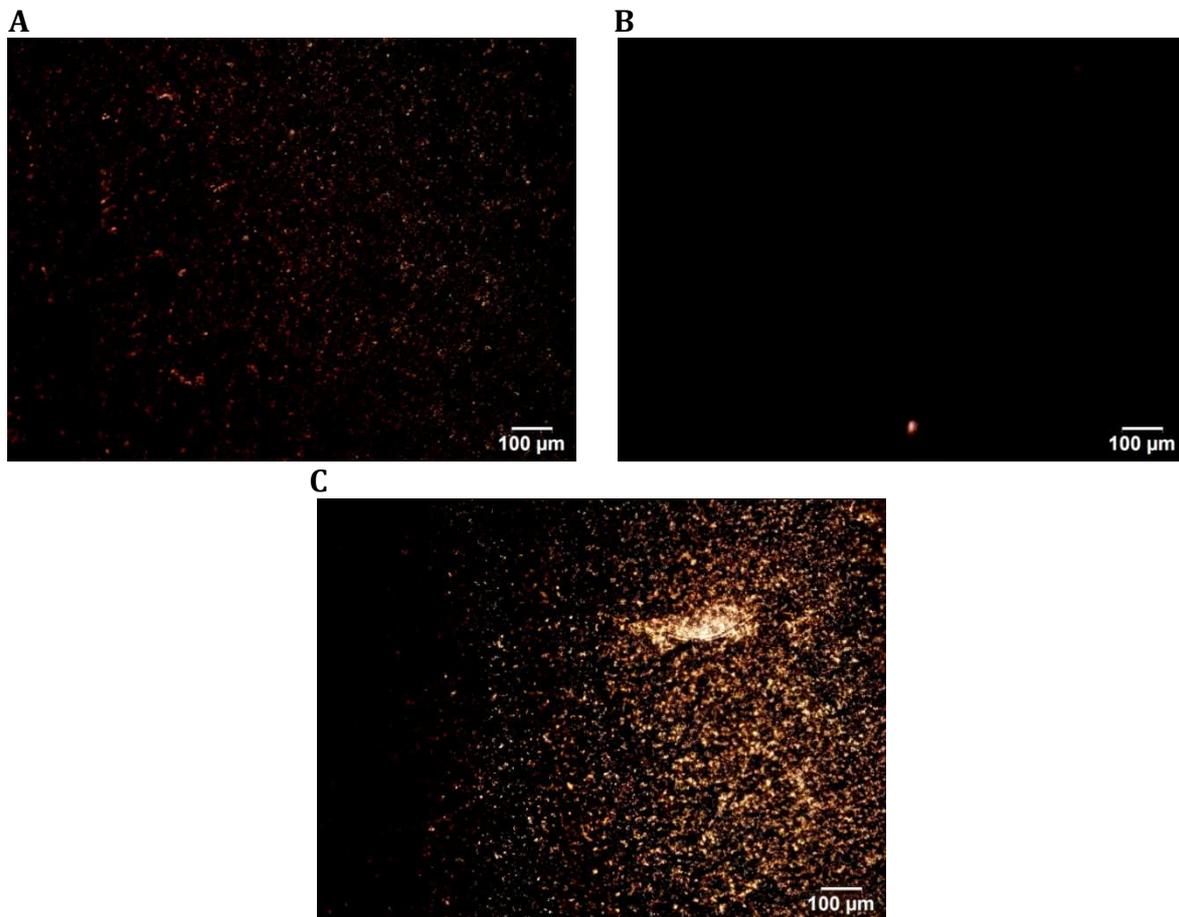
C



**Imagen 3.4:** Películas de AcV-co-FDO-MO-3 conteniendo 30 mg y 60 mg de RI (A) y (B) respectivamente, y película de AcV-co-FDO-R2 conteniendo 30 mg de RI (C)

## 3.3 Elaboración de membranas

Las membranas fueron además observadas mediante Microscopía Óptica (iluminadas por debajo) advirtiéndose en todas la dispersión del RI en la matriz (Imagen 3.5) como zonas oscuras (RI) en una matriz transparente que se presenta como zonas claras (ausencia y/o baja concentración de RI). Para el caso de las películas elaboradas con el AcV-co-FDO-MO-3 conteniendo 30 mg y 60 mg de RI (Imagen 3.5 (A) y (B) respectivamente) ambas presentaron homogeneidad notablemente superior a la que presentó la película obtenida con el AcV-co-FDO-R2, en la que se encontraron zonas con marcadas diferencias de concentración, hecho concordante con la apreciación visual previamente realizada



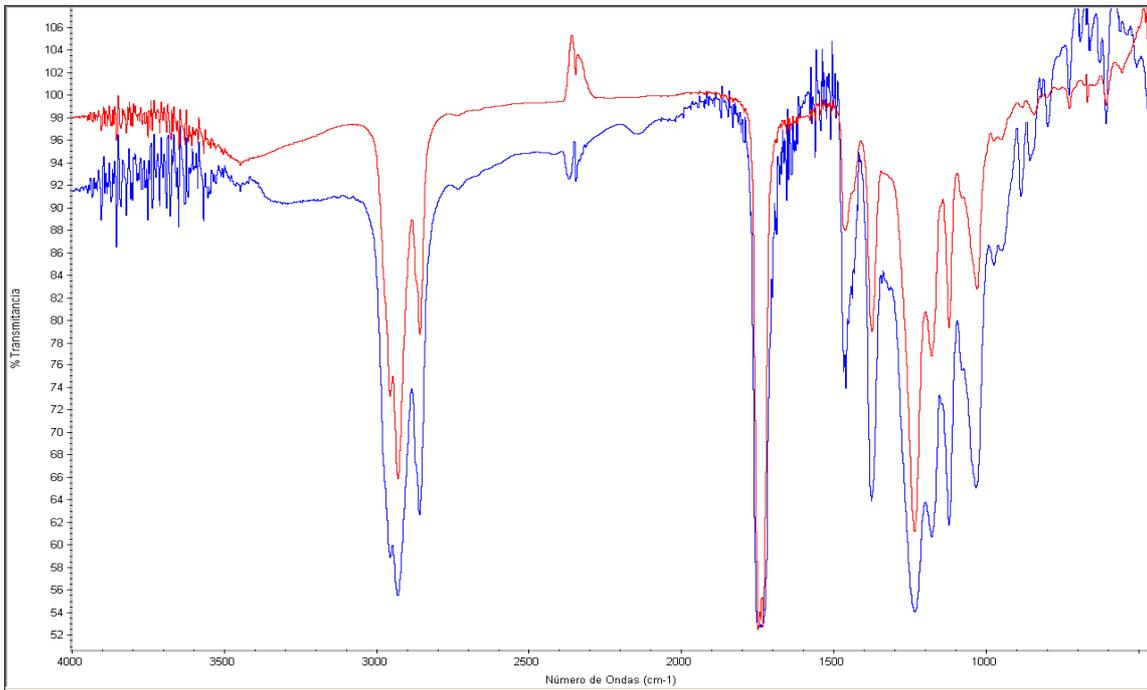
**Imagen 3.5:** Micrograffas de membranas de AcV-co-FDO-MO-3 conteniendo 30mg (A) y 60 mg (B) de RI –se aprecia un defecto de la matriz-, y película de AcV-co-FDO-R2 conteniendo 30 mg de RI (C). Aumento: 10X.

### 3.3.3.4 Estudio de interacciones droga-copolímero

El análisis de la existencia de interacciones entre el copolímero y la droga se llevó a cabo mediante FTIR, bajo la consideración de que la frecuencia vibracional de los grupos atómicos depende de cómo éstos se encuentran arreglados en la estructura molecular y cómo interactúan con grupos funcionales vecinos.<sup>91</sup> La existencia de interacciones entre compuestos genera un cambio en el entorno atómico -modificando la vibración original en ausencia de éstas- evidenciándose lo anterior en el desplazamiento de los números de ondas de las bandas pertenecientes a esos grupos atómicos. Lijuan Lei y colaboradores<sup>47</sup> evidenciaron la presencia de interacciones de tipo puente de hidrógeno entre hidroxiapatita y grupos carbonilos presentes en el copolímero a través de la modificación en la frecuencia del carbonilo de  $1730\text{ cm}^{-1}$  a  $1734\text{ cm}^{-1}$ , además de la modificación de la frecuencia de flexión del grupo hidroxilo (-OH) de  $1632\text{ cm}^{-1}$  a  $1629\text{ cm}^{-1}$ .

El estudio de la existencia de interacciones entre la matriz y el RI se llevó a cabo inicialmente mediante la comparación de los espectros del copolímero AcV-co-FDO-MO y el espectro del copolímero anterior con RI en proporción 6% p/p (el espectro con una carga de 12% p/p arrojó resultados similares al anterior) se muestran en la Figura 3.18.

Del análisis de dichos espectros no se advirtió la existencia de desplazamientos significativos de las bandas del copolímero en comparación con la mezcla del copolímero y RI, lo que permite concluir que a las concentraciones analizadas no se han evidenciado interacciones entre ambos componentes mediante esta técnica espectroscópica.



**Figura 3.18:** Espectros FTIR de: AcV-co-FDO-MO (rojo) y Acv-co-FDO-MO + RI 6% p/p (azul)

El análisis del termograma obtenido mediante DSC (Figura 3.19) de la mezcla bifosfonato-copolímero muestra una disminución de la  $T_g$  de la matriz de 16,2 °C (polímero sin droga incorporada) a -2,6 °C (mezcla con RI). Si se supone que el copolímero y la droga forman una mezcla ideal, la  $T_g$  de una mezcla binaria puede ser estimada mediante la Ecuación de Gordon-Taylor:<sup>92-94</sup>

$$T_g \text{ mez} = \frac{\omega_1 T_{g1} + K\omega_2 T_{g2}}{\omega_1 + K\omega_2} \quad \text{Ecuación 3.4}$$

donde,

$T_g \text{ mez}$ : temperatura de transición vítrea de la mezcla

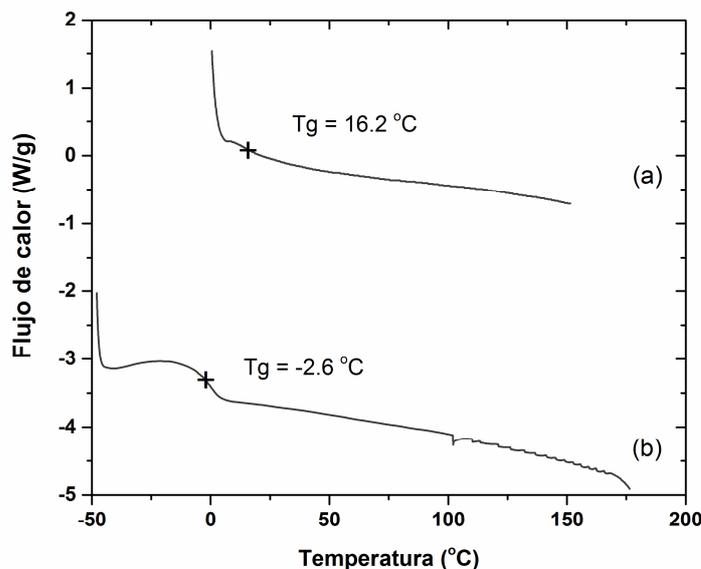
$\omega_1, \omega_2$ : fracciones en peso de los componentes en la mezcla

$T_{g1}, T_{g2}$ : temperaturas de transición vítreas de los componentes

$K$ : constante que puede aproximarse al cambio en las capacidades caloríficas de la forma  $K = \frac{\Delta C_{p2}}{\Delta C_{p1}}$

El establecimiento de interacciones específicas droga-polímero conlleva un aumento de la  $T_g$  por encima de la teórica, mientras que si la interacción droga-polímero es menor que las interacciones droga-droga y polímero-polímero, la  $T_g$  obtenida será menor a la esperada.<sup>94</sup> Esta disminución en la temperatura de transición vítrea del material puede comprenderse si se tiene en cuenta que el agregado de la droga provoca un efecto plastificante en el polímero al generar una separación de las cadenas poliméricas, generando un aumento del volumen libre y favoreciendo su movimiento.<sup>95</sup> Los resultados obtenidos para el sistema RI/AcV-co-FDO-MO-3 indican que de existir algún tipo de interacción, ésta sería menor que las interacciones de los componentes entre sí mismos.

Por último, el cambio en la  $T_g$  del polímero indicó además que el método de elaboración de las membranas logró satisfactoriamente la incorporación del RI entre las cadenas de la estructura polimérica, y no la simple formación de una fase separada al polímero.



**Figura 3.19:** Termogramas de AcV-co-FDO-MO-3 (a) y Acv-co-FDO-MO-3 + RI (b)

### 3.4 Ensayos de liberación *in vitro*

En esta sección se describen los ensayos de liberación *in vitro* de RI desde la matriz seleccionada a dos concentraciones, los cuales fueron analizados mediante distintos modelos teóricos. Para establecer los perfiles de liberación, se procedió previamente a la determinación del RI por HPLC y el posterior análisis de los parámetros cromatográficos del método desarrollado. Asimismo se realizó el estudio de la estabilidad de soluciones de RI en condiciones análogas a las de los ensayos de liberación, y la estimación de los porcentajes reales de copolímero depositado y de droga cargada en las películas.

#### 3.4.1 Determinación de risedronato por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia

##### 3.4.1.1 Método cromatográfico

La medición de la absorción UV-vis realizada entre las longitudes de onda de 200 y 500 nm en agua destilada del RI llevó a la obtención del espectro que se presenta en la Figura 3.19, el cual fue coincidente con lo observado en literatura<sup>96</sup>. A partir de la evaluación de la gráfica anterior, se seleccionó como longitud de onda de trabajo en el cromatógrafo para la detección del RI, la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción en 262 nm tal como H.-J. Jia, W. Li y K. Zhao<sup>97</sup> y P.T. Vallano y colaboradores<sup>98</sup> realizaron en sus trabajos de determinación cromatográfica de RI.

Si bien en la literatura pueden encontrarse referencias en las cuales se han realizado determinaciones espectrofotométricas de RI y no empleando la técnica cromatográfica,<sup>96,99</sup> en este trabajo se procedió al desarrollo de ésta última por considerarla más segura y rigurosa en el control de la pureza de la muestra: la medida en UV-vis de una muestra dada a una longitud de onda no discrimina compuestos en el caso de existir impurezas o productos de degradación ya que la absorción sería una resultante de la absorción de la mezcla general. En cambio, el método cromatográfico permite determinar si existen en una muestra más de un compuesto mediante la observación del/los distinto/s tiempo/s de retención obtenido/s al pasar por la columna de separación, mientras en simultáneo el detector de arreglo de diodo permite obtener el espectro UV-vis comprendido entre 190 y 400 nm de cada población de manera que su naturaleza pueda ser evaluada y controlada.

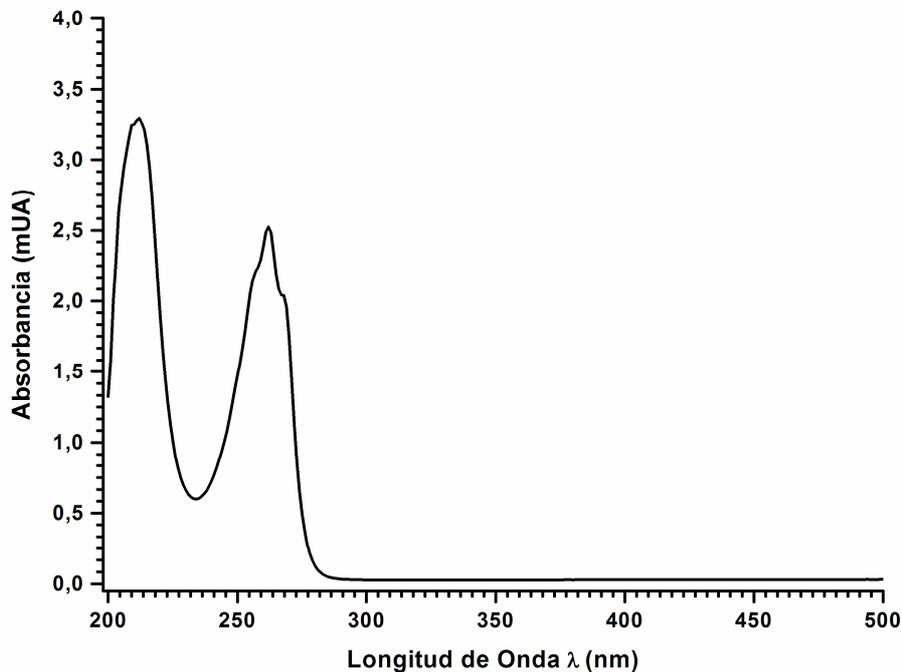


Figura 3.20: Espectro UV-vis del RI

En literatura son diversos los métodos cromatográficos descritos que resultaron efectivos en la determinación de RI los cuales, sin embargo, presentan cierta complejidad en sus condiciones experimentales al emplear mezclas de varios solventes como fase móvil,<sup>100</sup> eluciones en gradiente,<sup>101</sup> agregados de varias y diversas sales en el buffer fosfato (además de las necesarias para la elaboración del buffer fosfato en sí mismo)<sup>97,102</sup> y ajustes de pH.<sup>103</sup>

En este trabajo, y bajo las condiciones descritas en la sección 2.4.1.1 se desarrolló un método simple y efectivo para la determinación y cuantificación de RI, empleando como fase móvil una mezcla 75:25 de buffer fosfato: metanol, la cual a su vez presenta en su composición un reactivo de par iónico (bromuro de tetrabutil amonio) en una concentración de 5 mM en el buffer fosfato. De esta manera, las condiciones de trabajo resultan sencillas y el método es asequible a la gran mayoría de laboratorios al emplear reactivos relativamente comunes.

A partir del método descrito, se obtuvo para las soluciones de RI el siguiente perfil cromatográfico:

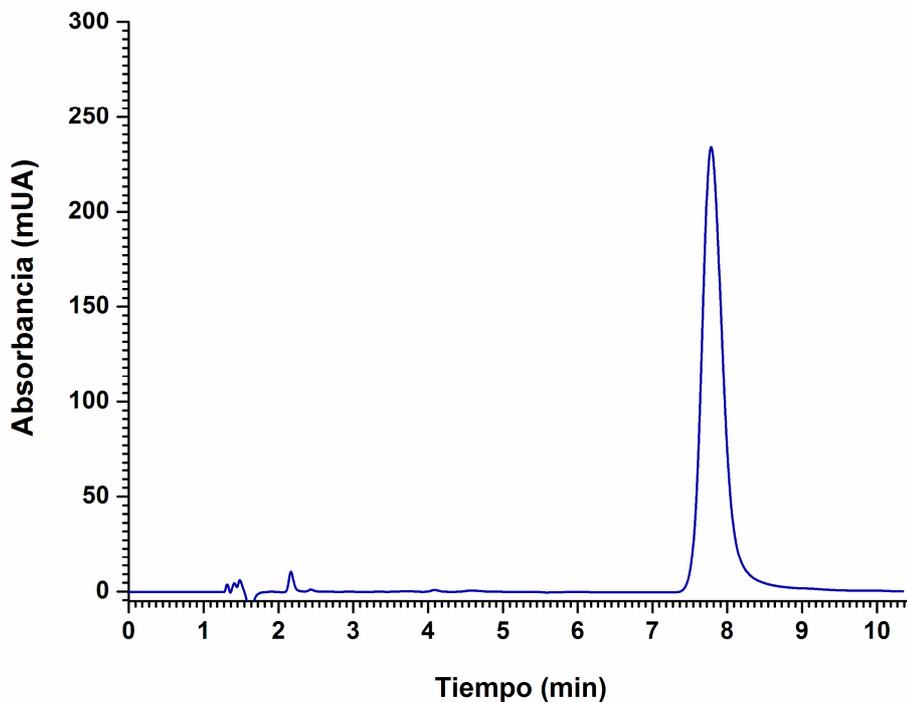


Figura 3.21: Perfil cromatográfico del RI

El estudio de los tiempos de retención ( $t_r$ ) obtenidos para soluciones estándares evaluados (Tabla 3.17) arrojó un  $t_r = 7,78 \pm 0,03$  min (expresado como media  $\pm$  desviación estándar).

<b>Tiempo de retención</b>	
7,7920	
7,8020	
7,8360	
7,7500	
7,7855	
7,7960	
7,8125	
7,7305	
7,7710	Media $\pm$ Sd = 7,78 $\pm$ 0,03
7,7835	%RSD = 0,4; n = 10

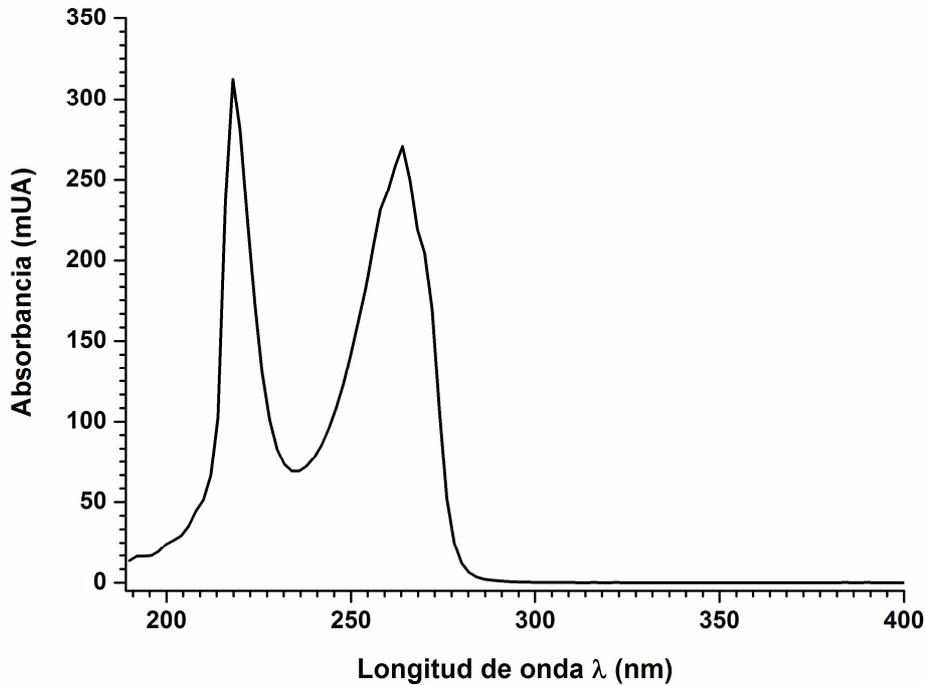
**Tabla 3.17:** Análisis de los tiempos de retención de RI

El análisis del espectro UV-vis en el máximo del pico cromatográfico (Figura 3.22) arrojó un espectro cuya forma fue coincidente con la del espectro de RI determinado en el espectrofotómetro UV-vis (Figura 3.20). Un estudio más

minucioso advirtió que el máximo se encontraba levemente desplazado hacia mayores valores de longitudes de onda: el máximo situado en 262 nm en agua destilada se encuentra en 264 nm en el espectro determinado en la fase móvil del método HPLC. Similar situación determinaron M. I. Walsh y colaboradores<sup>99</sup> en su trabajo basado en la complejación de RI con iones  $\text{Cu}^{+2}$ . Estos autores encontraron que si bien el máximo de absorbancia del RI en buffer acético se encontraba en aproximadamente 262 nm, al complejarse con el cobre se modificaba a 264 nm, valor que escogieron como longitud de onda de trabajo.

En el caso particular de este trabajo, y en analogía con lo descrito anteriormente, el corrimiento en la absorción podría adjudicarse a la utilización del reactivo de par iónico: el bromuro de tetrabutilamonio. La finalidad de este reactivo es producir una asociación con el analito para disminuir su retención en la columna -fenómeno que provocaría en el cromatograma un efecto de *tailing* o coleo del pico- y es ampliamente empleado en los diversos métodos cromatográficos para la determinación de RI que se encuentran en literatura tales como los desarrollados por H.-J. Jia, W. Li y K. Zhao<sup>97</sup> y Dissette y colaboradores<sup>102</sup>, entre otros.

Esta posible asociación entre el reactivo de par iónico y el RI podría ser la responsable de la modificación advertida, mientras que las variaciones en las angulaciones observadas de los picos respecto del espectro de la Figura 3.22 pueden ser debidas a que el espectrofotómetro UV-vis empleado en esta última presentaba una resolución de 1 nm, mientras que la resolución del detector de arreglo de diodos fue de 2 nm.



**Figura 3.22:** Espectro UV-vis del RI en el máximo del pico cromatográfico obtenido mediante el detector de arreglo de diodos de un equipo HP 1100

#### 3.4.1.2 Parámetros cromatográficos

El estudio de los parámetros cromatográficos del método se llevó a cabo con el objetivo de determinar la existencia de error en el método y advertir si éste puede afectar los resultados obtenidos. A continuación se presenta la tabla de mérito del método en la cual se resumen los resultados obtenidos para los siguientes parámetros: desviación estándar relativa (%RSD), rango lineal de concentración (RLC), ordenada al origen de la recta de calibración  $\pm$  desviación estándar ( $a \pm Sd$ ), intervalo de confianza para la ordenada al origen (% confianza)(ICa (95%)), pendiente de la recta de calibración  $\pm$  desviación estándar ( $b \pm Sd$ ), intervalo de confianza para la pendiente (% confianza)(ICb (95%)), coeficiente de determinación de la recta de calibración ( $r^2$ ), Límite de detección (Ld), Límite de cuantificación (Lc) y porcentaje de recuperación (%R).

PARÁMETRO	RESULTADO
%RSD	0,4
RLC ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	4,36 – 87,14
$a \pm Sd$	$-78,70 \pm 25,82$
ICa (95%)	-138,20 a -19,16
$b \pm Sd$	$55,16 \pm 0,48$
ICb (95%)	54,05 a 56,28
$r^2$	0,9994
Ld ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	0,38
Lc ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	1,17
%R(n)	98,0

**Tabla 3.18:** Tabla de Mérito del método cromatográfico

**3.4.1.2.1 Repetibilidad**

A continuación se presenta en la Tabla 3.19 los resultados obtenidos para seis inyecciones consecutivas de una solución estándar de RI de 17 ppm.

INYECCIÓN	ÁREA BAJO LA CURVA
1	853,6
2	856,2
3	852,1
4	857,4
5	857,7
6	850,1
<b>Media</b>	854,5
<b>Sd*</b>	3,1
<b>%RSD</b>	0,4

**Tabla 3.19:** Resultados de los ensayos de repetibilidad

\*Sd: desviación estándar

A partir de la lectura de la tabla anterior puede advertirse que el valor obtenido para el parámetro fue  $\%RSD = 0,4$ , lo cual que permite afirmar que el método consta de suficiente precisión (criterio de aceptación: valor de  $RSD < 2\%$ ). Así, el valor obtenido es concordante con los obtenidos por otros investigadores en la validación de métodos cromatográficos empleando el equipo HP 1100 tal como A. P. P. Cione, M. J. Liberale y P. M. da Silva<sup>104</sup> obtuvieron en la validación de un

método de determinación de nistatina y C. Roy y J. Chakrabarty<sup>105</sup> estimaron en la determinación de metilparabeno, ketoconazol y furoato de mometasona.

#### 3.4.1.2.2 Linealidad

Se evaluó la linealidad del método en el rango comprendido entre 4,3 y 87,1 µg/ml. La correlación de la curva de calibración se determinó mediante la estimación del coeficiente de correlación de Pearson (r) y el coeficiente de determinación ( $R^2 = r^2$ ). Los valores obtenidos para estos fueron los siguientes:

$$r = 0,9997$$

$$R^2 = 0,9994$$

Tras el cálculo de r, fue necesario determinar si éste resultó estadísticamente distinto de cero. Pita Fernández S. y Pértega Díaz S.<sup>106</sup> en su trabajo plantearon que si el valor del coeficiente de correlación de Pearson es mayor que su error multiplicado por el estadístico de tabla correspondiente, entonces el coeficiente es significativo para el valor de confianza seleccionado. Con el objetivo de lograr esa determinación se realizó el test de Student comparando el r obtenido junto con su error estándar en relación al estadístico de tabla para n-2 grados de libertad ( $t_{n-2}$ ), donde n corresponde al número de puntos de la recta. Simplificando lo anteriormente mencionado, el r resultará significativo cuando:

$$r > \sqrt{\frac{1-r^2}{n-2}} \cdot t_{n-2} \quad \text{Ecuación 3.5}$$

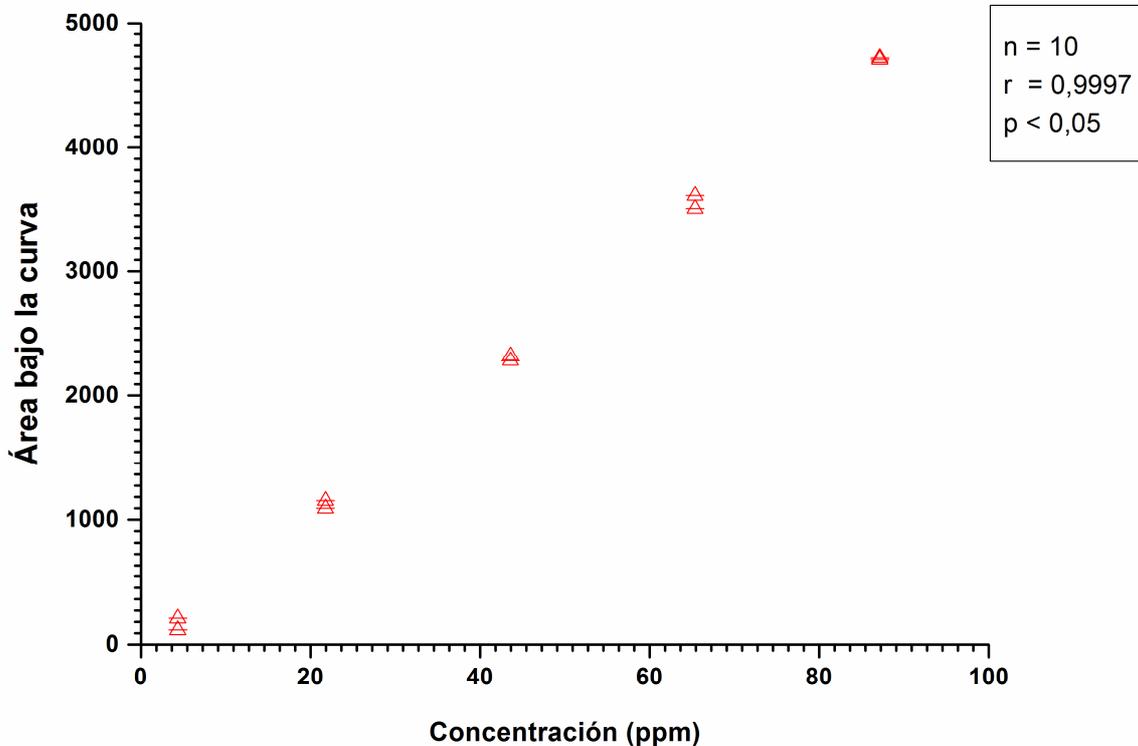
donde:

$$\text{Error estándar de } r = \sqrt{\frac{1-r^2}{n-2}} \quad \text{Ecuación 3.6}$$

reordenando la Ecuación 3.4:

$$r \sqrt{\frac{n-2}{1-r^2}} > t_{n-2} \quad \text{Ecuación 3.7}$$

y llamando  $t_r$  al término de la izquierda, el coeficiente de correlación será significativo cuando  $t_r > t_{n-2}$ . En este caso particular, siendo  $t_r = 115,44$  y  $t_{n-2} = 2,306$  se obtuvo que el coeficiente de correlación fue significativamente distinto de cero para una confianza del 95% ( $p < 0,05$ ). A continuación en la Figura 3.23 se presenta la curva de calibración obtenida:



**Figura 3.23:** Curva de calibración de RI

Fischer<sup>107,108</sup> demostró que la estimación de  $r$  presenta error en muestras pequeñas, lo cual ha dado origen al desarrollo de varios estadísticos con el objeto de corregir dicho error. I. Olkin y J. W. Pratt<sup>109</sup> desarrollaron un estadístico propio

para muestras pequeñas ( $n \leq 20$  aprox.) el cual viene dado por la siguiente fórmula:

$$G(r) = r \left( 1 + \frac{(1-r^2)}{(2n-6)} \right) \quad \text{Ecuación 3.8}$$

En este caso particular, para la curva de calibración obtenida, el valor para el coeficiente de Olkin-Pratt fue  $G(r) = 0,9998$ , lo cual afirma que para la anterior recta se obtuvo una buena correlación lineal.

#### 3.4.1.2.3 Exactitud

La exactitud del método se determinó mediante el cálculo de los porcentajes de recuperación para nueve soluciones de RI a 3 concentraciones distintas. Los resultados se expresan a continuación en la Tabla 3.20:

% AGREGADO	% HALLADO			%R		
	1	2	3	1	2	3
50	52,1	49,4	51,0	104,2	98,8	102,0
100	96,9	95,7	94,7	96,9	95,7	94,7
150	142,8	144,1	142,7	95,2	96,0	95,1
					<b>n</b>	9
					<b>%R(n)<sup>a</sup></b>	98,0
					<b>Sd<sup>b</sup></b>	3,4
					<b>%RSD</b>	3,5

**Tabla 3.20:** Porcentaje de RI recuperado de soluciones con distintos agregados.

<sup>a</sup> Porcentaje de recuperación final, <sup>b</sup> desviación estándar

A partir de los datos obtenidos se procedió a la realización del test de Student para determinar si el porcentaje de Recuperación promedio (%R(n)) experimental (98,0%) es significativamente diferente al 100%. El estadístico empleado fue el siguiente:

$$t = \frac{100 - R}{\frac{RSD}{\sqrt{n}}} \quad \text{Ecuación 3.9}$$

donde,

*R*: porcentaje de Recuperación Promedio %R(n)= 98,0

*RSD*: desviación estándar relativa.

*n*: tamaño muestral.

Si el  $t_{\text{obtenido}}$  es menor al  $t_{\text{tabla}}$ , no existe diferencia significativa entre la media obtenida y el 100%. A partir de la Ecuación 3.9 se determinó que el valor del  $t_{\text{obtenido}}$  fue 1,714, mientras que el tabulado (para 8 grados de libertad y  $\alpha=0,05$ ) corresponde a 2,306. Como  $t_{\text{obtenido}} < t_{\text{tabla}}$ , el método cuenta con exactitud suficiente para su empleo.

#### 3.4.1.2.4 Sensibilidad. Límite de concentración y detección

Los valores del Límite de Detección (Ld) y Límite de Cuantificación (Lc) fueron 0,38  $\mu\text{g/ml}$  y 1,17  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente y se encontraron dentro de lo determinado por otros autores en literatura como por ejemplo M.C. Damle y L. B. Birajdar<sup>103</sup> quienes en su trabajo estimaron los anteriores parámetros en 0,64  $\mu\text{g/ml}$  y 1,95  $\mu\text{g/ml}$ . Otros autores<sup>98,110</sup> han determinado valores inferiores para el Ld y Lc, pero como fue mencionado anteriormente, el presente método presentó buenos límites de detección y cuantificación en relación con la sencillez y facilidad de sus condiciones experimentales.

### 3.4.2 Determinación del porcentaje de carga de la droga en la matriz

La eficiencia de carga de los activos en los sistemas de liberación es un dato imprescindible para llevar a cabo un correcto estudio de los perfiles de liberación, debido a que el hecho de suponer que la masa de droga previamente pesada es la que está presente en el sistema es errónea ya que pueden producirse pérdidas durante el proceso de elaboración del dispositivo. Los porcentajes de masas de RI depositadas en las membranas fueron evaluados mediante el método indirecto descrito en 2.4.2. Como el copolímero es insoluble en buffer fosfato (contrariamente al bifosfonato el cual sí lo es), el método resultó efectivo para la evaluación de la droga cargada en la matriz mediante la determinación de la droga remanente en los recipientes de casteo. La elección de esta forma de medición tuvo su origen en que la determinación directa del RI por pesada de las películas no resultó adecuada al presentar excesivo error aleatorio.

A continuación se presentan los resultados de las masas pesadas y remanentes determinadas para 6 películas (3 para cada relación de concentración), y se presenta, además, el cálculo de la masa depositada por membrana obtenido como la diferencia entre los valores anteriores y la estimación de la concentración real promedio de RI . 2,5H<sub>2</sub>O por película:

3.4 Ensayos de liberación *in vitro*

6% p/p	Masa pesada pre-casteo* (mg)	Masa remanente* (mg)	Masa depositada en la película* (mg)	% Masa depositada en la película respecto a la pesada*
Película 1-6	30,00	0,12	29,88	99,6%
Película 2-6	29,92	0,12	29,80	99,6%
Película 3-6	30,03	0,12	29,91	99,6%
<b>Media ± Sd<sup>a</sup></b>			<b>29,86 ± 0,06</b>	<b>99,6%</b>
<b>% Droga Cargada<sup>b</sup> ± Sd<sup>a</sup></b>			<b>5,97 ± 0,01%</b>	

**Tabla 3.21:** Porcentaje de carga de RI en la matriz para una relación 6% p/p

\* expresada como RI . 2,5H<sub>2</sub>O, redondeo al segundo decimal.<sup>a</sup> desviación estándar <sup>b</sup> % p/p de RI . 2,5H<sub>2</sub>O respecto al copolímero

12% p/p	Masa pesada pre-casteo* (mg)	Masa remanente* (mg)	Masa depositada en la película* (mg)	% Masa depositada en la película respecto a la pesada*
Película 1-12	57,11	0,10	57,01	99,8%
Película 2 -12	59,98	0,22	59,76	99,6%
Película 3-12	60,02	0,11	59,91	99,8%
<b>Media ± Sd<sup>a</sup></b>			<b>58,89 ± 1,63</b>	<b>99,7 ± 0,1%</b>
<b>% Droga Cargada<sup>b</sup> ± Sd<sup>a</sup></b>			<b>11,8 ± 0,3%</b>	

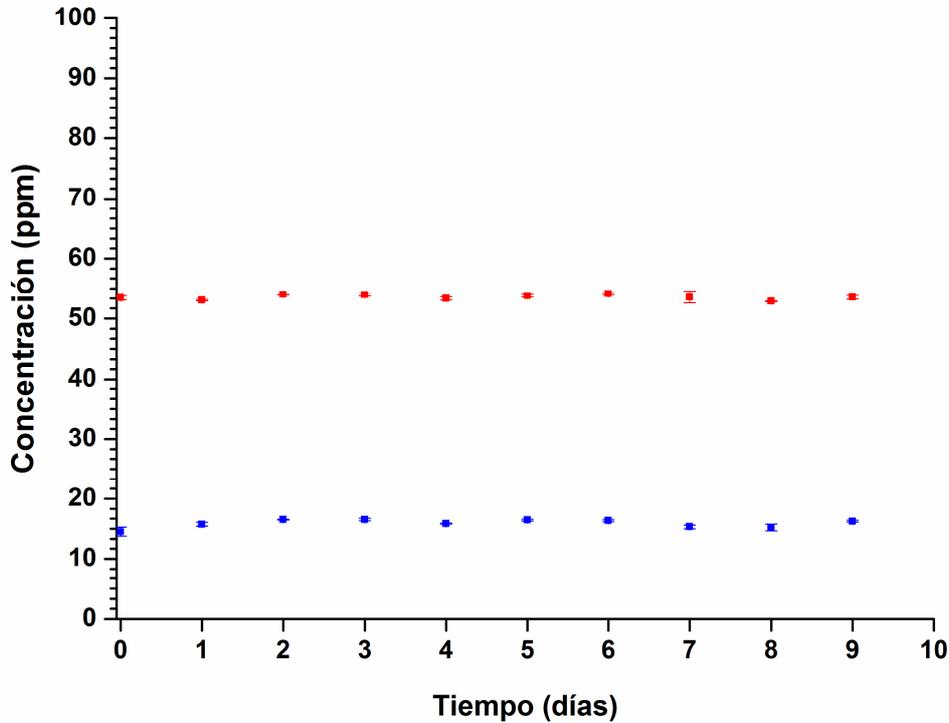
**Tabla 3.22:** Porcentaje de carga de RI en la matriz para una relación 12% p/p

\* expresada como RI . 2,5H<sub>2</sub>O, redondeo al segundo decimal <sup>a</sup> desviación estándar <sup>b</sup> % p/p de RI . 2,5H<sub>2</sub>O respecto al copolímero

### 3.4.3 Estabilidad del RI en solución acuosa

D. Kyriakides e I. Panderi<sup>111</sup> hallaron en sus trabajo que las soluciones estándares de RI preparadas en agua y guardadas a 4 °C en oscuridad resultaron ser estables por varias semanas. Por su parte, A. O. Aluoch<sup>110</sup> estudió la estabilidad de soluciones de RI en buffer (pH= 7,5) almacenadas en refrigerador y a temperatura ambiente simultáneamente durante 3 días, las cuales fueron analizadas diariamente y comparadas con muestras frescas, encontrando que bajo esas condiciones las soluciones del bifosfonato fueron estables en el período evaluado.

En este trabajo, se realizó la determinación de la estabilidad de soluciones de RI en buffer fosfato a 34,0 °C durante 9 días, encontrándose que no existió disminución considerable del título de las dos soluciones patrones evaluadas (Figura 3.24), ni se advirtió la presencia de otras poblaciones en el perfil cromatográfico. Complementariamente, se estudió el espectro UV-vis de cada solución en los distintos días con la finalidad de determinar la existencia de corrimientos de bandas o apariciones de nuevas bandas como resultado de una posible degradación de la muestra.



**Figura 3.24:** Evaluación del título de soluciones de RI sometidas a 34,0 °C durante 9 días

Los espectros UV-vis fueron obtenidos en el máximo cromatográfico mediante el detector de arreglo de diodos y su análisis para las muestras en los distintos días no evidenció la presencia de nuevas bandas o movimiento de las correspondientes al RI (Figura 3.25), demostrando que las soluciones de RI en las condiciones estudiadas fueron estables en el tiempo de estudio.

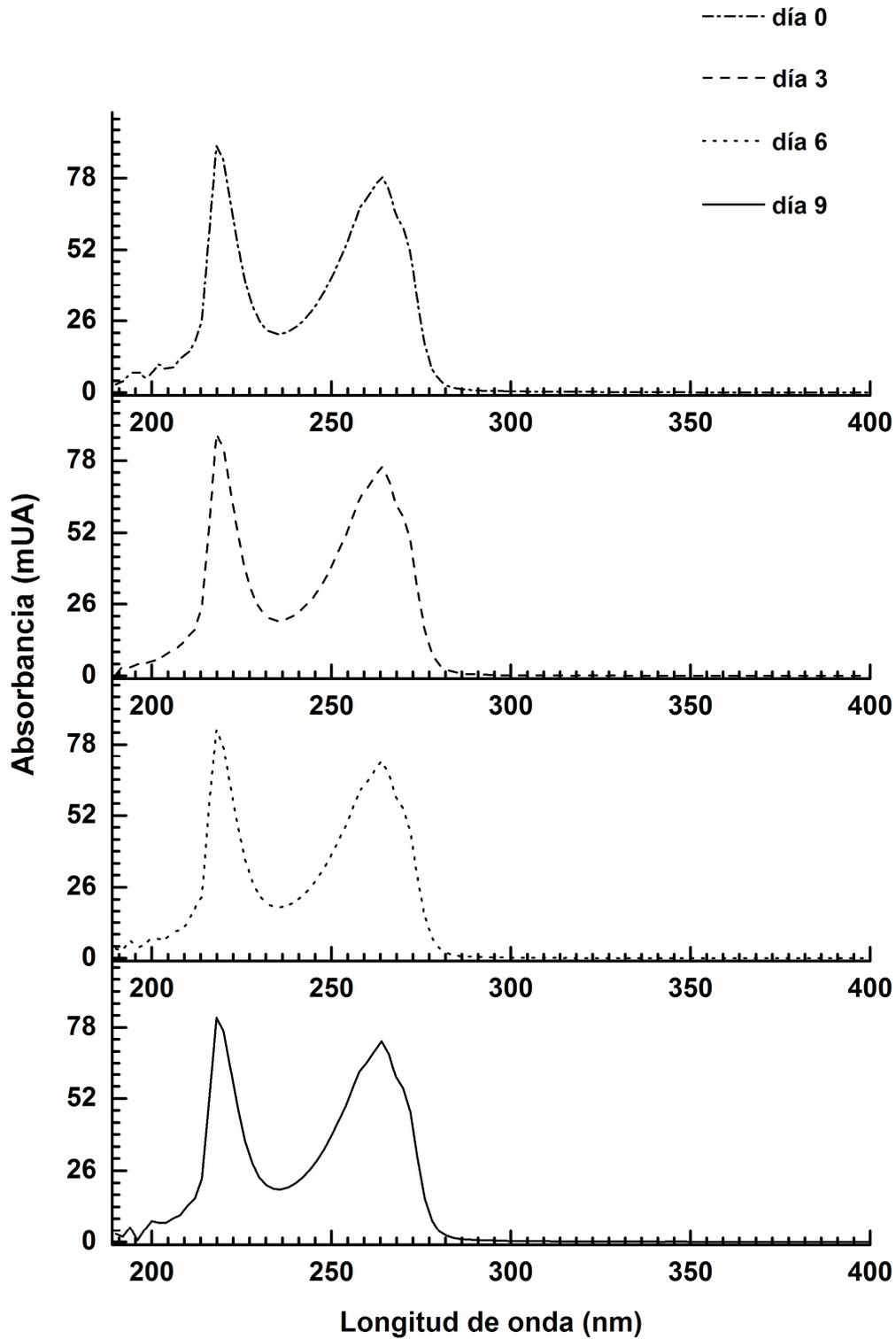
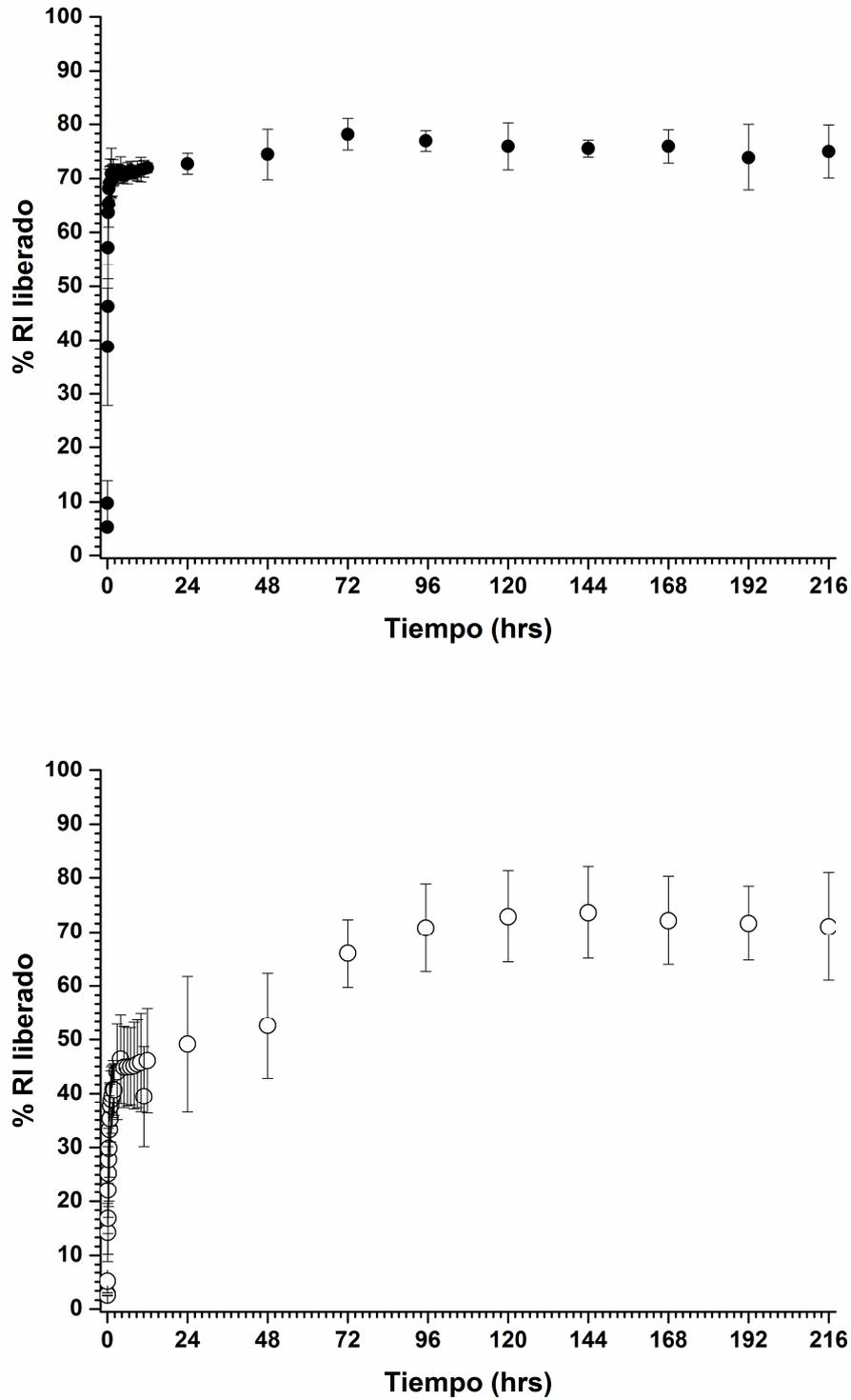
3.4 Ensayos de liberación *in vitro*

Figura 3.25: Espectro UV-vis de una solución de RI sometida a 34,0 °C durante 9 días

### 3.4.4 Perfiles de liberación

Los ensayos de liberación de RI se llevaron a cabo bajo las condiciones presentadas en 2.4.4, se estudiaron los perfiles de liberación y evaluaron el/los mecanismo/s involucrados en el transporte del RI desde la matriz polimérica.

Las curvas de liberación obtenidas exhibieron una rápida liberación inicial alcanzando el *plateau* alrededor de la primera hora para la concentración de 6% p/p y las dos horas para la relación 12% p/p de RI en el copolímero. Este comportamiento con una alta velocidad al comienzo resultó esperado para nuestro sistema, considerando que la matriz no posee ningún tipo de funcionalización química ni agregado de coadyuvante/s en su formulación que regule/n la cinética de liberación. Sin embargo, es remarcable que los datos experimentales, además indicaron que los valores en los porcentajes de liberación para ambas relaciones de concentración fueron de 72,61% para la concentración de 6% p/p y 67,03% para la de 12% p/p (Figura 3.26). Esto indica que no existe una diferencia significativa en los porcentajes de RI liberado a ambas concentraciones y que alrededor de un 30% de RI quedó retenido en la matriz. Esta conclusión acerca de la retención del bifosfonato en el polímero se basó en la previa comprobación de la estabilidad del RI (sección 3.4.3), y la no advertencia de pérdida significativa de droga en el proceso de elaboración de las membranas (sección 3.4.2). Ante esta situación y considerando que la cantidad de droga retenida es considerable (cercano a 1/3 de la masa original), se procedió al análisis de los mecanismos de transporte asociados al proceso de liberación del principio activo desde el polímero a fin de poder hallar una explicación coherente con los fenómenos observados.



**Figura 3.26:** Perfiles de liberación de RI desde membranas elaboradas a partir del copolímero AcV-co-FDO-MO, para las relaciones 6% p/p (arriba) y 12% p/p (abajo)

### 3.4.5. Modelos teóricos

A partir de los datos experimentales obtenidos en los perfiles de liberación del RI, se efectuó el análisis de dichos resultados empleando los distintos modelos teóricos expuestos en la sección 2.4.5 del Capítulo 2 de este trabajo. A continuación se presentan los  $R^2$  y  $R^2_{ajustado}$  del ajuste lineal de los datos experimentales obtenidos con los distintos modelos teóricos:

Modelo	6% p/p		12% p/p	
	$R^2$	$R^2_{ajustado}$	$R^2$	$R^2_{ajustado}$
<b>Cinética de Orden Cero</b>	0,96096	0,90813	0,97773	0,94715
<b>Cinética de primer Orden</b>	0,90628	0,78562	0,92305	0,82243
<b>Modelo de Weibull</b>	0,98628	0,96594	0,98974	0,97448
<b>Modelo de Higuchi</b>	0,93180	0,84189	0,94056	0,86159
<b>Modelo de Ritger-Peppas</b>	0,97309	0,93364	0,98683	0,96728

**Tabla 3.23:** Resultados para los  $R^2$  y  $R^2_{ajustado}$  de las rectas correspondientes a cada modelo teórico

Del análisis de la tabla anterior, puede estimarse que el modelo que presentó la mejor correlación con el comportamiento experimental de liberación de RI desde la matriz fue el Modelo de Weibull, presentando en ambas relaciones de concentración, los valores más elevados para los  $R^2$  y  $R^2_{ajustado}$ . A partir de la rectas

obtenidas para el modelo, se determinaron los valores del parámetro  $b$  de la fórmula correspondiente (Ecuación 2.12) obteniéndose que para 6% p/p el parámetro presentó un valor de  $b = 1,55$ , mientras que para el caso de 12% p/p,  $b = 1,16$ . Según P. Costa y J.M. Sousa Lobo<sup>51</sup> el caso en que  $b > 1$  refieren a una forma sigmoidea con forma de S con curvatura hacia arriba seguida de un punto de inflexión. Por otra parte, V. Papadopoulou y colaboradores<sup>112</sup> relacionaron los valores de  $b > 1$  corresponden al caso de una curva sigmoidea que indica un mecanismo complejo de liberación. Sin embargo, si bien la mejor correlación fue advertida con el Modelo de Weibull, éste ha sido cuestionado en varias ocasiones debido a que presenta ciertas limitaciones. P. V. Pedersen y J.W. Myrick<sup>113</sup> describieron los inconvenientes de este modelo, dentro de los cuales pueden mencionarse el hecho de que la ecuación matemática no posee una base cinética y solo puede emplearse con finalidad descriptiva debido a que no caracteriza la cinética del proceso de liberación. Además, la fórmula no contiene al menos un parámetro relacionado a la velocidad intrínseca de disolución de la droga y presenta un uso limitado para establecer correlaciones *in vitro-in vivo*.

Por otra parte, otro de los modelos evaluados que también presenta una buena correlación para ambas concentraciones y que sí permite obtener información acerca del mecanismo de transporte involucrado en el proceso es el de Ritger-Peppas. Dicha información puede ser estimada a partir del valor del exponente  $n$  de la ecuación matemática correspondiente (Ecuación 2.14). Los valores del exponente calculados resultaron  $n = 1,18$  para la concentración 6% p/p y  $n = 1,05$  para 12% p/p. Para ambos casos  $n > 1$ , lo cual está en relación con el valor estimado en el estudio de hinchamiento realizado en 3.3.2.3 y refieren al caso de transporte denominado Super Caso II, cuyo fundamento ya ha sido expuesto en las secciones 2.4.5.5 y 3.3.2.3 e involucra en su desarrollo un proceso de plastificación como consecuencia de una disminución de las fuerzas atractivas entre las cadenas del polímero, lo cual resulta en un aumento en la movilidad de éstas.<sup>55</sup> Este mecanismo complejo de transporte también se ha observado en literatura<sup>114, 115</sup> en otros sistemas de liberación transdérmicos.

Considerando los factores mecanísticos involucrados en el fenómeno de transporte del sistema estudiado, una posible explicación sobre la porción de droga retenida en la matriz podría encontrarse en suponer que el aumento en el movimiento de las cadenas poliméricas (teniendo en cuenta además las ramificaciones presentes en ellas por lo expuesto en 3.2.1) sumado a la naturaleza hidrofóbica del copolímero (consecuencia de la presencia de unos considerablemente largos grupos pendientes) puede llevar a que las cadenas del polímero produzcan la formación de agregados que darían origen a un sistema hidrofóbico en cuyo interior se podría encontrarse la droga retenida. La hidrofobicidad de estos agregados no permitiría la penetración de agua y por ende la disolución y difusión de la droga hacia el exterior de la matriz. Esta suposición podría eventualmente corroborarse mediante el análisis morfológico de las membranas a distintos tiempos de liberación a través de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y/o Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).

Por otra parte, es necesario el estudio de los perfiles de liberación a mayores tiempos a fin de establecer si esa porción de RI es efectivamente liberado; y de ser así, esta propiedad podría resultar de suma importancia al presentar el copolímero un mecanismo propio de regule de la dosis de droga, el cual a su vez, podría ser ajustado mediante posteriores modificaciones.

Finalmente, y con vistas a otras aplicaciones, esta posible característica del copolímero también lo convierte en un material factible de ser empleado en la formación de micelas y agregados, por ejemplo, a partir de la síntesis de copolímeros de bloque.

## CAPÍTULO 4

# CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

En este trabajo se ha realizado satisfactoriamente la síntesis del fumarato de di-2-octilo (FDO), un monómero con grandes cadenas laterales en su estructura, cuyas propiedades lo convierten en un excelente candidato para el reemplazo de ésteres acrílicos en la síntesis de materiales en la elaboración de parches transdérmicos.

A partir de este monómero, se llevaron a cabo reacciones de copolimerización con AcV tanto en condiciones convencionales empleando energía de microondas, como en solución mediante la técnica de polimerización controlada RAFT. Las primeras han permitido obtener una familia de copolímeros dentro de los cuales uno de ellos (AcV-co-FDO-MO-3) presentó promisorias características para ser empleado en el campo de aplicación esperado.

Respecto a las reacciones de polimerización controlada, se ha podido demostrar que ésta es aplicable a la copolimerización de acetato de vinilo con FDO, empleando como agente de transferencia de cadena un xantato obtenido con alto rendimiento en una sencilla síntesis. Además, el hecho de que haya sido posible la aplicación de este tipo de copolimerización en el impedido estéricamente monómero fumárico FDO, permite suponer que la técnica sería factible de aplicar a otros monómeros fumáricos de estructuras más sencillas.

Ciertos copolímeros fueron seleccionados y con ellos se elaboraron membranas cuyas apariencia, morfología y adhesión fueron estudiadas, advirtiéndose que para el caso de las obtenidas con el AcV-co-FDO-MO-3, los resultados observados fueron coincidentes con los esperados para copolímeros empleados en estos sistemas, pudiéndose comparar el material obtenido con copolímeros comerciales. A su vez, se evaluó la liberación de una droga osteogénica (el RI) desde las anteriores matrices obteniéndose que la misma efectivamente es liberada de la matriz.

Con el objetivo de cuantificar el RI liberado a partir de las matrices elaboradas, se desarrolló un método de cuantificación cromatográfico simple y

efectivo empleando HPLC. Los parámetros del método fueron evaluados y los alcances y límites del método en la determinación de RI fueron establecidos.

De esta forma, el material obtenido es una promisoriosa base para el reemplazo de los copolímeros acrílicos comerciales actuales, por lo que su empleo en la elaboración de parches transdérmicos puede optimizarse a futuro tanto para la liberación de RI como la de otras drogas.

Por último, la síntesis del copolímero fumárico obtenido en el presente trabajo de tesis puede servir de base para futuros desarrollos basados en este tipo de monómeros con posibles variaciones en su funcionalidad, a fin de facilitar su afinidad de otro tipo de drogas que difieran en su polaridad.

## REFERENCIAS

## REFERENCIAS

(1) Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur. J. Dermatol.* **2002**, *12*(4), 390-399.

(2) Lai-Cheong, J. E.; McGrath, J. A. Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine.* **2013**, *41*(6), 317-320.

(3) Hadgraft, J. Skin, the final frontier. *Int. J. Pharm. (Amsterdam, Neth.).* **2001**, *224*(1-2), 1-18.

(4) Darlenski, R.; Kazandjieva, J.; Tsankov, N. SKIN BARRIER FUNCTION: MORPHOLOGICAL BASIS AND REGULATORY MECHANISMS. *J Clin Med.* **2011**, *4*(1), 36-45.

(5) Paudel, K. S.; Milewski, M.; Swadley, C. L.; Brogden, N. K.; Ghosh, P.; Stinchcomb, A. L. Challenges and opportunities in dermal/transdermal delivery. *Ther. Delivery* **2010**, *1*(1), 109-131.

(6) Brown, M.B.; Martin, G.P.; Jones, S.A.; Akomeah, F.K. Dermal and transdermal drug delivery systems: current and future prospects. *Drug Delivery.* **2006**, *13*(3):175-187.

(7) Ramachandran, C.; Fleisher, D. Transdermal delivery of drugs for the treatment of bone diseases. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2000**, *42*(3), 197-223.

(8) Valenta, C.; Auner, B.G. The use of polymers for dermal and transdermal delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *58*(2), 279-89.

(9) Sugibayashi, K.; Morimoto, Y. Polymers for transdermal drug delivery systems. *J. Controlled Release.* **1994**, *29*(1-2), 177-185.

(10) Allevato, M.A. Sistemas terapéuticos transdérmicos. *Act Terap Dermatol.* **2007**, *30*(3), 154-165.

(11) Banerjee, S.; Chattopadhyay, P.; Ghosh, A.; Datta, P.; Veer, V. Aspect of adhesives in transdermal drug delivery systems. *Int. J. Adhes. Adhes.* **2014**, *50*, 70-84.

(12) Tan, H.S.; Pfister, W.R. Pressure-sensitive adhesives for transdermal drug delivery systems. *Pharm. Sci. Technol. Today.* **1999**, *2*(2), 60-69.

- (13) Kandavilli S, Nair V, Panchagnula R. Polymers in transdermal drug delivery systems. *Pharm. Technol.* **2002**, *26*(5), 62–80.
- (14) López, F.J. New approaches to the treatment of osteoporosis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*(4), 383-393.
- (15) Black, D.M.; Delmas, P.D.; Eastell, R.; Reid, I.R.; Boonen, S.; Cauley, J.A.; Cosman, F.; Lakatos, P.; Leung, P.C.; Man, Z.; Mautalen, C.; Mesenbrink, P.; Hu, H.; Caminis, J.; Tong, K.; Rosario-Jansen, T.; Krasnow, J.; Hue, T.F.; Sellmeyer, D.; Eriksen, E.F.; Cummings, S.R.; HORIZON Pivotal Fracture Trial. Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* **2007**, *356*(18), 1809-1822.
- (16) Black, D.M.; Cummings, S.R.; Karpf, D.B.; Cauley, J.A.; Thompson, D.E.; Nevitt, M.C.; Bauer, D.C.; Genant, H.K.; Haskell, W.L.; Marcus, R.; Ott, S.M.; Torner, J.C.; Quandt, S.A.; Reiss, T.F.; Ensrud, K.E. Randomised trial of effect of alendronate on risk of fracture in women with existing vertebral fractures. Fracture Intervention Trial Research Group. *Lancet.* **1996**, *348*(9041), 1535-1541.
- (17) Russell, R.G.; Rogers, M.J. Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. *Bone.* **1999**, *25*(1), 97-106.
- (18) Siris, E.S.; Chines, A.A.; Altman, R.D.; Brown, J.P.; Johnston, C.C.Jr; Lang, R.; McClung, M.R.; Mallette, L.E.; Miller, P.D.; Ryan, W.G.; Singer, F.R.; Tucci, J.R.; Eusebio, R.A.; Bekker, P.J. Risedronate in the treatment of Paget's disease of bone: an open label, multicenter study. *J. Bone Miner. Res.* **1998**, *13*(6), 1032-1038.
- (19) van Holten-Verzantvoort, A.T.; Bijvoet, O.L.; Cleton, F.J.; Hermans, J.; Kroon, H.M.; Harinck, H.I.; Vermey, P.; Elte, J.W.; Neijt, J.P.; Beex, L.V.; Blijham, G. Reduced morbidity from skeletal metastases in breast cancer patients during long-term bisphosphonate (APD) treatment. *Lancet.* **1987**, *2*(8566), 983-985.
- (20) Montalvetti, A.; Bailey, B.N.; Martin, M.B.; Severin, G.W.; Oldfield, E.; Docampo, R. Bisphosphonates are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* farnesyl pyrophosphate synthase. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*(36), 33930-33937.
- (21) Garzoni, L.R.; Caldera, A.; Meirelles, M. de N.; de Castro, S.L.; Docampo, R.; Meints, G.A.; Oldfield, E.; Urbina, J.A. Selective in vitro effects of the farnesyl pyrophosphate synthase inhibitor risedronate on *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **2004**, *23*(3), 273-285.

- (22) Lin, J.H. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. *Bone*. **1996**, *18*(2), 75-85.
- (23) Cordes, G.; Santoro, A.; Setnikar, I. Sistemas de suministro de fármacos para el tratamiento de enfermedades cardíacas. Oficina Española de Patentes y marcas ES 2 138 945 T3, Año 2002.
- (24) Rodríguez, R.; Daza, P.; Rodríguez, M. F. Uso de buprenorfina transdérmica en el alivio del dolor por cáncer. *Revista Colombiana de Anestesiología*. **2006**, *34*, 253-257.
- (25) Marty, J.P.; New trends in transdermal technologies: development of the skin patch, Menorest. *Int. J. Gynecol. Obstet.* **1996**, *52* (Suppl 1):S, 17-20.
- (26) Mendelsohn, C.P.; Richmond, R.L. The nicotine patch: Guidelines for practical use. *Modern Medicine of Australia*. **1994**, *37*(3), 105-112.
- (27) Kusamori, K.; Katsumi, H.; Abe, M.; Ueda, A.; Sakai, R.; Hayashi, R.; Hirai, Y.; Quan, Y.S.; Kamiyama, F.; Sakane, T.; Yamamoto, A. Development of a novel transdermal patch of alendronate, a nitrogen-containing bisphosphonate, for the treatment of osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.* **2010**, *25*(12), 2582-2591.
- (28) Choi, A.; Gang, H.; Chun, I.; Gwak, H. The effects of fatty acids in propylene glycol on the percutaneous absorption of alendronate across the excised hairless mouse skin. *Int. J. Pharm. (Amsterdam, Neth.)* **2008**, *357*(1-2), 126-131.
- (29) Dunn, C.J.; Goa, K.L. Risedronate. A Review of its Pharmacological Properties and Clinical Use in Resorptive Bone Disease. *Drugs*. **2001**, *61*(5), 685-712.
- (30) Cortizo, M.; Alessandrini, J.; Etcheverry, S.; Cortizo, A. A Vanadium/Aspirin Complex Controlled Release Using A Poly( $\beta$ - Propiolactone) Film. Effects On Osteosarcoma Cells. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **2001**, *12*(9), 945-959.
- (31) Cortizo, M. Polymerization of diisopropyl fumarate under microwave irradiation. *J. Appl. Polym. Sci.* **2006**, *103*(6), 3785-3791.
- (32) Furniss, B.S.; Hannaford, A. J.,; Smith, P. W. G.; Tatchell, A.R.: *Vogel's Textbook of Practical Chemistry*,. 5th ed.; Longman Scientific & Technical : Harlow, England, 1989; pp 695-697.

- (33) Cortizo, M. S. Síntesis y caracterización de homo y copolímeros de fumarato de diisopropilo. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata, Argentina, Abril 1992.
- (34) Fleet, R. RAFT mediated polysaccharide copolymers. M.S. Thesis, University of Stellenbosch, Diciembre 2006.
- (35) West, R. C.; Selby, S. M. *Handbook of Chemistry and Physics*, 48th ed.; The Chemical Rubber Co: Cleveland, OH, 1967.
- (36) Oberti, T.; Schiavoni, M.; Cortizo, M. Structure and properties of poly(benzyl acrylate) synthesized under microwave energy. *Radiat. Phys. Chem.* **2008**, 77(5), 597-604.
- (37) Armarego, W. L. F.; Perrin, D. D. *Purification Of Laboratory Chemicals*, 4th ed.; Butterworth Heinemann: Oxford, Reino Unido, 1997; p. 105.
- (38) Cortizo, M.; Andretta, H.; Figini, R. Molecular characterization of poly(diisopropyl fumarate) by the absolute calibration method in molecular exclusion chromatography (GPC). *J. High Resolut. Chromatogr.* **1989**, 12(6), 372-374.
- (39) Armarego, W. L. F.; Perrin, D. D. *Purification Of Laboratory Chemicals*, 4th ed.; Butterworth Heinemann: Oxford, Reino Unido, 1997; p. 97.
- (40) Mukherjee, B.; Mahapatra, S.; Gupta, R.; Patra, B.; Tiwari, A.; Arora, P. A comparison between povidone-ethylcellulose and povidone-eudragit transdermal dexamethasone matrix patches based on in vitro skin permeation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2005**, 59(3), 475-483.
- (41) Redding, B. K. Jnr. TRANSDERMAL DELIVERY DEVICE DESIGN. *ONdrugDelivery*. **2014**, No 49,8-9.
- (42) Hammond, F. H. Tack. In *Handbook of Pressure Sensitive Adhesive Technology*, 2nd ed., Satas, D. Ed.; Van Nostrand Reinhold : New York, 1989; pp 38-60.
- (43) Minghetti, P.; Cilurzo, F.; Montanari, L. Evaluation of Adhesive Properties of Patches Based on Acrylic Matrices. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1999**, 25(1), 1-6.
- (44) Ritger, P; Peppas, N. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *J. Controlled Release.* **1987**, 5(1), 23-36.

- (45) Srinivasa Rao, V. N. D.; Dandala, R.; Lenin, R.; Sivakumaran M.; Shivashankar, S.; Naidu, A. A facile one pot synthesis of bisphosphonic acids and their sodium salts from nitriles. *ARKIVOC (Gainesville, FL, U. S.)* **2007**, *14*, 34-38.
- (46) *PRODUCT MONOGRAPH: ACTONEL® Risedronate Sodium (as the hemi-pentahydrate) Tablets, USP 5 mg, 30 mg, 35 mg, 75 mg and 150 mg. ACTONEL DR® Risedronate Sodium (as the hemi-pentahydrate) Delayed-Release Tablets 35 mg.*; Warner Chilcott Canada Co. : Mississauga, Ontario, Canada, p27. Last revision date: January 2, 2015. Submission Control No: 163765. Disponible en: <http://www.actavis.ca/NR/rdonlyres/CD207B34-2C64-41B4-B801-B2C04223C12A/0/ActonelActonelDRrev1July32013.pdf>
- (47) Lei, L.; Li, L.; Zhang, L.; Chen, D.; Tian, W. Structure and performance of nano-hydroxyapatite filled biodegradable poly((1,2-propanediol-sebacate)-citrate) elastomers. *Polym. Degrad. Stab.* **2009**, *94*(9), 1494-1502.
- (48) Vitorino, C.; Carvalho, F.; Almeida, A.; Sousa, J.; Pais, A. The size of solid lipid nanoparticles: An interpretation from experimental design. *Colloids Surf., B.* **2011**, *84*(1), 117-130.
- (49) Benedict, F. Skin Temperature and Heat Loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1925**, *11*, 549-552.
- (50) Shaikh, H. K.; Kshirsagar, R. V.; Patil, S. G. MATHEMATICAL MODELS FOR DRUG RELEASE CHARACTERIZATION: A REVIEW. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* **2015**, *4*(4), 324-338.
- (51) Costa, P; Sousa Lobo, J. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, *13*(2), 123-133.
- (52) Costa, P; Sousa Lobo, J. Evaluation of Mathematical Models Describing Drug Release from Estradiol Transdermal Systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2003**, *29*(1), 89-97.
- (53) Higuchi, T. Rate of Release of Medicaments from Ointment Bases Containing Drugs in Suspension. *J. Pharm. Sci.* **1961**, *50*, 874-875.
- (54) Ritger, P.; Peppas, N. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *J. Controlled Release.* **1987**, *5*(1), 37-42.

- (55) Llabot, J.; Manzo, R.; Allemandi, D. Drug release from carbomer:carbomer sodium salt matrices with potential use as mucoadhesive drug delivery system. *Int. J. Pharm. (Amsterdam, Neth.)*. **2004**, 276(1-2), 59-66.
- (56) Cortizo, M.; Laurella, S.; Alessandrini, J. Microwave-assisted radical polymerization of dialkyl fumarates. *Radiat. Phys. Chem.* **2007**, 76(7), 1140-1146.
- (57) Harrisson, S.; Liu, X.; Ollagnier, J.-N.; Coutelier, O.; Marty, J.-D.; Destarac, M. RAFT Polymerization of Vinyl Esters: Synthesis and Applications. *Polymers (Basel, Switz.)* **2014**, 6(5), 1437-1488.
- (58) Perrier, S.; Takolpuckdee, P. Macromolecular design via reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT)/xanthates (MADIX) polymerization. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2005**, 43(22), 5347-5393.
- (59) Stenzel, M.; Cummins, L.; Roberts, G.; Davis, T.; Vana, P.; Barner-Kowollik, C. Xanthate Mediated Living Polymerization of Vinyl Acetate: A Systematic Variation in MADIX/RAFT Agent Structure. *Macromol. Chem. Phys.* **2003**, 204(9), 1160-1168.
- (60) Nicolaÿ, R.; Kwak, Y.; Matyjaszewski, K. Synthesis of poly(vinyl acetate) block copolymers by successive RAFT and ATRP with a bromoxanthate iniferter. *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2008**, (42), 5336-5338.
- (61) Odian, G. Capítulo 3: RADICAL CHAIN POLYMERIZATION. *PRINCIPLES OF POLYMERIZATION*, 4th ed.; Wiley-Interscience: Hoboken, NJ, 2004; pp 198-349.
- (62) Otsu, T.; Matsumoto, A.; Shiraishi, K.; Amaya, N.; Koinuma, Y. Effect of the substituents on radical copolymerization of dialkyl fumarates with some vinyl monomers. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **1992**, 30(8), 1559-1565.
- (63) Oberti, T. G.; Cortizo, M. S.; Alessandrini, J. L. Novel Copolymer of Diisopropyl Fumarate and Benzyl Acrylate Synthesized Under Microwave Energy and Quasielastic Light Scattering Measurements. *J. Macromol. Sci., Part A: Pure Appl. Chem.* **2010**, 47(7), 725-731.
- (64) Czech, Z.; Milker, R. Development trends in pressure-sensitive adhesive systems. *Mater. Sci.-Pol.* **2005**, 23(4), 1015-1022.

(65) Heath, D. E.; Cooper, S. L. Capítulo I.2.2 - Polymers: Basic Principles. En *Biomaterials Science*, 3rd ed.; B. D. Ratner, B.D.; Hoffman, A. S.; Schoen, F. J.; Lemons, J. E., Eds.; Academic Press, 2013, pp 64-79.

(66) Otsu, T.; Ito, O.; Toyoda, N.; Mori, S. Polymers from 1,ZDisubstituted Ethylenic Monomers, 2a) Homopolymers from Dialkyl Fumarates by Radical Initiator *Makromol. Chem., Rapid Commun.* **1981**, *2*(12), 725-728.

(67) Heatley, F.; Lovell, P.; Yamashita, T. Chain Transfer to Polymer in Free-Radical Solution Polymerization of 2-Ethylhexyl Acrylate Studied by NMR Spectroscopy. *Macromolecules (Washington, DC, U. S.)*. **2001**, *34*(22), 7636-7641.

(68) Britton, D.; Heatley, F.; Lovell, P. Chain Transfer to Polymer in Free-Radical Bulk and Emulsion Polymerization of Vinyl Acetate Studied by NMR Spectroscopy. *Macromolecules (Washington, DC, U. S.)*. **1998**, *31*(9), 2828-2837.

(69) Díaz-Ortiz, A.; de la Hoz, A.; Alcázar, J.; Carrillo, J.; Herrero, M.A.; de Mata Muñoz, J.; Prieto, P.; de Cózar, A. Capítulo 7: Reproducibility and Scalability of Microwave-Assisted Reactions, en: *Microwave Heating*; Dr .Chandra, U., Ed.; InTech: Europe, 2011. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/microwave-heating/reproducibility-and-scalability-of-microwave-assisted-reactions>

(70) Leonelli, C.; Veronesi, P. Capítulo 2: Microwave Reactors for Chemical Synthesis and Biofuels Preparation. En *Production of Biofuels and Chemicals with Microwave*; Fang, Z.; Smith, R. L.Jr.; Qi, X., Eds.; Springer : Dordrecht, Netherlands, 2015; pp 17-40.

(71) Moad, G.; Barner-Kowollik, C. Capítulo 3: The Mechanism and Kinetics of the RAFT Process: Overview, Rates, Stabilities, Side Reactions, Product Spectrum and Outstanding Challenges. In *Handbook of RAFT Polymerization*; Barner-Kowollik, C. Ed.; Hoboken, NJ: Wiley-VCH, 2004; pp 51-104.

(72) Marrière, E; Chevré, D.; Metzner, P. First synthesis of sulfines by direct oxidation of xanthates. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1997**, (14), 2019-2020.

(73) Guinaudeau, A.; Mazières, S.; Wilson, D. J.; Destarac, M. Aqueous RAFT/MADIX polymerization of N-vinyl pyrrolidone at ambient temperature. *Polym. Chem. Polym. Chem.*, **2012**, *3*(1), 81-84.

(74) Guinaudeau, A.; Coutelier, O.; Sandeau, A.; Mazières, S., Nguyen Thi, H. D.; Le Drogo, V.; Wilson, D. J.; Destarac, M. Facile Access to Poly(N-vinylpyrrolidone)-Based Double

Hydrophilic Block Copolymers by Aqueous Ambient RAFT/MADIX Polymerization. *Macromolecules (Washington, DC, U. S.)* **2013**, *47*(1):41–50.

(75) Favier, A.; Charreyre, M. Experimental Requirements for an Efficient Control of Free-Radical Polymerizations via the Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT) Process. *Macromol. Rapid Commun.* **2006**, *27*(9), 653-692.

(76) Moad, G.; Chiefari, J.; Chong, (Bill) Y.K.; Krstina, J.; Mayadunne, R.; Postma, A.; Rizzardo, E.; Thang, S. Living free radical polymerization with reversible addition - fragmentation chain transfer (the life of RAFT). *Polym. Int.* **2000**, *49*(9), 993-1001.

(77) Beck, S. A. Copolymerizing Acrylonitrile and Methyl Acrylate by RAFT for Melt Processing Applications: A Synthetic Investigation of the Effects of Chain Transfer Agent, Initiator, Temperature, and Solvent. M.S. Thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University, Marzo 2014.

(78) Rizzardo, E.; Chiefari, J.; Chong, B.; Ercole, F.; Krstina, J.; Jeffery, J.; Le, T.; Mayadunne, R.; Meijs, G.; Moad, C.; Moad, G.; Thang, S. Tailored polymers by free radical processes. *Macromol. Symp.* **1999**, *143*(1), 291-307.

(79) Finch, C.A. Ed. *Polyvinyl alcohol: properties and applications*; Wiley: London, 1973; pp. 377-378.

(80) Ma, X.; Taw, J.; Chiang, C. Control Of Drug Crystallization In Transdermal Matrix System. *Int. J. Pharm. (Amsterdam, Neth.)* **1996**, *142*(1), 115-119.

(81) Kim, J.H.; Choi, H.K. Effect of additives on the crystallization and the permeation of ketoprofen from adhesive matrix. *Int. J. Pharm. (Amsterdam, Neth.)* **2002**, *236*(1-2), 81-85.

(82) Cilurzo, F.; Gennari, C.G.; Minghetti, P. Adhesive properties: a critical issue in transdermal patch development. *Expert Opin. Drug Delivery.* **2012**, *9*(1), 33-45.

(83) Feldstein, M. M.; Dormidontovad, E. E.; Khokhlova, A. R. Pressure sensitive adhesives based on interpolymer complexes. *Prog. Polym. Sci.* **2015**, *42*; 79–153.

(84) Ganji, F.; Vasheghani-Farahani, S.; Vasheghani-Farahani, E. Theoretical description of hydrogel swelling: a review. *Iran. Polym. J.* **2010**, *19*(5), 375–398.

- (85) Lowman, A.M. Smart Pharmaceuticals, [www.gatewaycoalition.org/files/NewEH/htmls/lowman.doc](http://www.gatewaycoalition.org/files/NewEH/htmls/lowman.doc), 7 September 2008.
- (86) Redman-Furey, N.; Dicks, M.; Bigalow-Kern, A.; Cambron, R.T.; LUBEY, G.; Lester, C.; Vaughn, D. Structural and analytical characterization of three hydrates and an anhydrate form of risedronate. *J Pharm Sci.* **2005**, *94*(4), 893-911.
- (87) Beasley, M.M.; Eric J. Bartelink; E.J.; Taylor, L.; Miller, R.M. Comparison of transmission FTIR, ATR, and DRIFT spectra: implications for assessment of bone bioapatite diagenesis. *J. Archaeol. Sci.* **2014**, *46*, 16-22.
- (88) Finnin, B.C.; Morgan, T.M. Transdermal penetration enhancers: applications, limitations, and potential. *J. Pharm. Sci.* **1999**, *88*(10), 955-958.
- (89) Nam, S.H.; Xu, Y.J.; Nam, H.; Jin, G.W.; Jeong, Y.; An, S.; Park, J.S. Ion pairs of risedronate for transdermal delivery and enhanced permeation rate on hairless mouse skin. *Int. J. Pharm. (Amsterdam, Neth.)*, **2011**, *419*(1-2), 114-20.
- (90) Carraher Jr, C. Capítulo 3: Molecular Weight of Polymers *Carraher's Polymer Chemistry*, 9th ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 2013; pp 57-96.
- (91) Huang, J.; Wigent, R.J.; Schwartz, J.B. Drug-Polymer interaction and its significance on the physical stability of nifedipine amorphous dispersion in microparticles of an ammonio methacrylate copolymer and ethylcellulose binary blend. *J. Pharm. Sci.*, **2008**, *97*(1), 251-262.
- (92) Gordon, M.; Taylor, J. S. Ideal copolymers and the second-order transitions of synthetic rubbers. i. non-crystalline copolymers. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1952**, *2*(9), 493-500.
- (93) Couchman, P. R.; Karasz, F. E. A Classical Thermodynamic Discussion of the Effect of Composition on Glass-Transition Temperatures. *Macromolecules*, **1978**, *11*(1), pp 117-119.
- (94) Zhang, G. G. Z.; Zhou, D. Capítulo 2: Crystalline and Amorphous Solids. En *Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice.*, 1ra ed.; Qiu, Y.; Chen, Y.; Zhang, G. G. Z.; Liu, L.; Porter, W. R., Eds.; ACADEMIC PRESS : Amsterdam, 2009, pp 25-60.

- (95) Li, Y.; Pang, H.; Guo, Z.; Lin, L.; Dong, Y.; Li, G.; Lu, M.; Wu, C. Interactions Between Drugs And Polymers Influencing Hot Melt Extrusion. *J. Pharm. Pharmacol.* **2013**, *66*(2), 148-166.
- (96) Swami, A. S.; Pishawikar, S. A.; More, H. N. DEVELOPMENT AND VALIDATION OF STABILITY INDICATING UV SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR THE ESTIMATION OF SODIUM RISEDRONATE. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2012**, *4*(3), 587-590.
- (97) Jia, H.-J.; Li, W.; Zhao, K. Determination of risedronate in rat plasma samples by ion-pair high-performance liquid chromatography with UV detector. *Anal. Chim. Acta.* **2006**, *562*(2), 171-175.
- (98) Vallano, P.T.; Shugarts, S.B.; Kline, W.F.; Woolf, E.J.; Matuszewski, B.K. Determination of risedronate in human urine by column-switching ion-pair high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2003**, *794*(1), 23-33.
- (99) Walash, M.I.; Metwally, M.E.; Eid, M.; El-Shaheny, R.N. Spectrophotometric Determination of Risedronate in Pharmaceutical Formulations via Complex Formation with Cu (II) Ions: Application to Content Uniformity Testing. *Int. J. Biomed. Sci (Pomona, CA, U. S.)*. **2008**, *4*(4), 303-309.
- (100) Development and Validation of RP-HPLC Method for the Assay of Risedronate Sodium *International Journal of Pharma Sciences.* **2014**, *4*(.1), 438-441.
- (101) Ghassabian, S.; Wright, L. A.; deJager, A. D.; Smith, M. T. Development and validation of a sensitive solid-phase-extraction (SPE) method using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for determination of risedronate concentrations in human plasma. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2012**, *881-882*, 34-41.
- (102) Dissette, V.; Bozzi, P.; Bignozzi, C.A.; Dalpiaz, A.; Ferraro, L.; Beggiato, S.; Leo, E.; Vighi, E.; Pasti, L. Particulate adducts based on sodium risedronate and titanium dioxide for the bioavailability enhancement of oral administered bisphosphonates. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2010**, *41*(2), 328-336.
- (103) Damle, M. C.; Birajdar, L. B. DEVELOPMENT AND VALIDATION OF STABILITY-INDICATING HPLC METHOD FOR ESTIMATION OF RISEDRONATE SODIUM. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* **2015**, *4*(10), 644-653.

- (104) Cione, A. P. P.; Liberale, M. J.; da Silva, P.M. Development and validation of an HPLC method for stability evaluation of nystatin. *Braz. J. Pharm. Sci.* **2010**, *46*(2), 305-310.
- (105) Roy, C.; Chakrabarty, J. Stability-Indicating Validated Novel RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Methylparaben, Ketoconazole, and Mometasone Furoate in Topical Pharmaceutical Dosage Formulation. *ISRN Anal. Chem.* **2013**, *2013*, 1-9.
- (106) Pita Fernández, S.; Pértega Díaz, S. Relación entre variables cuantitativas. *Cad. Aten. Primaria.* **1997**, *4*, 141-144.
- (107) Fisher, R. A. Frequency distribution of the values of the correlation coefficient in samples from an indefinitely large population. *Biometrika* **1915**, *10*(4), 507-521.
- (108) Fisher, R. A. On the "probable error" of a coefficient of correlation deduced from a small sample. *Metron* **1921**, *1*, 3-32.
- (109) Olkin, I.; Pratt, J. W. Unbiased estimation of certain correlation coefficients. *The Annals of Mathematical Statistics* **1958**, *29*, 201-211.
- (110) Aluoch, A.; Tatini, R.; Parsons, D. M.; Sadik, O. Stability Indicating Ion-Pair HPLC Method for the Determination of Risedronate in a Commercial Formulation. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2004**, *27*(17), 2799-2813.
- (111) Kyriakides, D.; Panderi, I. Development and validation of a reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatographic method for the determination of risedronate in pharmaceutical preparations. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *584*(1), 153-159.
- (112) Papadopoulou, V.; Kosmidis, K.; Vlachou, M.; Macheras, P. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. *Int. J. Pharm. (Amsterdam, Neth.)* **2006**, *309*(1-2), 44-50.
- (113) Pedersen, P.V.; Myrick, J.W. Versatile kinetic-approach to analysis of dissolution data. *J. Pharm. Sci.* **1978**, *67*(10), 1450-1455.
- (114) Tanwar, Y.S.; Chauhan, C.S.; Sharma, A. Development and evaluation of carvedilol transdermal patches. *Acta Pharm. (Zagreb, Croatia)* **2007**, *57*(2), 151-159.

(115) Kumar Dey, S.; Kumar De, P.; Sen, T.; Shankar, V.; Banerjee, U. Formulation and in vitro evaluation of transdermal matrix patches of Diclofenac sodium *J. Pharm. Res. (Mohali, India)* **2011**, *4*(10), 3593-3596.

ÍNDICE DE ESQUEMAS,  
FIGURAS, IMÁGENES Y TABLAS

**ESQUEMAS**

<b>Esquema 2.1</b>	Reacción general de obtención del fumarato de di-2-octilo	Pág. 9
<b>Esquema 2.2</b>	Reacción de obtención del S-1-metoxicarboniletil O-etil xantato	Pág. 11
<b>Esquema 2.3</b>	Procedimiento de elaboración de la películas	Pág. 19
<b>Esquema 3.1</b>	Estructura del S-1-metoxicarboniletil O-etil xantato	Pág. 44
<b>Esquema 3.2</b>	Estructura del S-1-etoxicarboniletil O-etil xantato	Pág. 46
<b>Esquema 3.3</b>	Reacción general de copolimerización empleando energía de microondas	Pág. 50
<b>Esquema 3.4</b>	Esquema de las transferencias de cadena al polímero vía abstracción de hidrógenos de carbonos terciarios (i) y de grupos metílicos del AcV (ii)	Pág. 57
<b>Esquema 3.5</b>	Reacción general de copolimerización RAFT	Pág. 64
<b>Esquema 3.6</b>	Mecanismo propuesto para la reacción de polimerización RAFT	Pág. 67
<b>Esquema 3.7</b>	Tipos de intermediario radical II de la copolimerización RAFT de dos monómeros	Pág. 68
<b>Esquema 3.8</b>	Síntesis de RI en el laboratorio	Pág. 82

## FIGURAS

<b>Figura 3.1</b>	Espectro $^1\text{H}$ -RMN del AcV	Pág. 39
<b>Figura 3.2</b>	Espectros $^1\text{H}$ -RMN (A) y $^{13}\text{C}$ -RMN (B) del FIP	Pág. 40
<b>Figura 3.3</b>	Espectros $^1\text{H}$ -RMN (A) y $^{13}\text{C}$ -RMN (B) del FDO	Pág. 42
<b>Figura 3.4</b>	Espectro FTIR del FDO	Pág. 43
<b>Figura 3.5</b>	TLC del crudo de reacción en la síntesis del S-1-metoxicarboniletil O-etil xantato: A-siembrapara por duplicado del crudo de reacción. B-siembrapara de izquierda a derecha: 2-bromopropionato de metilo, O-etil xantato de potasio y crudo de reacción	Pág. 45
<b>Figura 3.6</b>	Espectros $^1\text{H}$ -RMN de los productos de la síntesis del S-1-metoxicarboniletil O-etil xantato en etanol (celeste) y metnaol (rojo)	Pág. 46
<b>Figura 3.7</b>	Espectro $^1\text{H}$ -RMN de la mezcla de CTAs	Pág. 47
<b>Figura 3.8</b>	Espectro $^1\text{H}$ -RMN del S-1-metoxicarboniletil O-etil xantato	Pág. 48
<b>Figura 3.9</b>	Espectro FTIR del AcV-co-FIP-MO	Pág. 51
<b>Figura 3.10</b>	Espectro $^1\text{H}$ -RMN y asignaciones para el AcV-co-FIP-MO	Pág. 53
<b>Figura 3.11</b>	Espectro FTIR del AcV-co-FDO-MO	Pág. 60
<b>Figura 3.12</b>	Espectro $^1\text{H}$ -RMN y asignaciones para el AcV-co-FDO-MO	Pág. 62
<b>Figura 3.13</b>	Espectro FTIR de un copolímero acrílico comercial	Pág. 75
<b>Figura 3.14</b>	Hinchamiento de películas elaboradas a partir del AcV-co-FDO-MO-3	Pág. 79

<b>Figura 3.15</b>	Gráfica log-log correspondiente a la Ecuación 2.3 para el hinchamiento de membranas elaboradas a partir del AcV-co-FDO-MO-3	Pág. 80
<b>Figura 3.16</b>	Espectros <sup>1</sup> H-RMN (A) y <sup>13</sup> C-RMN (B) del RI	Pág. 84
<b>Figura 3.17</b>	Izquierda: Espectros FTIR del RI sintetizado (rojo obtenido por DRIFT y azul por transmisión en pastilla de KBr) y RI aislado de una muestra comercial (negro). Derecha: Detalle de la zona correspondiente a los OH libres.	Pág. 87
<b>Figura 3.18</b>	Espectros FTIR de: AcV-co-FDO-MO-3 (rojo) y AcV-co-FDO-MO-3 + RI 6%p/p (azul)	Pág. 93
<b>Figura 3.19</b>	Termogramas de AcV-co-FDO-MO-3 (a) y AcV-co-FDO-MO-3 + RI (b)	Pág. 94
<b>Figura 3.20</b>	Espectro UV-vis del RI	Pág. 96
<b>Figura 3.21</b>	Perfil cromatográfico del RI	Pág. 97
<b>Figura 3.22</b>	Espectro UV-vis del RI en el máximo del pico cromatográfico obtenido mediante el detector de arreglo de diodos de un equipo HP 1100	Pág. 100
<b>Figura 3.23</b>	Curva de calibración de RI	Pág. 104
<b>Figura 3.24</b>	Evaluación del título de soluciones de RI sometidas a 34,0°C en buffer fosfato durante 9 días	Pág. 110
<b>Figura 3.25</b>	Espectro UV-vis de una solución de RI sometida a 34,0°C en buffer fosfato durante 9 días	Pág. 111
<b>Figura 3.26</b>	Perfiles de liberación de RI desde membranas elaboradas a partir del AcV-co-FDO-MO-3, para las relaciones 6%p/p (arriba) y 12%p/p (abajo)	Pág. 113

**IMÁGENES**

<b>Imagen 2.1</b>	Síntesis del S-1-metoxicarboniletil O-etil xantato	Pág. 12
<b>Imagen 2.2</b>	Reacciones de polimerización en solución	Pág. 17
<b>Imagen 2.3</b>	Equipo disolutor	Pág. 30
<b>Imagen 3.1</b>	Membranas basadas en copolímeros fumáricos: AcV-co-FIP-MO (A), AcV-co-FDO-MO-3 (B) y AcV-co-FDO-R2 (C)	Pág. 72
<b>Imagen 3.2</b>	Micrografías obtenidas por SEM de las membranas elaboradas a partir de (A) AcV-co-FIP-MO, (B) AcV-co-FDO-MO-3 y (C) copolímero acrílico comercial	Pág. 74
<b>Imagen 3.3</b>	Fotografías de una membrana elaborada a partir del AcV-co-FDO-MO-3 y su adhesión a la piel del dorso de la mano	Pág. 77
<b>Imagen 3.4</b>	Películas del AcV-co-FDO-MO-3 conteniendo 30 mg y 60 mg de RI (A) y (B) respectivamente, y película del AcV-co-FDO-R2 conteniendo 30 mg de RI (C)	Pág. 90
<b>Imagen 3.5</b>	Micrografías de membranas de AcV-co-FDO-MO-3 conteniendo 30 mg (A) y 60 mg (B) de RI, y película de AcV-co-FDO-R2 conteniendo 30 mg de RI (C)- Aumento: 10X.	Pág. 91

## TABLAS

<b>Tabla 2.1</b>	Valores del exponente $n$ en el modelo de Riger-Peppas según el mecanismo de transporte involucrado para la geometría plana	Pág. 35
<b>Tabla 3.1</b>	Asignación de señales del espectro $^1\text{H}$ -RMN del AcV	Pág. 38
<b>Tabla 3.2</b>	Asignación de señales de los espectros $^1\text{H}$ -RMN y $^{13}\text{C}$ -RMN del FIP	Pág. 39
<b>Tabla 3.3</b>	Asignación de señales de los espectros $^1\text{H}$ -RMN, $^{13}\text{C}$ -RMN y FTIR del FDO	Pág. 41
<b>Tabla 3.4</b>	Asignación de señales del espectro $^1\text{H}$ -RMN del S-1-metoxicarboniletil O-etil xantato	Pág. 48
<b>Tabla 3.5</b>	Resultados de la copolimerización del AcV con FIP a 140 watts de potencia	Pág. 51
<b>Tabla 3.6</b>	Resultados de las copolimerizaciones del AcV con FDO a 140 watts de potencia	Pág. 55
<b>Tabla 3.7</b>	Resultados para las distintas síntesis del AcV-co-FDO-MO-3	Pág. 59
<b>Tabla 3.8</b>	Constantes de transferencia (60°C) para el AcV en distintos solventes	Pág. 65
<b>Tabla 3.9</b>	Resultados de las copolimerizaciones RAFT del AcV con FDO	Pág. 68
<b>Tabla 3.10</b>	Datos de los copolímeros empleados en la elaboración de membranas	Pág. 71
<b>Tabla 3.11</b>	Resultados de la prueba de adhesión en distintas películas de copolímeros.	Pág. 76
<b>Tabla 3.12</b>	Evaluación de la existencia de residuo luego de realizar la prueba de adhesión en distintas películas de copolímeros	Pág. 76
<b>Tabla 3.13</b>	Resultados de los ensayos de eficacia en el casteo del copolímero	Pág. 81
<b>Tabla 3.14</b>	Asignación de señales de los espectros $^1\text{H}$ -RMN y $^{13}\text{C}$ -RMN del RI	Pág. 83
<b>Tabla 3.15</b>	Comparación de bandas características del RI hemipentahidratado	Pág. 85

<b>Tabla 3.16</b>	Comparación de banda característica del RI monohidratado	Pág. 86
<b>Tabla 3.17</b>	Análisis de los tiempos de retención de RI	Pág. 98
<b>Tabla 3.18</b>	Tabla de Mérito del método cromatográfico	Pág. 101
<b>Tabla 3.19</b>	Resultados de los ensayos de repetibilidad	Pág. 102
<b>Tabla 3.20</b>	Porcentaje de RI recuperado de soluciones con distintos agregados	Pág. 105
<b>Tabla 3.21</b>	Porcentaje de carga de RI en la matriz para una relación 6% p/p	Pág. 108
<b>Tabla 3.22</b>	Porcentaje de carga de RI en la matriz para una relación 12% p/p	Pág. 108
<b>Tabla 3.23</b>	Resultados para los $R^2$ y $R^2_{\text{ajustado}}$ de las rectas correspondientes a cada modelo teórico	Pág. 114



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE LA PLATA