UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA

TESIS DOCTORAL

Diseño y desarrollo de comprimidos matriciales de liberación prolongada a partir de un nuevo polímero hinchable

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Rebeca Simancas Herbada

Directoras

Ana Isabel Torres Suárez
Ana María Fernández Carballido

Madrid

© Rebeca Simancas Herbada, 2020

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

TESIS DOCTORAL

DISEÑO Y DESARROLLO DE COMPRIMIDOS MATRICIALES DE LIBERACIÓN PROLONGADA A PARTIR DE UN NUEVO POLÍMERO HINCHABLE

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Rebeca Simancas Herbada

DIRECTOR

Ana Isabel Torres Suárez
Ana María Fernández Carballido

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA GALÉNICA Y TECNOLOGÍA ALIMENTARIA

DISEÑO Y DESARROLLO DE COMPRIMIDOS MATRICIALES DE LIBERACIÓN PROLONGADA A PARTIR DE UN NUEVO POLÍMERO HINCHABLE

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR:

REBECA SIMANCAS HERBADA

DIRECTORES:

DRA. ANA ISABEL TORRES SUÁREZ

DRA. ANA MARÍA FERNÁNDEZ CARBALLIDO

MADRID, 2020

A mis padres, por creer siempre en mi

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas las personas que de forma directa o indirecta han contribuido a la realización de esta tesis doctoral.

En primer lugar, me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a mis directoras de tesis, la Dra. Ana Isabel Torres Suárez y la Dra. Ana Mª Fernández Carballido; por brindarme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación y haber avalado el presente proyecto de tesis doctoral. Gracias por compartir vuestros conocimientos conmigo, el tiempo invertido y el constante apoyo que me habéis dado durante todos estos años tanto a nivel profesional como personal, pero sobre todo gracias por la confianza que depositasteis en mi desde el principio.

Me gustaría hacer extensivo este agradecimiento a todos los profesores que forman parte del Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria, en especial al Dr. Juan José Torrado Durán y a la Dra. Emilia Barcia Hernández, directores del departamento durante los años que he desarrollado esta tesis doctoral, por haberme permitido la realización de la misma en el departamento.

Gracias a todos mis compañeros del departamento con los que he compartido estos años, a Patri, Raul, Araceli, Alicia, Sergio, Jose, Raquel, gracias por hacer esos largos días en el laboratorio más llevaderos. A mi grupo de investigación, Juan, gracias por enseñarme lo que es un sotax, ya que a partir de ahí comenzó todo. A todos los estudiantes que nos han visitado durante este tiempo, a Bettzy, Brando, Favio, Kathy, Gina y Josefina, por su entusiasmo y ganas de aprender, ha sido muy divertido teneros por el laboratorio. A Anais, por estar siempre ahí, tanto dentro como fuera del labo, en los buenos momentos y los no tan buenos, y por nuestras largas charlas arreglando el mundo, gracias amiga.

Al Dr. Jorge Rubio Retama y al Dr. Enrique López Cabarcos del Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas por acogerme en su grupo de investigación para la síntesis del polímero. Al Dr. Francisco Otero Espinar del Departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Santiago de Compostela por haberme permitido realizar una estancia en su grupo de investigación. Muchas gracias a

todos los miembros de su grupo, en especial a Elena y a Victoria por ayudarme tanto y acogerme como una más.

A mis amigas, que me han apoyado incondicionalmente durante todos estos años. Lucia, gracias por acompañarme en esta etapa de mi vida, como lo has hecho desde que tenemos 5 años, gracias por confiar en mí más que yo misma y gracias por aguantar mis "speeches" y aprender de polímeros conmigo. Gracias a Palo, por tu eterno buen rollo, por tus palabras de ánimo y por alegrarte de mis logros como si fueran tuyos. Gracias a las dos sin vosotras no lo hubiera conseguido. Gracias a las Tatis, Alex, Son, Pols y Paty por entender mis "bromas" farmacéuticas, y aunque cada una estemos en un sitio diferente nos mantenemos unidas. Con vosotras comencé este largo camino.

A Pablo, por haber "sufrido" tanto como yo esta etapa, por hacer que desconecte un rato, para que luego me cunda más y por saber sacarme siempre una sonrisa. Gracias por estar ahí, te quiero.

A toda mi familia por su gran apoyo durante estos años, sin olvidarme de los pequeñajos, Jose, Olivia y Ana por darnos tantas alegrías y risas. Por último y de forma especial a mis padres. Gracias por vuestra infinita paciencia y vuestro esfuerzo. Gracias por empujarme a seguir adelante, y no dejarme tirar la toalla. Gracias por ponerme siempre por delante de vosotros mismos y por estar a mi lado en todo momento. En definitiva, gracias por creer en mí. Esta tesis doctoral sin vuestro apoyo incondicional no hubiera sido posible, y por eso, es para vosotros. Os quiero.

ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
AMgA	Monómero de acrilato de magnesio
API	Ingrediente farmacéutico activo (Active pharmaceutical ingredient)
BCS	Sistema de clasificación biofarmacéutica
CAM	Membrana corioalantoidea
Coa t	Tiempo de coagulación
Cs	Coeficiente de solubilidad
CV	Coeficiente de variación
DE	Desviación estándar
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
ƒ1	Factor de diferenciación
ƒ2	Factor de similitud
FaSSGF	Fluido gástrico simulado en ayunas (Fasted state gastric conditions)
FaSSIF	Fluido intestinal simulado antes de la ingesta (Fasted state conditions in the small intestine)
FeSSIF	Fluido intestinal simulado después de la ingesta (Fed state conditions in the small intestine)
FTIR	Espectro infrarrojo por transformada de Fourier
GI	Tracto gastrointestinal
Hem t	Tiempo de hemorragia
HET-CAM	Test de la membrana corioalantoidea (Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane)
HG	Hidrogeles
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia (High Performance Liquid Chromatography)
ICH	Consejo Internacional de armonización
IS	Indice de irritacion (Irritation score)
LC	Límite de cuantificación

L-C-PAMgA	Poli(acrilato de magnesio) de cadena larga (Long-chain PAMgA)
LD	Límite de detección
Lis t	Tiempo de lisis vascular
LSS	Lauril sulfato sódico
M∞	Cantidad máxima de fármaco cedido
mD	MiliDalton
mJ	MiliJulios
M_t	Cantidad de fármaco cedido en un tiempo determinado
MTT	3-(4-5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl te-trazolium bromide
NaCMC	Carboximetilcelulosa sódica
p	Probabilidad asociada al estadístico correspondiente
PAMgA	Poli(acrilato de magnesio)
PBS	Buffer fosfato salino (Phosphate buffered saline)
PSA	Persulfato de amonio
psia	Presión absoluta
RFE	Real Farmacopea Española
rpm	Revoluciones por minuto
S-C-PAMgA	Poli(acrilato de magnesio) de cadena corta (Short-chain PAMgA)
SEM	Microscopia electrónica de barrido
SLS	Lauril sulfato sódico
SVF	Fluido vaginal simulado (Simulated vaginal fluid)
SW	Capacidad de hinchamiento
T	Factor de asimetría
TEMED	N,N,N',N'- tetrametiletilendiamina
Tg	Temperatura de transición vítrea
tr	Tiempo de retención
UA	Unidades de área

USP	Farmacopea de Estados Unidos (United States Pharmacopeia)
UV	Ultravioleta-Visible
$\mathbf{W_{drug}}$	Peso inicial del activo
$\mathbf{W_f}$	Peso final de comprimido seco
$\mathbf{W_i}$	Peso del comprimido hinchado
$\mathbf{W_o}$	Peso inicial del comprimido

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN **6**

SUMMARY **12**

1. INTRODUCCIÓN **18**

1.1. HIDROGELES 21

1.2. HIDROGELES COMO EXCIPIENTES DE COMPRIMIDOS 24

1.3. HIDROGELES DERIVADOS DEL ÁCIDO ACRÍLICO 28

2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO **31**

3. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO POLÍMERO DE POLIACRILATO DE MAGNESIO: PAMGA **36**

3.1. MATERIALES Y MÉTODOS 38

3.1.1. Síntesis del polímero de acrilato de magnesio (PAMgA) 38

3.1.2. Caracterización de PAMgA 5 y PAMgA 40 39

3.1.2.1. Calorimetría diferencia de barrido (DSC) 40

3.1.2.2. Espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) 40

3.1.2.3. Espectroscopia RAMAN 41

3.1.2.4. Microscopia electrónica de barrido (SEM) 41

3.1.2.5. Porosimetría por inyección de mercurio 42

3.1.2.6. Estudios de hinchamiento y erosión 43

3.1.2.7. Estudios de bioadhesion 44

3.1.2.8. Determinación del efecto irritante del polímero PAMgA: Método HET-CAM 47

3.1.2.9. Estudios de toxicidad aguda tras la administración oral de elevadas dosis de PAMgA con alimentos. 50

3.2. RESULTADOS 52

3.2.1. Síntesis del polímero de acrilato de magnesio (PAMgA) 52

3.2.2. Caracterización de los polímeros PAMgA 5 y PAMgA 40 55

3.2.2.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) 55

3.2.2.2. Espectro infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) 55

3.2.2.3. Espectroscopia RAMAN 56

3.2.2.4. Microscopia electrónica de barrido (SEM) 57

3.2.2.5. Porosimetría por intrusión de mercurio 58

3.2.2.6. Estudios de hinchamiento y bioerosión 61

3.2.2.7. Estudios de bioadhesion 66

3.2.2.8. Determinación del efecto irritante del polímero PAMgA: Método HET-CAM 68

3.2.2.9. Estudio de toxicidad aguda tras la administración oral de elevadas dosis de PAMgA con alimentos. 73

4. DESARROLLO DE COMPRIMIDOS MATRICIALES DE LIBERACIÓN PROLONGADA: ESTUDIOS PRELIMINARES 74

4.1. MATERIALES Y MÉTODOS 76

4.1.1. Selección de los principios activos 76

METFORMINA HIDROCLORURO: 77

BUDESONIDA: 79

4.1.2. Selección de los medios de cesión 81

4.1.3. Puesta a punto de los métodos de cuantificación de metformina y budesonida 82

4.1.3.1. Determinación analítica de metformina hidrocloruro mediante espectrofotometría ultravioleta (UV) 83

4.1.3.2. Determinación analítica de budesonida mediante espectrofotometría ultravioleta (UV) 84

4.1.3.3. Determinación analítica de budesonida mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) 85

4.1.3.4. Análisis estadístico de los resultados 86

4.1.4. Estudio de solubilidad de la budesonida en FaSSGF y FaSSIF 90

4.2. RESULTADOS 92

4.2.1. Determinación analítica de metformina hidrocloruro por espectrofotometría UV 92

4.2.2. Determinación analítica de budesonida por espectrofotometría UV 97

4.2.3. Determinación analítica de budesonida por HPLC 101

4.2.4. Estudio de solubilidad de la budesonida en FaSSGF y FaSSIF 109

5. DESARROLLO DE COMPRIMIDOS MATRICIALES DE METFORMINA 112

5.1. INTRODUCTION 117

5.2. MATERIALS AND METHODS 119

5.2.1. Materials 119

5.2.2. Synthesis of the Poly(Magnesium Acrylate): PAMgA 119

5.2.3. Characterization of the Polymer 120

5.2.4. In Vivo Oral Biocompatibility Study of PAMgA 120

5.2.5. Preparation of Tablets 121

5.2.6. In Vitro Drug Release 122

5.2.7. Swelling and Matrix Erosion Behaviour 125

5.3. RESULTS 126

5.3.1. Characterization of the Polymer 126

5.3.2. In Vivo Oral Biocompatibility Study 127
5.3.3. Characterization of the Tablets 128
5.3.4. In Vitro Drug Release 129
5.3.5. Swelling and Erosion Behaviour 134
5.4. DISCUSSION 135
5.5. CONCLUSIONS 142
5.6. REFERENCES 143
6. DESARROLLO DE COMPRIMIDOS MATRICIALES DE BUDESONIDA 147
6.1. INTRODUCTION 151
6.2. MATERIALS AND METHODS 153
6.2.1. Materials 153
6.2.2. Elaboration of matrix tablets 153
6.2.3. In vitro drug release assays 154
6.2.3.1. Standard drug release tests 156
6.2.3.2. Sequential drug release tests 157
6.2.4. Water uptake and matrix erosion behaviour 157
6.2.4.1. Porosity measurements 157
6.2.4.2. Swelling and erosion 158
6.2.5. Bioadhesion and local toxicity studies 159
6.2.5.1. Bioadhesion tests 159
6.2.5.2. Hen's egg test on chorioallantoic membrane (HET-CAM) 160
6.3. RESULTS 162
6.3.1. Elaboration of matrix tablets 162
6.3.2. In vitro drug release assays 163
6.3.3. Porosity measurements 168
6.3.4. Swelling and erosion 169
6.3.5. Bioadhesion tests 173
6.3.6. Hen's egg test on chorioallantoic membrane (HET-CAM) 175
6.4. DISCUSSION 177
6.5. CONCLUSIONS 184
6.6. REFERENCES 186
7. DISCUSIÓN GENERAL 191
8. CONCLUSIONES 224
BIBLIOGRAFÍA 228

RESUMEN

Introducción

La síntesis de nuevos excipientes para la elaboración de formas farmacéuticas de liberación modificada de fármacos ha ganado importancia en los últimos años. Además de un buen control en la liberación del principio activo, en el caso de la administración por vía oral, estos excipientes deben presentar propiedades adecuadas de compresibilidad, resistencia mecánica y sensibilidad a factores como el pH o la temperatura que amplíen las posibilidades de control de la liberación de los activos.

Los hidrogeles derivados de ácido acrílico son un buen ejemplo de excipiente que cumple con los requisitos antes mencionados, y, además, presentan una buena biocompatibilidad y propiedades mucoadhesivos. Por ello se están utilizando ampliamente en comprimidos matriciales.

Objetivos y Métodos

El **objetivo global** de este trabajo de investigación es determinar la utilidad de un nuevo polímero, derivado del ácido acrílico, para formar matrices hidrófilas capaces de modular la liberación de principios activos cuando se utilizan en forma de comprimidos para una administración por vía oral.

Para alcanzar este objetivo, se definen los siguientes **objetivos específicos**:

1. Caracterizar un nuevo hidrogel de poli(acrilato de magnesio), con dos grados de reticulación, PAMgA 5 y PAMgA 40, mediante calorimetría diferencial de barrido, espectrometría infrarroja por transformada de Fourier, espectroscopía RAMAN y microscopía electrónica de barrido. Determinar su porosidad, por porosimetría de inyección de mercurio; su capacidad de hinchamiento y bioerosión en contacto con medio gástrico simulado y medio intestinal simulado; su capacidad de bioadhesión *in vitro*, sobre piel curtida de cabra, y *ex vivo*, sobre mucosa gástrica y duodenal de cerdo; su efecto irritante local, mediante un modelo *in*

ovo, y su toxicidad aguda por vía oral en modelo *in vivo* en ratones; todas ellas propiedades de interés para su uso como excipiente de comprimidos matriciales.

2. Desarrollar, con este hidrogel, comprimidos matriciales de metformina, fármaco altamente hidrosoluble, buscando una liberación prolongada que se ajuste a los requerimientos de farmacopeas, y que permitan una pauta de administración más cómoda para el tratamiento de la diabetes.

3. Desarrollar, con este hidrogel, comprimidos matriciales de budesonida, fármaco altamente liposoluble, buscando una liberación prolongada preferentemente a nivel de duodeno distal, yeyuno y colon, y por tanto de utilidad para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias intestinales como colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn.

Resultados

Los principales resultados y conclusiones obtenidos se desglosan a continuación:

1. Se ha caracterizado un nuevo hidrogel derivado del poliacrilato de magnesio, sintetizado con dos grados de reticulación, PAMgA 5 y PAMgA 40, no detectándose ninguna diferencia estructural entre ambos, siendo los espectros de FTIR y RAMAN superponibles.

2. Los comprimidos elaborados con el polímero PAMgA, cuando se ponen en contacto con medio gástrico simulado (pH 1,2), presentan el aspecto típico de comprimidos matriciales elaborados con hidrogeles, diferenciándose el frente de erosión, el frente de difusión y el frente de hinchamiento. Los comprimidos elaborados con el PAMgA 40 presentan una mayor porosidad y un mayor tamaño de poro que los obtenidos con el PAMgA 5. Esta mayor porosidad, junto con su menor erosión, probablemente condicionan la mayor capacidad de hinchamiento del PAMgA 40, frente al PAMgA 5, que en contacto con los medios gastrointestinales sufre principalmente un proceso de erosión consecuencia de

su menor grado de reticulación. Para ambos polímeros, el hinchamiento es dependiente de pH, siendo más intenso en medio intestinal simulado (pH 6,8), diferencia más apreciable a mayor grado de reticulación del polímero.

3. Los ensayos de bioadhesion sugieren que el PAMgA presenta propiedades mucoadhesivas, lo que podría aumentar el tiempo de permanencia de los comprimidos en el tracto gastrointestinal. Esta mucoadhesión es más intensa en medio ácido, y especialmente en el caso de PAMgA 5.

4. En los ensayos de biocompatibilidad realizados en ratones, tras la administración oral del polímero no se observaron síntomas de toxicidad, ni pérdida de peso, con una ingesta máxima diaria de hasta 10 g/Kg independientemente del grado de reticulación del polímero. Adicionalmente, el ensayo HET-CAM permitió clasificar el polímero PAMgA como no irritante. Por lo tanto, el polímero PAMgA se puede considerar un excipiente no tóxico para formas de administración por vía oral.

5. Este nuevo hidrogel controla eficazmente la liberación de moléculas pequeñas y altamente hidrófilas, como metformina, cuando se formula en comprimidos matriciales de administración oral. El polímero prolongó la liberación del principio activo hasta 10 horas, obteniéndose una formulación de comprimidos (con PAMgA 5 mezclado con metformina previamente granulada con carboximetilcelulosa sódica al 5%) que cumple con las especificaciones de la USP. La liberación de metformina a partir de los comprimidos matriciales elaborados con el PAMgA se produce principalmente por un mecanismo de difusión a través de la matriz hinchada (difusión de Fick).

6. Este nuevo hidrogel también resultó eficaz en el desarrollo de comprimidos de budesonida, molécula altamente liposoluble, para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal, al conseguirse una liberación prolongada del fármaco en medio gástrico simulado más lenta que en medio intestinal simulado, lo que se tradujo en el 75% de la dosis de budesonida liberada de

manera sostenida entre 4 y 20 horas cuando se ensayaron comprimidos elaborados a partir de PAMgA 40, lactosa 20% y lauril sulfato sódico 2% simulando los cambios en la composición de los fluidos en todo el tracto digestivo. La liberación de la budesonida a partir de los comprimidos se produce por un mecanismo mixto de difusión a través de la matriz hinchada y erosión de las cadenas exteriores del polímero (super caso-II).

Conclusión

Por todo lo comentado, el nuevo hidrogel de poliacrilato de magnesio (PAMgA), polímero de fácil síntesis y con alto rendimiento, presenta unas buenas propiedades para ser utilizado como excipiente en la elaboración de comprimidos matriciales de liberación prolongada administrados por vía oral.

SUMMARY

Introduction

In the recent years, the synthesis of new excipients for the development of modified drug release pharmaceutical forms has gained importance. Excipients used for oral administration must have adequate properties of compressibility, mechanical resistance and sensitivity to factors such as pH or temperature. Moreover, good control in the release of the active substance are factors that offer the possibilities of the use of theses excipients for modified drug release systems.

Acrylic based hydrogels, or its derivate are a good example of excipient that meets the aforementioned requirements, but also presents good biocompatibility and mucoadhesive properties, so they are widely used for the elaboration of matrix tablets.

Objectives and Methods

The **overall objective** of this research work is to determine the usefulness of a new polymer, derived from acrylic acid, to elaborate hydrophilic matrices capable of modifying drug release when used as tablets for oral administration.

To achieve this goal, the following **specific objectives** are defined:

1. To characterize a new poly (magnesium acrylate) hydrogel, with two mesh sizes; PAMgA 5 and PAMgA 40, by differential scanning calorimetry, infrared spectrometry by Fourier transform, RAMAN spectroscopy and scanning electron microscopy. Moreover, to determine its porosity, by mercury intrusion porosimetry; its capacity for swelling and eroding in contact with simulated gastric fluid and simulated intestinal fluids; its bioadhesion capability *in vitro*, on goat tanned leather, and *ex vivo,* on porcine gastric mucosa and proximal duodenum mucosa; and its local irritating effect, by means of an *in ovo* model. Finally, its acute toxicity in an *in vivo* model administered by oral route will be tested; all of these properties are of interest for the use of hydrogels as excipients for matrix tablets.

2. Develop matrix tablets using PAMgA hydrogel as excipient, using metformin as highly water-soluble drug, seeking for a controlled release of the drug that meets pharmacopoeias requirements (USP), and that allow a more comfortable delivery pattern for the treatment of diabetes.

3. Develop matrix tablets using PAMgA hydrogel as excipient, using budesonide as highly lipophilic drug, looking for modified release in distal duodenum, jejunum and proximal colon, and therefore useful for the treatment of inflammatory bowel diseases such as ulcerative colitis and Crohn's disease.

Results

The main results and conclusions obtained after the research investigation are below:

1. A new hydrogel poly(magnesium acrylate) hydrogel synthesized with two crosslinking degrees, PAMgA 5 and PAMgA 40, has been characterized, with no structural difference being detected, as FTIR and RAMAN spectra are overlapping.

2. Tablets elaborated with PAMgA polymer, when gets in contact with simulated gastric fluid at pH 1,2, have typical matrix tablets appearance elaborated with hydrogels, where the erosion front, diffusion front and swelling front were observed. Tablets elaborated with PAMgA 40 have a higher porosity and a larger pore size than those obtained with PAMgA 5. This increased porosity, together with its lower erosion, probably conditions the difference in swelling percentage observed in both polymers. On the other hand, PAMgA 5 in contact with gastrointestinal fluids undergoes mainly an erosion process, resulting from its lower crosslinking degree. For both polymers, swelling capacity was shown to be pH-dependent, being more intense in simulated intestinal fluid (pH 6.8), and more intense as polymer crosslinking increases.

3. Bioadhesion assays suggest PAMgA hydrogel has mucoadhesive properties, which could increase tablets contact with the mucosa of the gastrointestinal tract. This mucoadhesivity is more intense in acidic medium, and especially in the case of PAMgA 5.

4. No symptoms of toxicity or weight loss were observed after oral administration of the polymer in the *in vivo* biocompatibility assays, with a maximum daily intake of 10 g/Kg regardless the crosslinking degree of the polymers. In addition, results of HET-CAM assay enables to classify PAMgA polymer as non-irritating. Therefore, PAMgA polymer can be considered as a non-toxic excipient for pharmaceutical forms taken by oral administration.

5. This new hydrogel effectively controls the release of small and highly hydrophilic molecules, such as metformin, when formulated in matrix tablets for oral administration. The polymer controlled the release of the active substance up to 10 hours, obtaining a tablet formulation (were metformin is previously granulated with sodium carboxymethylcellulose at 5% and mixed with PAMgA 5) that meets USP specifications. The release mechanism of metformin from PAMgA matrix tablets is mainly caused by diffusion through the swollen matrix (Fick diffusion).

6. This new hydrogel was also effective in the development of budesonide matrix tablets, selected as highly lipophilic drug, for the treatment of inflammatory bowel disease, obtaining slower controlled release of the drug in simulated gastric fluid than in simulated intestinal fluid, resulting in 75 % of the budesonide dose released steadily between 4 and 20 hours when testing matrix tablets made from PAMgA 40 , lactose 20 % and lauril sodium sulfate 2% simulating changes in fluid composition throughout the gastrointestinal tract (sequential in vitro tests). Release mechanism of budesonide from matrix tablets elaborated with PAMgA is predominantly controlled by matrix swelling/dissolution (super case-II).

Conclusion

For all the above mentioned, its easy synthesis and high reaction yield, the new poly(magnesium acrylate) hydrogel (PAMgA), presents good properties to be used as an excipient in the elaboration of controlled matrix tablets for oral administration.

1. INTRODUCCIÓN

La Real Farmacopea Española describe las formas farmacéuticas de liberación modificada como preparaciones en las que la velocidad o el lugar de liberación del principio activo, es diferente del de la forma farmacéutica de liberación convencional administrada por la misma vía. La modificación de la liberación en estas formas farmacéuticas se consigue variando la formulación o el método de fabricación. Dentro de las formas farmacéuticas de liberación modificada se pueden distinguir tres tipos: liberación prolongada, retardada y liberación pulsátil (Real Farmacopea Española, 2015a, 2015b).

Las formas farmacéuticas de liberación prolongada son aquellas que garantizan una liberación más lenta de la sustancia o sustancias activas comparada con las formas farmacéuticas de liberación convencional. De esta manera se puede mejorar la efectividad de los tratamientos, en especial en tratamientos crónicos, haciendo que la posología sea más cómoda para el paciente y por tanto se produzca una mayor adherencia al tratamiento.

En el caso de la liberación retardada o diferida, se produce un retraso en el momento en que se inicia la liberación del fármaco, una vez administrado. Este periodo de latencia puede tener como finalidad el evitar la exposición de la molécula activa al pH gástrico o a encimas digestivos que puedan causar su degradación; el conseguir una liberación selectiva a nivel de últimos segmentos de intestino delgado y colon evitándose así su absorción prematura; o ajustar el momento de la liberación y en consecuencia el inicio del efecto terapéutico a una determinada hora del día, en el caso de la cronoterapia.

La liberación pulsátil conduce a la liberación del fármaco en dos o más momentos diferentes. Habitualmente consiste en una liberación inmediata, tras la administración, y una liberación retardada ajustada en el tiempo a los requerimientos posológicos del fármaco en cuestión.

1.1. *HIDROGELES*

Para conseguir la liberación modificada de fármacos se ha investigado el uso de diferentes polímeros hidrófilos del tipo de los hidrogeles (HG). Su estructura tridimensional, basada en cadenas largas principales unidas entre sí mediante moléculas más cortas, proporciona a los hidrogeles características tanto de compuestos sólidos como líquidos (Rubio-Retama et al., 2007). Estos polímeros poseen la capacidad de albergar gran cantidad de moléculas de agua entre sus cadenas formando geles en presencia de fluidos acuosos, como son los fluidos fisiológicos. En presencia de estos fluidos se produce la relajación de las cadenas poliméricas, pero manteniendo la forma e integridad del hidrogel. La integridad física, en medios acuosos, se consigue mediante reticulaciones físicas y/o químicas entre sus cadenas. La estructura tridimensional, proporciona a los hidrogeles unas buenas propiedades mecánicas que los convierte en unos excelentes candidatos para ser empleados como vehículos de muchos agentes activos para la obtención de formas farmacéuticas muy diversas (Fernández-Barbero et al., 2009; Vermonden et al., 2012). Además, esta alta capacidad para la absorción de agua les proporciona unas propiedades físicas que hace que se asemejen a tejidos vivos, con una consistencia suave y una baja tensión interfacial en medios acuosos. Esta propiedad, hace de los hidrogeles unos materiales con una elevada biocompatibilidad, con una gran versatilidad para aplicaciones biológicas. Por ello, el uso de estos polímeros va más allá de las aplicaciones como excipientes de formas farmacéuticas pudiendo ser utilizados en ingeniería de tejidos, revestimiento de superficies, fabricación de lentes de contacto, apósitos…(Rattier et al., 1997).

Las ventajas que presentan los hidrogeles para su utilización como excipientes de formas farmacéuticas, entre otras, son:

- Permiten la liberación controlada de fármacos
- Pueden mejorar la solubilidad de agentes hidrófobos.
- Pueden aumentar la estabilidad de algunos principios activos
- Pueden emplearse para la vectorización de agentes activos

- Pueden aumentar la biodisponibilidad de muchos fármacos
- Pueden administrarse por diferentes vías: oral, bucal, nasal, intravenosa, subcutánea, intraarticular, intraocular etc

Los hidrogeles pueden clasificarse atendiendo a muy diferentes criterios: en función de las interacciones involucradas en la creación de la estructura de la red (físicos o químicos); en función de la naturaleza de los grupos libres del polímero (neutros o iónicos); en función de sus características mecánicas y estructurales (redes afines o redes fantasma); en función de los monómeros que los componen (homo o copolímeros); en función de su estructura interna (estructuras amorfas, estructuras semicristalinas, estructuras unidas por hidrógeno e hidrocoloidales) y en función de la respuesta del hidrogel ante estímulos externos (sensibles o no sensibles) (Peppas et al., 2000; Rizwan et al., 2017).

Según el tipo de interacciones involucradas en la creación de la estructura de la red, se distingue entre hidrogeles químicos y físicos. Los HG obtenidos por entrecruzamiento químico, incluyen sólidos cuyas redes tridimensionales (3D) están formadas por cadenas de polímeros que están unidas por enlaces covalentes permanentes (Ahmed, 2015; Akhtar et al., 2016; Caccavo et al., 2016; Narayanaswamy and Torchilin, 2019; Parhi, 2017). La capacidad de hinchamiento, en estos HG, es el resultado de las interacciones entre la red polimérica, el agua y la densidad de las conexiones entre las cadenas. Los HG químicos no son homogéneos debido a la agregación hidrofóbica de los agentes de reticulación y a los grupos de alta densidad de reticulación (Palmese et al., 2019). Este grupo de hidrogeles presenta una mayor estabilidad y mejores propiedades mecánicas que los físicos; sin embargo, en los métodos de entrecruzamiento químico, el agente reticulante usado puede ser tóxico y es necesario eliminarlo para evitar que queden restos atrapados en la estructura del HG (Caló and Khutoryanskiy, 2015; Hoare and Kohane, 2008).

Los HG físicos son reversibles. Presentan cadenas que se encuentran unidas por enlaces de hidrógeno débiles, enlaces iónicos e interacciones dipolares o hidrófobas, excluyendo las que se disuelven antes de su uso (Ahmed, 2015; Caccavo et al., 2016;

Narayanaswamy and Torchilin, 2019). Estas fuerzas de unión dan como resultado hidrogeles que no son homogéneos, como, por ejemplo: geles de agar, de gelatina y de alcohol polivinílico. Estos hidrogeles presentan la ventaja de no utilizar agentes químicos para formar la estructura tridimensional; sin embargo, esta estructura es más inestable y se puede producir su desintegración rápida e impredecible (Chyzy et al., 2020).

Dentro de ambos tipos de HG se incluyen una amplia variedad de estructuras macromoleculares formadas por homopolímeros lineales reticulados y enredados; y copolímeros lineales, de bloque o de injerto (Lanzalaco et al., 2019; Singh and Mahto, 2017). Las redes de los hidrogeles se pueden estabilizar mediante reacciones con iones monovalentes y/o polivalentes, iones monovalentes múltiples o complejos que contienen enlaces de hidrógeno. Las propiedades y aplicaciones de los hidrogeles están directamente relacionadas con la densidad de reticulación, que determina el comportamiento de hinchamiento y los cambios de estado de las fases sólida y líquida (Chyzy et al., 2020).

Por otro lado, el origen de todos estos polímeros puede ser natural, sintético o semi-sintético; y dependiendo de su origen presentarán una serie de ventajas e inconvenientes. Los polímeros sintéticos tienen estructuras bien definidas y buenas propiedades mecánicas; mediante modificaciones estructurales se puede modular su velocidad de hinchamiento y de erosión y, en consecuencia, la cinética de liberación de las sustancias activas que contengan, pero son menos biocompatibles que los de origen natural. Los polímeros naturales ofrecen las ventajas de ser, generalmente, poco tóxicos y más biocompatibles, pero presentan peores propiedades mecánicas y posibilidades muy limitadas de modular a voluntad su velocidad de hinchamiento y bioerosión. (Coviello et al., 2007; Peppas et al., 2006).

1.2. *HIDROGELES COMO EXCIPIENTES DE COMPRIMIDOS*

La vía oral es la más utilizada para la administración de medicamentos tanto en formas farmacéuticas de liberación convencional como modificada, por la facilidad de administración y la gran tolerancia por parte del paciente. Sin embargo, es una ruta compleja debido a la cantidad de sistemas enzimáticos y a los diferentes valores de pH que posee el tracto gastrointestinal. La presencia de enzimas metabolizantes en la luz y mucosa intestinal puede comprometer la biodisponibilidad del fármaco, ya que puede ser inactivado por éstas. De igual manera, los diferentes pHs que se encuentran en el tracto gastrointestinal, desde 1,2 hasta 7,8; pueden afectar a la estabilidad del principio activo. En este sentido, algunos autores indican que las estructuras reticuladas de los hidrogeles podrían proteger a los principios activos de estos agentes externos, tanto de la actuación de enzimas digestivos como de la degradación producida por los diferentes pHs.

La forma farmacéutica más empleada para la administración de agentes activos por vía oral, son los comprimidos. Las propiedades mecánicas y reológicas de algunos HG, su estructura tridimensional y su buena biocompatibilidad, les confiere unas excelentes cualidades para su empleo como excipientes de comprimidos de liberación modificada. Y dentro de las diferentes opciones tecnológicas, son numerosas las referencias sobre la utilización de hidrogeles para el desarrollo de comprimidos matriciales de liberación prolongada de fármacos, ya que estas formulaciones son sencillas de elaborar, económicas y de fácil escalado a nivel industrial (Maderuelo et al., 2011).

En los comprimidos matriciales la liberación del fármaco, que se encuentra homogéneamente distribuido en la matriz, puede deberse a un mecanismo de difusión. El control de la liberación se produce como consecuencia del efecto “barrera” del hidrogel, que dificulta el acceso del medio exterior y, a su vez, dificulta la difusión del principio activo el exterior. Cuando el comprimido se encuentra con los fluidos gastro-intestinales, el agua difunde a través de la matriz desde la superficie al interior,

hidratándola y formado una capa de gel; en su recorrido va disolviendo el fármaco y este se libera por difusión a través de la matriz hidratada. El grosor de la capa de gel va aumentando con el tiempo; de esta manera, la distancia que cada molécula del principio activo debe atravesar, cada vez es de mayor longitud. En estos sistemas, la velocidad de liberación está directamente relacionada con el recorrido del fármaco en su difusión a través del hidrogel, que aumenta continuamente. Para la mayoría de los sistemas matriciales, la difusión del fármaco suele venir regida por la segunda ley de Fick.

Sin embargo, cuando se emplean polímeros que dan lugar a geles de baja viscosidad, la erosión del hidrogel representa el principal mecanismo de liberación y, generalmente el proceso se rige por una cinética de liberación de orden cero.

En la mayoría de las ocasiones, tanto la difusión como la erosión contribuyen conjuntamente a la liberación del fármaco, predominando uno u otro en función de la hidrofilia y tamaño molecular de éste. Esta combinación de los dos mecanismos, da como resultado una cinética que suele ser dependiente de la raíz cuadrada del tiempo y está descrita como "transporte anómalo"(Gu et al., 2017).

Los fármacos de pequeño tamaño molecular y altamente hidrosolubles son difíciles de formular en comprimidos matriciales hidrófilos de liberación modificada, ya que tienden a difundir con rapidez a través del hidrogel, liberándose sin apenas control. Uno de los principales factores a tener en cuenta para conseguir un buen control de la liberación de estos fármacos es la estructura química del hidrogel y la proporción del agente de reticulación empleado en su síntesis. La proporción del agente reticulante determina el tamaño de malla, ξ, y permite optimizar tanto la carga como la difusión de los fármacos solubles en agua, dentro o fuera de la red (Peppas et al., 2000). Una mayor densidad de reticulación dificulta la movilidad de las cadenas de polímero, disminuyendo el hinchamiento. Sin embargo, un hidrogel del mismo tipo, con una menor reticulación tendrá una mayor capacidad de hinchamiento. La incorporación de grupos hidrófilos en el agente de reticulación, puede dar lugar a un mayor grado de hinchamiento en comparación con agentes que contienen grupos hidrófobos. El tamaño

de la malla de la red también afecta a propiedades físicas del gel, como son la resistencia mecánica y la velocidad de degradación. (Peppas et al., 2000).

En cuanto a los fármacos hidrófobos, una de las principales limitaciones de los HG en el desarrollo de formas farmacéuticas de liberación modificada es, por el contrario, su baja capacidad de carga y de liberación del activo, debido a la elevada hidrofilia de la estructura tridimensional. Teniendo en cuenta que más del 40% de los medicamentos comercializados y alrededor del 60% de los agentes terapéuticos que se encuentran en investigación son compuestos hidrofóbicos, resulta muy importante desarrollar estrategias que permitan la incorporación de este tipo de activos en las formulaciones con hidrogeles (Larrañeta et al., 2018; McKenzie et al., 2015). Por este motivo, se han propuesto diferentes estrategias para mejorar tanto la carga como la velocidad en la liberación de sustancias hidrófobas. Dentro de las estrategias utilizadas se pueden destacar las llamadas estrategias combinadas, que incluyen en la estructura del hidrogel otros recursos tecnológicos como: ciclodextrinas, restos hidrófobos, nanopartículas o micelas (Concheiro and Alvarez-Lorenzo, 2013; Gu et al., 2017; Jalalvandi et al., 2017; McKenzie et al., 2015).

Los comprimidos matriciales elaborados con hidrogeles se utilizan, fundamentalmente buscando una liberación prolongada del principio activo a lo largo del tubo digestivo, fundamentalmente estómago e intestino delgado, con el objetivo de ampliar los intervalos de dosificación y que una única administración diaria sea suficiente para tratar patologías crónicas, mejorar el cumplimiento por parte del paciente. En el caso de principios activos que presentan ventana de absorción, para que esta liberación prolongada resulte eficaz es necesario desarrollar sistemas gastrorretentivos, en los que el comprimido permanezca retenido a nivel del estómago, accediendo el fármaco liberado al lugar de absorción, habitualmente las primeras porciones del intestino delgado, de forma continuada. El colon es otro objetivo que ha despertado un gran interés para la liberación de fármacos, ya que presenta una menor actividad de enzimas proteolíticas que el intestino delgado. La liberación diferida de sustancias activas a nivel del colon se ha utilizado, fundamentalmente, para el tratamiento de enfermedades locales, especialmente inflamatorias y cáncer colorrectal

(Jain and Jain, 2008). En este sentido, la velocidad de vaciamiento gástrico y el tiempo de tránsito intestinal, el pH de la zona y la microbiota específica van a ser los factores críticos para alcanzar una liberación selectiva del fármaco a este nivel.

Se han desarrollado numerosas estrategias que buscan la liberación del principio activo en el lugar adecuado para su acción o absorción. Los llamados hidrogeles inteligentes, sensibles a estímulos externos, han despertado un especial interés como excipientes de formas farmacéuticas para la administración por vía oral. Estos polímeros sufren cambios en sus propiedades físicas o químicas como consecuencia de un estímulo externo: alteración en la estructura de la red, en el grado de hinchamiento, en la permeabilidad o en la resistencia mecánica. Estos cambios permiten controlar la liberación del fármaco en su lugar de acción o de absorción (Mastropietro et al., 2012). Dentro de los estímulos físicos se incluyen la temperatura, los campos eléctricos y la luz; y dentro de los estímulos químicos y bioquímicos se incluyen el pH y la fuerza iónica, que son los más empleados en el caso de la vía oral (Rizwan et al., 2017; Sharpe et al., 2014).

Los sistemas gastrorretentivos elaborados con hidrogeles se basan fundamentalmente en el hinchamiento que sufren al contacto con los fluidos gástricos, bien porque el aumento de volumen impide la progresión del comprimido a través del esfínter pilórico, quedando físicamente atrapado a nivel gástrico hasta que la bioerosión del mismo reduzca su tamaño lo suficiente; o bien porque este aumento de volumen conduce a una disminución en la densidad del sistema que hace que flote en los fluidos del estómago, no siendo arrastrado al intestino cuando se produce el vaciamiento. El factor clave, en el desarrollo de estos sistemas, es el tiempo de retención gástrica (Liechty et al., 2010). La gastrorretención basada en la estrategia de la mucoadhesión, resulta tecnológicamente bastante sencilla, comparada con las otras estrategias, aunque, en general, no ofrece buenos resultados en la práctica debido al bajo tiempo de contacto entre los sistemas y la mucosa gástrica (consecuencia del alto peristaltismo y elevada velocidad de recambio celular) y por el pH ácido poco favorable para las interacciones químicas entre las cadenas poliméricas y de mucina. Sin embargo, esta

estrategia puede resultar eficaz a nivel de duodeno, donde todos estos factores no existen (Sarkar et al., 2017).

1.3. *HIDROGELES DERIVADOS DEL ÁCIDO ACRÍLICO*

Un grupo de polímeros hidrófilos utilizado en el desarrollo de estas formas farmacéuticas de liberación modificada, son los derivados del ácido acrílico. Estos polímeros contienen ácido carboxílico, que le proporciona unas características favorables para la administración oral de fármacos, incluida la respuesta al pH, la inhibición enzimática y la mucoadhesión (Gao et al., 2014).

Los hidrogeles derivados del ácido acrílico se obtienen mediante una síntesis sencilla y, además, sus propiedades mucoadhesivas favorecen el tiempo de contacto de la forma farmacéutica con la mucosa gastrointestinal. El mayor tiempo de contacto con la mucosa digestiva, unido a la liberación modificada que se puede obtener con estos polímeros, puede, además de mejorar las pautas de dosificación, aumentar la biodisponibilidad de algunos principios activos. Las propiedades físico-químicas que presentan los derivados del ácido acrílico permiten la elaboración de comprimidos matriciales. En estos comprimidos el principio o principios activos se encuentran homogéneamente dispersos por toda la matriz. Normalmente, estas formulaciones, se obtienen por compresión directa debido a las buenas características de compresibilidad que poseen los hidrogeles, pudiendo incluir en la formulación otros excipientes como son diluyentes, lubrificantes y antiadherentes.

Los comprimidos elaborados con estos poliacrilatos se caracterizan por hincharse al entrar en contacto con los fluidos acuosos originando la formación de una capa de gel, la cual condiciona: la entrada de medio en la matriz, la salida de fármaco a partir del comprimido y el proceso de erosión de la matriz. Esta entrada del medio al interior del comprimido matricial provoca una relajación de las cadenas poliméricas causando un descenso de la temperatura de transición vítrea (Tg) del polímero. El descenso en la Tg da lugar a la formación de una zona en la que el polímero cambia su

estructura de estado cristalino a un estado más elástico formando la capa de gel. En efecto, con la entrada de medio acuoso en la matriz se produce la formación de tres frentes (figura 1.1), los cuales desaparecen a lo largo del proceso de disolución de la matriz: frente de hinchamiento, frente de difusión, y el frente de erosión o disolución (Colombo et al., 1999).

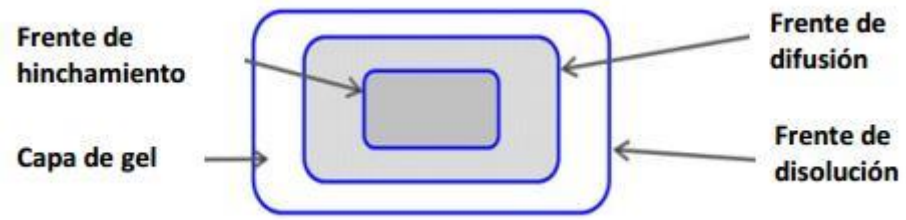


Figura 1.1: Representación esquemática de la cesión del principio activo en un comprimido matricial

El frente de hinchamiento es la interfase que se forma entre el polímero no hidratado en el interior de la matriz y el polímero gelificado. El polímero no hidratado se encuentra en estado cristalino con una Tg mayor que la temperatura ambiente, en cambio la parte gelificada tiene una Tg menor que la ambiental ya que alberga entre sus cadenas moléculas de medio. Esta interfase avanza hacia el interior de la matriz a una velocidad que puede ser constante. El principio activo que se encuentre disperso en la matriz, difunde lentamente a través de las cadenas poliméricas intactas, y a mayor velocidad a través de la capa de gel hasta llegar al frente de erosión donde el comprimido matricial comienza a perder su forma dejando libres fracciones de las cadenas de polímero disminuyendo su tamaño. El frente de erosión (o disolución), por tanto, es el que se encuentra en contacto directo con el medio y separa la capa de gel del medio de disolución (Maderuelo et al., 2011). EL principio activo se libera del comprimido matricial mediante un proceso de difusión a través de la capa de gel, por un proceso de erosión de la parte más externa del comprimido o por una combinación de ambos procesos.

Existen otros factores, algunos ya se han mencionado previamente, que condicionan el proceso de liberación del fármaco a partir de la matriz, como son:

- Las características propias del polímero utilizado: el tipo de polímero utilizado y el entrecruzamiento de sus cadenas, su naturaleza química, su peso molecular y tamaño de partícula, su viscosidad intrínseca o el porcentaje en el que se encuentra en la formulación.
- La naturaleza del fluido biológico, pH, fuerza iónica y la temperatura.
- Las características del principio activo como son su solubilidad, peso molecular, dosis en la formulación o tamaño de partícula.
- Y por último los factores de la formulación como las características del propio comprimido: geometría, presencia de otros principios activos o excipientes, resistencia a la fractura o presencia de aire en el interior de la matriz entre otros.

Combinando, de forma adecuada, todos estos factores se pueden obtener diferentes cinéticas de liberación del principio activo, obteniendo concentraciones terapéuticas durante un tiempo determinado, en un momento determinado o en un lugar determinado.

2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO

La síntesis de nuevos excipientes para la elaboración de formas farmacéuticas de liberación modificada de fármacos ha ganado importancia en los últimos años. Además de un buen control en la liberación del principio activo, en el caso de la administración por vía oral estos excipientes deben presentar propiedades adecuadas de compresibilidad, resistencia mecánica y sensibilidad a factores como el pH o la temperatura que amplíen las posibilidades de control de la liberación de los activos.

Los hidrogeles derivados de ácido acrílico son un buen ejemplo de excipiente que cumple con los requisitos antes mencionados, y además presentan una buena biocompatibilidad y propiedades mucoadhesivos. Por ello se están utilizando ampliamente en comprimidos matriciales.

El **objetivo global** de este trabajo de investigación es determinar la utilidad de un nuevo polímero, derivado del ácido acrílico, para formar matrices hidrófilas capaces de modular la liberación de principios activos cuando se utilizan en forma de comprimidos para una administración por vía oral.

Para alcanzar este objetivo, se abordan los siguientes **objetivos específicos**:

1. Caracterizar un nuevo poli(acrilato de magnesio), con dos grados de reticulación, PAMgA 5 y PAMgA 40, y determinar su capacidad de hinchamiento, bioerosión, bioadhesión, y su biocompatibilidad; propiedades de interés para su uso como excipiente de comprimidos matriciales.

Este objetivo se aborda fundamentalmente en el capítulo 3 de la presente memoria.

2. Desarrollar comprimidos matriciales de metformina, fármaco altamente hidrosoluble, buscando una liberación prolongada que se ajuste a los requerimientos de farmacopeas, y que permitan una pauta de administración más cómoda para el tratamiento de la diabetes.

Este objetivo se aborda fundamentalmente en el capítulo 5 de la presente memoria.

3. Desarrollar comprimidos matriciales de budesonida, fármaco altamente liposoluble, buscando una liberación prolongada preferentemente a nivel de duodeno distal, yeyuno y colon, y por tanto de utilidad para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias intestinales como colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn.

Este objetivo se aborda fundamentalmente en el capítulo 6 de la presente memoria.

El trabajo experimental realizado para alcanzar estos objetivos se ha recogido en la presente memoria estructurado en 6 capítulos:

- Capítulo 3: Síntesis y caracterización de un nuevo polímero de poliacrilato de magnesio: PAMgA
- Capítulo 4: Desarrollo de comprimidos matriciales de liberación prolongada: estudios preliminares.
- Capítulo 5: Desarrollo de comprimidos matriciales de metformina
- Capítulo 6: Desarrollo de comprimidos matriciales de budesonida
- Capítulo 7: Discusión general
- Capítulo 8: Conclusiones

Parte de este trabajo se ha realizado en colaboración con los profesores Rubio-Retama y López-Cabarcos del Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas de la Universidad Complutense de Madrid, a través de una estancia de investigación (septiembre de 2015 a marzo de 2016); y en colaboración con los profesores Otero Espinar y Blanco Méndez del Departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Santiago de Compostela a través de varias estancias de investigación desde junio de 2016 a octubre de 2017.

El capítulo 5 comprende la publicación "*CONTROLLED RELEASE OF HIGHLY HYDROPHILIC DRUGS FROM NOVEL POLY(MAGNESIUM ACRYLATE) MATRIX TABLETS*",

publicada en la revista Pharmaceutics (Q1 en la lista “Farmacología y Farmacia” del JCR) en febrero de 2020.

3. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO POLÍMERO DE POLIACRILATO DE MAGNESIO: PAMgA

En este capítulo se lleva a cabo la síntesis y la caracterización del polímero por diferentes técnicas analíticas: DSC, FTIR, RAMAN; SEM y se determina su biocompatibilidad y toxicidad en un modelo *in ovo* y en modelos animales por diferentes vías de administración. Finalmente, se evalúa su capacidad bioadhesiva en diferentes sustratos y tejido animales.

3.1. *MATERIALES Y MÉTODOS*

3.1.1. Síntesis del polímero de acrilato de magnesio (PAMgA)

La síntesis del polímero de acrilato de magnesio (PAMgA), se realizó en dos etapas: a) la síntesis del monómero de acrilato de magnesio (AMgA) y b) la posterior polimerización a través de radicales libres para dar lugar al poli acrilato de magnesio, al que denominaremos PAMgA.

a) Síntesis del monómero de acrilato de magnesio (AMgA)

La síntesis del monómero de acrilato de magnesio (AMgA), se llevó a cabo a través de una reacción de neutralización, siguiendo el método descrito por Rubio-Retama *et al.*. Sobre una solución de 1 mol de hidróxido de magnesio (Sigma-Aldrich España, Madrid, España) en agua destilada, se añaden 2 moles de ácido acrílico (Sigma-Aldrich España, Madrid, España) gota a gota y se mantiene bajo constante agitación en un agitador de turbina a 400 rpm (Turbina RW 14 basic, IKA®, Labor Technik, Alemania) a temperatura controlada (18 ºC). Pasadas 24 horas en agitación, la dispersión blanquecina se vuelve transparente, indicando el final de la reacción de neutralización. La formación del monómero AMgA, por tanto, ha finalizado (Rubio-Retama et al., 2007).

Se procede a la comprobación del pH de la solución, ajustando con ácido clorhídrico (HCl 37%) o hidróxido sódico (NaOH 5N) hasta pH neutro si fuera necesario, y posteriormente la solución obtenida es filtrada. Finalmente, se concentra al 25 % v/v la solución de monómero (% por gramo de monómero) en un Rotavapor R-215 (Büchi

Labortecnik, Suiza) a 60 rpm equipado con un controlador de vacío V-850 (Büchi Labortecnik, Suiza).

b) Polimerización de la solución de acrilato de magnesio (PAMgA)

La síntesis del polímero de acrilato de magnesio (PAMgA) se realizó por el método de polimerización a través de radicales libres, usando persulfato de amonio (PSA) (Sigma-Aldrich España, Madrid, España) como iniciador y TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina) (Sigma-Aldrich España, Madrid, España) como catalizador de la reacción (Cheddadi et al., 2011).

La síntesis del polímero se llevó a cabo a dos concentraciones de PSA (iniciador), 5 mM (PAMgA 5) y 40 mM (PAMgA 40), con el objetivo de obtener dos hidrogeles con diferente entrecruzamiento. Una vez la reacción de polimerización ha concluido, se procede a la diálisis del polímero con el objetivo de eliminar restos de impurezas y restos de monómero AMgA sin reaccionar. Para ello el polímero se mantuvo en agua bidestilada durante una semana, procediendo al reemplazo diario del medio, hasta obtener una conductividad constante. Finalmente, el polímero PAMgA se liofilizó (Liofilizador LIOALFA-6, Telstar, Madrid, España) y el polvo obtenido se tamizó por 0,80 mm de luz de malla. Se obtuvo un polvo fino, para ser usado como excipiente en la elaboración de comprimidos.

3.1.2. Caracterización de PAMgA 5 y PAMgA 40

Para llevar a cabo la caracterización del polímero PAMgA se usaron los polímeros en forma de polvo a excepción de los ensayos de bioadhesion, hinchamiento y erosión y porosimetría por intrusión de mercurio que se utilizaron comprimidos cilíndricos planos de cada uno de los polímeros elaborados, PAMgA 5 y PAMgA 40 elaborados por compresión directa del polvo del hidrogel.

3.1.2.1. Calorimetría diferencia de barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica que detecta transiciones endotérmicas y exotérmicas, utilizada para poder determinar las temperaturas de transformación (temperatura de transición vítrea, temperatura de fusión…) así como la entalpía, de los sólidos y líquidos. Para realizar el análisis se usa una referencia, que se mantiene a la misma temperatura que la muestra, y se medirá el flujo de calor.

Se realizó un análisis térmico de ambos polímeros, PAMgA 5 y PAMgA 40, en polvo, utilizando un calorímetro diferencial de barrido (Mettler 820 DSC, Mettler Toledo, Greifensee, Suiza) equipado con un controlador TAC 7/DX y un software aSTARe SW9.10 para el tratamiento de los datos.

La escala de temperatura se calibró usando las temperaturas de fusión del Indio el Zinc. El flujo de nitrógeno y el incremento de temperatura se fijaron en 80 mL/min y 10°C/min, respectivamente. Las muestras de ambos polímeros (4 – 5 mg) se metieron en cápsulas de aluminio sellados y fueron analizadas en un rango de temperaturas de −90 ºC hasta 250 ºC, enfriadas de 250 ºC a - 90 ºC y calentadas de nuevo hasta 250 ºC. Como referencia se usó una cápsula de aluminio vacía. Las muestras fueron analizadas por duplicado.

3.1.2.2. Espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La espectrofotometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) proporciona un espectro de reflexión de las bandas de los grupos funcionales de las sustancias inorgánicas y orgánicas, aportando información directamente relacionada con los grupos funcionales que componen la estructura molecular de un compuesto. En ocasiones permite la identificación cualitativa inequívoca de un determinado compuesto ya que cada molécula presenta un espectro IR característico.

El espectro infrarrojo por transformada de Fourier de los polímeros PAMgA en polvo (PAMgA 5 y PAMgA 40) se evaluó mediante un espectrofotómetro Nicolet IR200 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) en un intervalo de longitud de onda de 400–4000 cm−1 a temperatura ambiente. Las muestras (5 – 10 mg) se secaron previamente en un desecador hasta peso constante, posteriormente se realizó una dispersión con bromuro potásico (KBr) en una proporción de KBr del 40% p/p.

3.1.2.3. Espectroscopia RAMAN

Se trata de una técnica analítica espectroscópica que estudia modos de baja frecuencia como los vibratorios, rotatorios, y otros. La técnica presenta la dispersión inelástica, o dispersión Raman, de un láser de luz visible, IR cercano o UV cercano monocromática.

Ambos hidrogeles, PAMgA 5 a PAMgA 40, en polvo, fueron analizados por microscopía RAMAN empleando un microscopio RAMAN confocal modelo ALPHA300 R+ (WITec, Ulm, Alemania) en una longitud de onda entre 100 y 3700 cm^{-1}. Se utilizó un láser de diodo emitiendo a 35 mW como emisor de la radicación de excitación. El haz de excitación se enfocó sobre la superficie de las muestras a través de una lente de 100 x. La resolución espectral fue de 4 cm-1. Cada espectro es el promedio de 3 adquisiciones con 100 segundos. La preparación de las muestras consistió en depositarlas sobre láminas de vidrio que secaron mediante flujo de aire durante 48 horas a temperatura ambiente.

3.1.2.4. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) proporcionan información sobre la superficie de la muestra, la apariencia, morfología y tamaño de las estructuras formadas. Se analizaron muestras de los dos polímeros, PAMgA 5 y PAMgA 40, en polvo, que se adhirieron con adhesivo de doble cara sobre porta muestras cilíndricos. Además, se analizaron comprimidos de cada uno de los polímeros, en los que se observó la superficie y el corte transversal.

Las muestras se desecaron en un desecador Q150TE Evaporador QUORUN (Aname Instrumentación Científica, Quijorna, Madrid, España) y posteriormente se realizó un recubrimiento por sputtering de polvo de oro-paladio utilizando un turbo metalizador Q150RS Metalizador QUORUM (Aname Instrumentación Científica, Quijorna, Madrid, España). Las imágenes se tomaron con un microscopio de barrido SEM Jeol, JSM-6335G (Jeol, Taiwan, Japon).

3.1.2.5. Porosimetría por inyección de mercurio

La porosimetría por inyección de mercurio es una técnica indirecta para la caracterización de sistemas porosos, como pueden ser los comprimidos matriciales, obteniéndose la distribución de la porosidad en función del tamaño aparente de los poros. El ensayo consiste en inyectar mercurio (compuesto líquido que no moja los sólidos) a presión y registrar el volumen de mercurio absorbido. El volumen de mercurio absorbido, por lo tanto, nos indica el volumen de poros de la muestra.

Los comprimidos elaborados con PAMgA 5 y PAMgA 40 se analizaron con un porosímetro de inyección de mercurio AutoPore® IV 9500 Series (Micromeritics, Georgia, EEUU) con el fin de determinar su porosidad y la distribución del tamaño de poro en los mismos.

Para la realización del ensayo se usaron dos comprimidos de cada polímero sintetizado. Las medidas a baja presión se realizaron en un intervalo de 0 a 0,2 MPa, mientras que las medidas a altas presiones se realizaron en un intervalo de 0,2 a 212 MPa. Para los ensayos se asumió que la tensión superficial del mercurio es de 480 mN/m y que el ángulo de contacto con cloruro sódico es de 140º. Para el tratamiento de los datos obtenidos se usó el software PoreXpert modelling & analysis software v 1 (PoreXpert Ltd, Exmouth, Reino Unido).

3.1.2.6. Estudios de hinchamiento y erosión

El estudio se realiza para evaluar los cambios en la estructura de los hidrogeles, PAMgA 5 y PAMgA 40, que se producen cuando están en contacto con los fluidos del tubo digestivo, y la aparición y progresión de los frentes de hinchamiento y erosión. Para llevar a cabo este estudio se utilizaron los comprimidos elaborados con cada uno de los polímeros, que se pusieron en contacto con dos medios biorrelevantes diferentes: fluido gástrico simulado en ayunas (FaSSGF - Fasted state gastric conditions) a pH 1,2 y fluido intestinal simulado antes de la ingesta (FaSSIF - Fasted state conditions in the small intestine) a pH 6,8. La composición de los fluidos biorrelevantes se detalla en el capítulo 4 de la presente tesis doctoral. Como blanco se utilizó agua bidestilada.

Los comprimidos de polímero se depositaron en placas Petri con 50 mL de cada uno de los medios biorrelevantes. A cada medio se adicionó 0,004 % de azul de metileno, para poder mejorar la observación de los diferentes fenómenos. Se colocó una placa Petri sobre la superficie del comprimido y en contacto directo con el medio, de modo que el comprimido únicamente era capaz de captar el medio de disolución por la parte lateral, no por las bases. Estas placas se llevaron a una incubadora termostatizada a 37ºC, para asimilar la temperatura en el tracto gastrointestinal. A diferentes tiempos se realizó una comprobación visual de los diferentes frentes de hinchamiento y erosió, que se fotografiaron con una cámara digital NIKON COOLPIX S9100 (Nikon España, Barcelona Estaña) y se caracterizaron mediante el software Image Pro Plus v 6.0 (Media Cybernetics, Inc., Maryland, EEUU). Como posición inicial se tomó el valor del diámetro inicial del comprimido al comienzo del ensayo (tiempo 0). Los movimientos de los diferentes frentes hacia el interior del comprimido se representan con valores negativos, mientras que los movimientos hacia la parte exterior del comprimido se representan con valores positivos.

3.1.2.7. Estudios de bioadhesion

Los ensayos de bioadhesion se realizaron para estimar la capacidad mucoadhesiva del polímero PAMgA en el tracto gastrointestinal, tras una administración oral en forma de comprimidos matriciales. Adicionalmente, se evaluó el posible uso de este hidrogel como excipiente para comprimidos mucoadhesivos de administración por otras vías, como la vía vaginal.

Podemos dividir los ensayos de bioadhesion realizados en este estudio en dos tipos: los ensayos *in vitro* realizados con piel curtida de cabra como sustrato y utilizado como modelo de adhesión, y los ensayos *ex vivo*, realizados en tejidos animales.

a) Ensayos in vitro: Piel curtida

Para determinar la capacidad bioadhesiva de los comprimidos elaborados con el polímero PAMgA se usaron los resultados obtenidos de fuerza máxima de desprendimiento y el trabajo de bioadhesion utilizando como sustrato piel curtida de cabra, seleccionado como modelo para determinar la bioadhesión (Blanco-Fuente et al., 1996b, 1996a). Se utilizaron los dos medios biorrelevantes: FaSSGF a pH 1,2 y FaSSIF a pH 6,8 también utilizados en el estudio de hinchamiento y erosión. El uso de estos medio biorrelevantes viene determinado para poder establecer una correlación entre los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* con los ensayos *ex vivo* realizados en mucosa gástrica y mucosa duodenal porcina.

Para este ensayo se utilizó un texturómetro TA-XT Plus (TA Instruments, Newcastle, Reino Unido). Los comprimidos se adhieren a la sonda cilíndrica superior del texturómetro utilizando cinta adhesiva de doble cara, por otro lado, la piel curtida se pega, utilizando un adhesivo de cianoacrilato, al centro de una placa Petri, que a su vez se fija al soporte inferior del texturómetro usando una pinza.

Estos ensayos in vitro con piel curtida, se realizaron en dos condiciones experimentales:

- Contacto directo entre el comprimido y la piel curtida, donde el medio de disolución era limitado, y el cuero no estaba hidratado.
- Exceso de medio, donde no había limitación de medio de disolución: este método se deriva del anterior, y en él, el cuero es sumergido en los medios biorrelevantes para posteriormente ejecutar el ensayo.

Para los ensayos en los que el medio de disolución es limitado, se añadieron 0,25 µL de cada uno de los medios biorrelevantes a ensayar, a temperatura ambiente y en el centro del sustrato, coincidiendo con el punto de contacto entre el comprimido y el sustrato. A continuación, la sonda superior, con el comprimido adherido, comienza a desplazarse hacia abajo a una velocidad constante de 1 mm/s hasta que se establece el contacto entre el comprimido, el medio biorrelevante y el sustrato. Para el ensayo se aplicó una fuerza de 50 N durante 60 segundos que permite asegurar el contacto entre el comprimido y el sustrato y, posteriormente, la sonda retrocedió hasta su posición inicial a una velocidad de 1 mm/s. Los resultados obtenidos se expresan como fuerza de desprendimiento frente al alargamiento.

Para los ensayos con exceso de medio, el cuero se cubre completamente (50 mL aproximadamente) con cada uno de los medios a ensayar, FaSSGF y FaSSIF, a una temperatura de 37 ºC, para simular las condiciones de temperatura del tracto gastrointestinal. Los ensayos se ejecutaron con las mismas condiciones experimentales previamente mencionadas: velocidad constante de 1 mm/s de subida y bajada de la sonda aplicando una fuerza de 50 N durante 60 segundos. El trabajo de bioadhesión in vitro se calculó como el área bajo la fuerza - curva de alargamiento.

b) Ensayos ex vivo: mucosa gástrica y duodenal porcina, y mucosa vaginal bovina

Para los ensayos *ex vivo*, se utilizaron tejidos animales obtenidos del matadero local (Compostelana de Carnes S.L., Santiago de Compostela, España), después de que el animal había sido sacrificado. Los tejidos seleccionados para los ensayos ex vivo fueron: mucosa gástrica porcina; duodeno proximal porcino y mucosa vaginal bovina.

Una vez recibidos los tejidos, se procedió a su limpieza, primero con agua bidestilada y posteriormente con fluidos simulados. La mucosa gástrica porcina con medio FaSSGF (pH 1,2) y el duodeno proximal porcino con fluido intestinal simulado tras la administración de alimento (FeSSIF-Fed state conditions in the small intestine) a pH 5.0, cuya composición también se encuentra detallada en el capítulo 6, con el fin de eliminar los residuos gástricos que pudieran quedar.

Estos sustratos una vez limpios, se sumergieron en FaSSGF y FeSSIF respectivamente durante 5 minutos a una temperatura de 37ºC. Posteriormente, los sustratos se adhirieron a una placa Petri con adhesivo de cianoacrilato y se colocaron 100 µL de medio biorrelevante en la zona de contacto del comprimido con el sustrato. A la sonda superior se pegaron los comprimidos del polímero PAMgA, con cinta adhesiva de doble cara. El ensayo se llevó a cabo con las siguientes condiciones experimentales: velocidad de la sonda 1 mm/s; fuerza 50 N y tiempo de contacto 60 segundos. Se registraron los resultados de fuerza de desprendimiento frente a alargamiento hasta el desprendimiento completo del comprimido. El trabajo de mucoadhesión se calculó como el área bajo la fuerza - curva de alargamiento.

Adicionalmente, se realizó el ensayo de mucoadhesión en mucosa vaginal bovina con el fin de determinar el posible uso del polímero PAMgA para la elaboración de comprimidos de administración por vía vaginal. Para ello el tejido animal se limpió con agua bidestilada y posteriormente con fluido vaginal simulado (SVF) a pH 4,2. La composición del fluido vaginal simulado se recoge en la siguiente tabla 3.1 (Owen and Katz, 1999).

Tabla 3.1. Composición del fluido vaginal simulado (SVF)

Componente	**SVF**
Cloruro sódico (NaCl)	3,51 g
Hidróxido potásico (KOH)	1,40 g
Hidróxido Cálcico ($Ca(OH)_2$)	0,222 g
Albumina sérica bovina	0,018 g
Ácido láctico	2.00 g
Ácido acético	1.00 g
Glicerol	0,16 g
Urea	0,40 g
Glucosa	5.00 g
Ácido clorhídrico c.s.	pH 4,2
Agua bidestilada c.s.p.	1 L
pH	4,2

La mucosa vaginal bovina se sumergió en el fluido vaginal simulado a pH 4,2 y temperatura de 37 ºC durante 5 minutos, posteriormente, se adhirió a una placa Petri usando un adhesivo de cianoacrilato. Los comprimidos blancos de PAMgA 5 y PAMgA 40 se unieron a la sonda superior del texturómetro con cinta adhesiva de doble cara. El ensayo tuvo lugar con las siguientes condiciones experimentales: volumen de medio 100 µL; velocidad de la sonda 1 mm/s; fuerza 50 N y tiempo de contacto 60 segundos. Se registraron los resultados de fuerza de desprendimiento frente a alargamiento. El trabajo de mucoadhesión se calculó como el área bajo la fuerza - curva de alargamiento.

3.1.2.8. Determinación del efecto irritante del polímero PAMgA: Método HET-CAM

El método HET-CAM (Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane), en un método alternativo a la experimentación con animales, clasificado dentro de los métodos organotípicos, que utiliza la membrana corioalantoidea (CAM) de huevos embrionados

de pollo. Es utilizado para identificar el potencial irritante y/o para cuantificar el índice de irritación de excipientes, principios activos o formulaciones finales.

El potencial irritante del polímero PAMgA, se evaluó usando este ensayo *in ovo*. Se analizaron los dos grados de reticulación del polímero, PAMgA 5 y PAMgA 40. El ensayo se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones de ICCVAM - Protocolo de Método de Prueba Recomendado: Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM), 2010).

Para el desarrollo del ensayo HET-CAM se necesitaron huevos de pollo Broiler fecundados, con un peso entre 50 - 60 g. Estos huevos fueron introducidos en una incubadora (Ineltec, modelo CC SR 0150, Barcelona) a temperatura y humedad controlada: 38,0 ± 0,5° C de temperatura y 70% de humedad relativa. Los huevos se mantuvieron en posición horizontal en incubación, rotándolos un cuarto de vuelta durante ocho días. El último día se colocaron con la cámara de aire hacia arriba para que esta bajara y poder así realizar el ensayo. Al noveno día de incubación se realiza la apertura del huevo cortando la cáscara en la zona de la cámara de aire (zona más ancha). La membrana interna de la cáscara, que protege la CAM, se hidrata con la solución cloruro sódico (NaCl al 0,9 % (p/v)) durante 15 minutos y se despega para exponer la membrana corioalantoidea (CAM) y poder realizar el ensayo (figura 3.1).

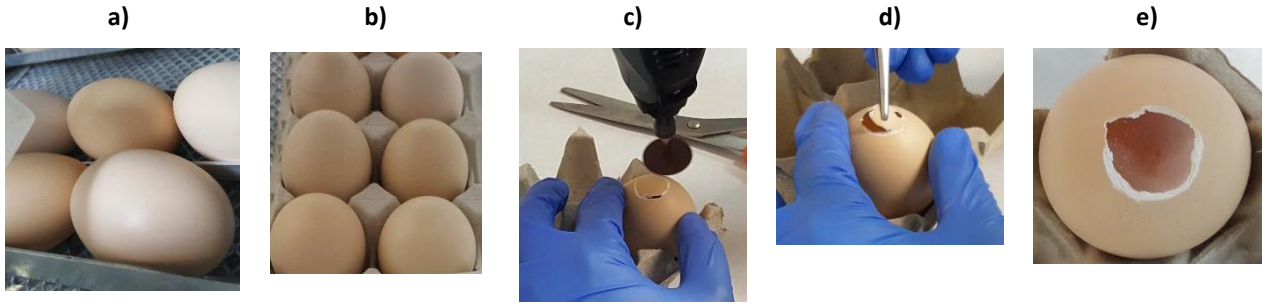


Figura 3.1: Protocolo de trabajo *in ovo* HET-CAM: a) Incubación de los huevos y rotación durante 8 días; b) al noveno día se colocan los huevos con la cámara de aire del huevo hacia arriba c) romper la cáscara del huevo usando una sierra giratoria y d) retirar la cáscara e) exponer la CAM permitiendo una mayor manipulación experimental.

Para realizar el ensayo, se prepararon soluciones de cada uno de los polímeros en agua bidestilada a dos concentraciones: 0,1 y 0,5 % p/v. Como control negativo se utilizó una solución de cloruro sódico NaCl 0,9 % (p/v), y como control positivo se usó una solución de hidróxido sódico NaOH 0.1 N. Para el ensayo se depositaron 0,30 mL de cada solución del polímero en la CAM y se observó durante 300 segundos (5 minutos) al microscopio (Olympus SZ-STN) para evaluar los cambios morfológicos que se producían en la CAM. Se anotaron los tiempos de hemorragia (sangrado desde los vasos), lisis vascular (desintegración de los vasos sanguíneos) y coagulación (desnaturalización de proteínas intra- y extra-vasculares). El índice de irritación (IS – irritation score) se calculó utilizando el método de análisis B (ecuación 3.1):

$$IS = 5\,x\,\frac{(301-Hem\,t)}{300} + 7\,x\,\frac{(301-Lis\,t)}{300} + 9\,x\,\frac{(301-Coa\,t)}{300} \qquad (3.1)$$

Dónde:

Hem t es tiempo de hemorragia, *Lis t* es tiempo de lisis vascular y *Coa t* es tiempo de coagulación. Para cada una de las sustancias se ha utilizado un huevo diferente, realizando cada uno de los ensayos de manera independiente y por triplicado. La tabla 3.2 detalla la clasificación de los compuestos según el resultado del índice de irritación (IS):

Tabla 3.2. Clasificación de las muestras según el ensayo HET-CAM

Índice de irritación (IS)	Clasificación
IS < 1	No irritante
1 ≤ IS < 5	Ligeramente irritante
5 ≤ IS < 9	Moderadamente irritante
9 ≤ IS < 21	Irritante severo

3.1.2.9. Estudios de toxicidad aguda tras la administración oral de elevadas dosis de PAMgA con alimentos.

Para evaluar los posibles usos del polímero PAMgA sintetizado, se realizaron una serie de ensayos de toxicidad por diferentes vías de administración: vía subcutánea, vía intraperitoneal y vía oral. Los procedimientos de experimentación animal fueron aprobados por el Comité de ética de la Universidad Complutense de Madrid. Los estudios correspondientes a la administración por las vías subcutánea, intraperitoneal y oral a bajas dosis, fueron realizados previamente por nuestro grupo de investigación (Cheddadi et al., 2011). Los estudios por vía oral a altas dosis forman parte del trabajo experimental que comprende esta tesis doctoral.

Se evaluó la toxicidad aguda del polímero PAMgA (PAMgA 5 y PAMgA 40) tras una administración por vía oral de elevadas dosis de polímero junto con alimentos. Los procedimientos de experimentación animal fueron aprobados por el Comité de ética de la Universidad Complutense de Madrid (PROEX 148/17, 3 de noviembre de 2017, Madrid, España) y realizados de acuerdo con la Directiva 010/63/UE del Consejo de la Comunidad Europea. Con este estudio de biocompatibilidad *in vivo* a altas dosis de polímero, se quiere determinar la toxicidad aguda del polímero PAMgA tras una administración por vía oral.

El estudio se llevó a cabo con ratones adultos (Swiss macho) (30 ± 2 g), divididos en seis grupos, que recibieron los polímeros PAMgA 5 y PAMgA 40 a diferentes dosis, conjuntamente con pienso. Los ratones se mantuvieron, previamente, en condiciones estandarizadas de temperatura de 22ºC, con ciclos de luz/oscuridad de 12 h, y alimentación y agua *ad libitum*.

El polímero PAMgA se administró al estado sólido, mezclado en diferentes proporciones con el alimento de mantenimiento. Para ello se elaboraron unos pellets de pienso con polímero en una relación 10:2, con un peso total aproximado de 2 g. Para garantizar la ingestión del polímero, se privó a los ratones de alimentos 24 horas, antes del comienzo del ensayo. Para conseguir una diferencia en la ingesta del polímero, cada

animal se aísla en una jaula con un pellet, agua y bajo observación. Cuando el animal ha consumido una cantidad adecuada de alimento, se retira el pellet y se pesa; si no ha ingerido la dosis de polímero necesaria, se vuelve a introducir el pellet en la jaula y se continua el ensayo. El tiempo máximo de ingesta permitido en el ensayo fue de 4 h. Para determinar la cantidad exacta de hidrogel ingerido por cada ratón, se calculó la diferencia, entre el peso inicial de los pellets (2 g) y el peso final restante después de la ingestión. Para unificar la dosis administrada a los ratones, cuando el peso del pellet ingerido se desvía de los valores de referencia (tabla 3.3), el animal fue rechazado.

Tabla 3.3. Grupos experimentales para el ensayo de biocompatibilidad por vía oral dosis altas con alimentos**.**

Grupo	PAMgA 5	Grupo	PAMgA 40
I/O	1 ± 0,2 g/Kg	**IV/O**	1 ± 0,2 g/Kg
II/O	5 ± 1 g/Kg	**V/O**	5 ± 1 g/Kg
III/O	10 ± 2 g/Kg	**VI/O**	10 ± 2 g/Kg

Para la evaluación del comportamiento general y la aparición de síntomas se observaron los cambios en movilidad, vómitos, inquietud, chirridos y/o diarrea que se supervisaron a tiempos determinados: 1, 4, 8, 24, 48 y 72 h, y diariamente hasta el final del ensayo, 14 días.

Se evaluó la respuesta de los animales tras la administración oral del polímero PAMgA, mediante la escala de puntuación de 0 a 2, previamente descrita, donde cero significa que no ha habido respuesta por parte del animal, o ha tenido una respuesta normal; 1 se refiere a un único episodio o una respuesta ligera, y 2 es más de un evento o una respuesta grave a la administración del polímero por vía oral.

Se realizaron controles de peso y, al final del ensayo, los animales fueron sacrificados y diseccionados para la observación de los órganos y del tracto gastrointestinal.

3.2. *RESULTADOS*

3.2.1. Síntesis del polímero de acrilato de magnesio (PAMgA)

La síntesis del hidrogel poliacrilato de magnesio se llevó a cabo en dos etapas: a) la preparación de la solución de monómero de acrilato de magnesio (AMgA) y b) la síntesis del poli (acrilato de magnesio) mediante una polimerización a través de radicales libres (PAMgA) siguiendo el método descrito por Rubio-Retama *et al*.

La elaboración del monómero se realizó mediante una reacción de neutralización espontanea entre el ácido acrílico y la solución acuosa de hidróxido de magnesio. Durante la síntesis se ha mantenido, en todo momento, el control de la temperatura de la solución de monómero por debajo de 18 ºC, ya que, si se incrementa mucho la temperatura durante la reacción de neutralización, se podría producir una polimerización espontanea en condiciones diferentes a las requeridas. El monómero obtenido presentó un aspecto límpido y transparente, con un color ligeramente amarillento (figura 3.2).

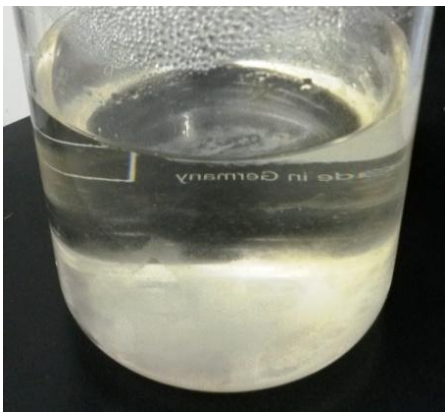


Figura 3.2. Aspecto de la solución de monómero de acrilato de magnesio (AMgA).

Una vez sintetizado el monómero AMgA, se llevó a cabo la polimerización del mismo con las dos concentraciones de PSA, 5 mM y 40 mM, y TEMED como catalizador de la reacción, obteniendo dos polímeros con diferente grado de reticulación. La reacción

resulta muy rápida (5 minutos) debido al uso del catalizador, dando lugar a una sustancia viscosa y blanquecina. En la figura 3.3 se muestra el aspecto que presenta el polímero PAMgA ya formado a ambas concentraciones de iniciador, antes del proceso de diálisis y liofilización. Como se puede observar en la fotografía, no se aprecia ninguna diferencia visible en cuanto a su aspecto.

Figura 3.3. Fotografía del polímero PAMgA (a) con una concentración de 5 mM de PSA y (b) con una concentración 40 mM de PSA.

El PSA, es el encargado de realizar el entrecruzamiento entre las diferentes moléculas de monómero. Este entrecruzamiento se produce por interacciones electrostáticas entre el magnesio (Mg^{2+}) y los grupos carboxílicos (COO^-) de las cadenas de ácido acrílico (Wurm et al., 2020a). Estas interacciones están estrechamente relacionadas con el pH, ya que los enlaces de hidrógeno sólo se forman cuando se protonan los grupos carboxílicos de las cadenas poliméricas. Al añadir carga a los grupos carboxílicos, estos aumentan su solubilidad en el medio, por lo que el polímero se extiende y se hincha, aumentando su viscosidad. Esto favorece la captación de agua entre las cadenas poliméricas, por lo que el hinchamiento de los hidrogeles es dependiente del pH (Knoos et al., 2015).

Por otro lado, en las reacciones de polimerización a través de radicales libres el iniciador juega un papel crucial. Cuando la cantidad de iniciador y monómero son bajas, la red del polímero no se puede formar de manera eficiente, debido a la falta de radicales para la polimerización. Por el contrario, a medida que aumenta el iniciador se producen mayor número de uniones, contribuyendo a la formación de la red polimérica.

Estos entrecruzamientos entre las cadenas de monómero, está directamente relacionado con la capacidad del polímero para albergar moléculas de agua en su estructura, por lo que a medida que se aumenta la concentración de iniciador en el polímero, se aumenta la absorción de agua del mismo (Luo et al., 2018; Otegui et al., 2009).

Por tanto, las diferentes cantidades de iniciador estudiadas, 5 mM y 40 mM, nos permite obtener dos tipos diferentes de hidrogel con distintos comportamientos físico-químicos y con diferentes capacidades de hinchamiento. Los dos polímeros sintetizados, se diferencian en la longitud de sus cadenas poliméricas: el polímero sintetizado con una concentración de 5mM de PSA (PAMgA 5), tendrá cadenas largas lineales de monómero de acrilato de magnesio entre los puntos de entrecruzamiento, y el polímero sintetizado con una concentración de 40 mM de PSA (PAMgA 40), tendrá una estructura más reticular, con mayor número de uniones entre las cadenas de monómero.

El rendimiento obtenido en la síntesis del polímero fue alto para ambos grados de reticulación, PAMgA 40 (85,0 %) y PAMgA 5 (71,2 %). Este menor rendimiento del polímero de 5 mM de PSA es probablemente debido a la pérdida de parte del polímero sintetizado en el proceso de lavado con agua bidestilada, ya que, al contener menor cantidad de iniciador, PSA, posee una menor reticulación de la estructura del hidrogel y por tanto se desprenden con mayor facilidad las cadenas de ácido acrílico.

Una vez liofilizados los dos polímeros sintetizados, PAMgA 5 y PAMgA 40 se obtuvo una espuma dura de color blanco - amarillento que se pulverizó en mortero. No se apreció ningún cambio en el aspecto ni la dureza de la espuma para los dos polímeros sintetizados. Finalmente, para seleccionar el tamaño de partícula adecuado, el polímero se tamizó por una luz de malla de 0,8 mm, obteniéndose un sólido pulverulento blanquecino o ligeramente amarillento que denominamos, en función de la cantidad de iniciador: PAMgA 5 y PAMgA 40.

3.2.2. Caracterización de los polímeros PAMgA 5 y PAMgA 40

3.2.2.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los termogramas obtenidos por DSC de PAMgA 5 y PAMgA 40 se muestran en la Figura 3.4. Ambos polímeros fueron sometidos a dos ciclos de calentamiento con temperaturas comprendidas entre - 90 y 250 ºC. En el primer ciclo de calentamiento mostró un pico endotérmico ancho alrededor de 100 - 120ºC, que desapareció en el segundo calentamiento, por lo que este pico corresponde a la pérdida de humedad presente en las muestras del polímero. No de detectaron temperaturas de transición vítrea (Tg) o temperatura de fusión del polímero en este rango de temperatura estudiado.

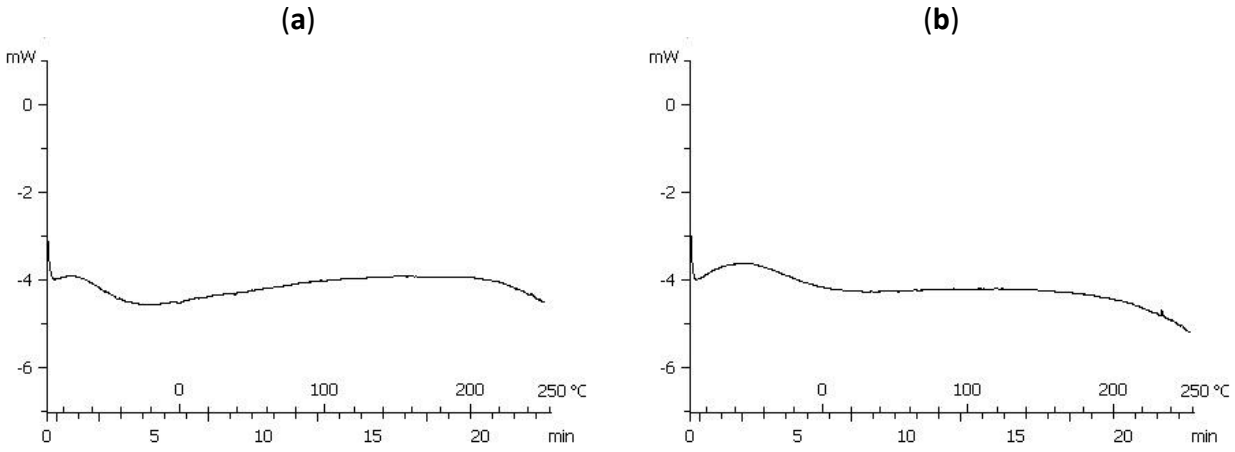


Figura 3.4. Termogramas obtenidos en el segundo ciclo de calentamiento (a) PAMgA 5 and (b) PAMgA 40.

3.2.2.2. Espectro infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

Se empleó la espectroscopia FTIR para estudiar la estructura de ambos polímeros sintetizados, PAMgA 5 y PAMgA 40, los espectros se han obtenido utilizando el método de pellet con bromuro potásico (KBr) (Figura 3.5). El pico amplio en la región 3550–2500 cm^{-1} se atribuye a las vibraciones de estiramiento –OH de los grupos carboxílicos. Este mismo pico entre 3500 – 3250 cm^{-1} se debe a la interacción molecular por enlaces de

hidrogeno con el grupo hidroxilo. La interacción C-H puede observarse en un pico justo antes de 3000 cm^{-1} (Chuah et al., 2018). Los grupos de C=O de los grupos carboxílicos también están asociados con dos bandas específicas en el rango de 1610–1400 cm^{-1}. Estas bandas aparecen como una vibración de estiramiento asimétrica entre 1610-1550 cm^{-1} y un pico de vibración de estiramiento simétrico del $–COO^{–}$ en el rango de 1450-1400 cm^{-1}.

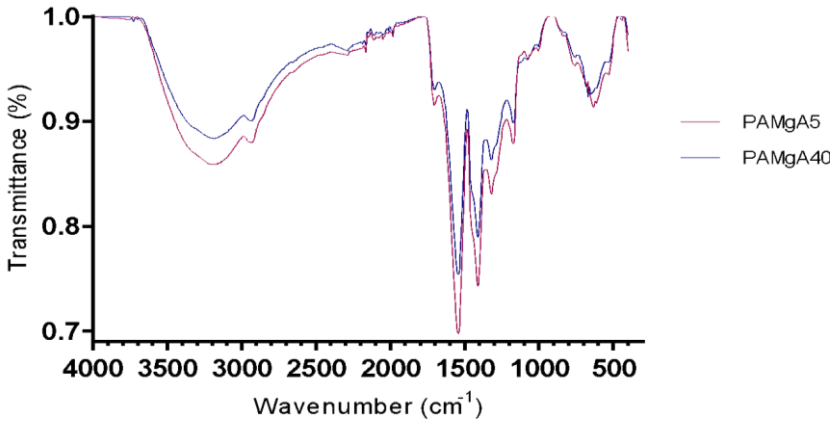


Figura 3.5. Espectro FT-IR de PAMgA 5 y PAMgA 40.

3.2.2.3. Espectroscopia RAMAN

La espectroscopia de RAMAN se utilizó para caracterizar los polímeros sintetizados, PAMgA 5 y PAMgA 40. Como se muestra en la Figura 3.6, ambos espectros obtenidos son superponibles, presentado los mismos picos en su estructura. Se pueden observar vibraciones de baja frecuencia del enlace carbono-carbono (C–C) alrededor de los 800 cm-1. Las vibraciones del enlace C–H tienen una frecuencia más alta, que las vibraciones del C–C, porque el hidrógeno es más ligero que el carbono. Estas bandas de estiramiento CH o CH_2 se pueden observar a 2935 cm^{-1}.

Por otro lado, se observan las bandas de vibraciones de dos átomos de carbono unidos por fuertes enlaces dobles (C=C) en torno a los 1600 cm^{-1}, correspondientes a las cadenas de ácido acrílico.

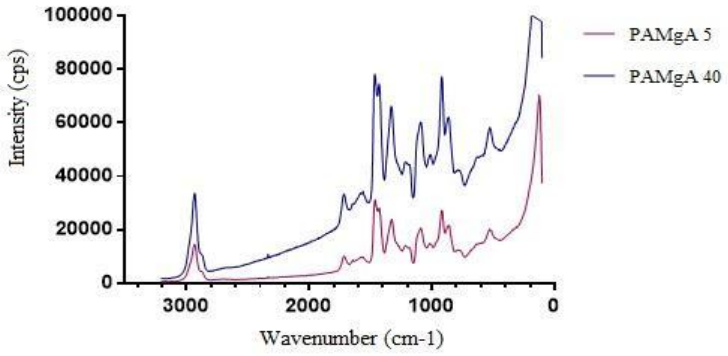


Figura 3.6. Espectro RAMAN de PAMgA 5 y PAMgA 40.

3.2.2.4. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Las imágenes de SEM (figura 3.7) muestran la estructura del polímero en forma de polvo, para su uso como excipiente de comprimidos. No se observan diferencias evidentes entre ambos hidrogeles, PAMgA 5 y PAMgA 40.

En cuanto a la superficie y corte transversal de comprimidos elaborados con estos polímeros, tampoco se observan diferencia entre la porosidad de ambos comprimidos.

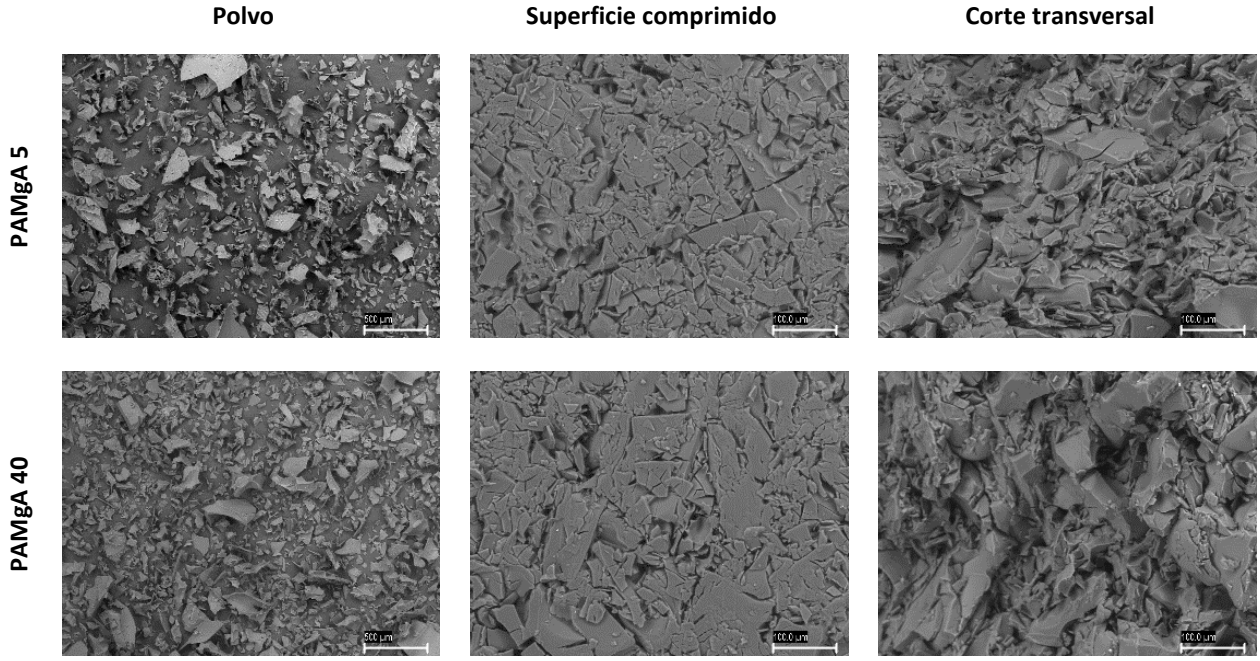


Figura 3.7: Imágenes SEM de los polímeros PAMgA 5 y PAMgA 40 como polvo para su uso como excipiente. Superficie y corte transversal de los comprimidos elaborados con PAMgA 5 y con los comprimidos elaborados con PAMgA 40.

3.2.2.5. Porosimetría por intrusión de mercurio

Para determinar la distribución de la porosidad, en función del tamaño aparente de los poros, en las formulaciones elaboradas con el hidrogel PAMgA, se usaron 2 comprimidos elaborados con cada uno de los polímeros sinterizados, PAMgA 5 y PAMgA 40. En la tabla 3.7 se muestran los resultados obtenidos, analizados con el software PoreXpert modelling & analysis.

El volumen total de intrusión corresponde con el volumen total de mercurio introducido en la muestra tras la máxima aplicación de presión durante el ensayo (mL/g). Este parámetro es equivalente al volumen de poros especifico, es decir, al volumen de poros por gramo de muestra. El polímero PAMgA 40, con un valor de 0,1581 mL/g, obtuvo unos valores superiores que los obtenidos por PAMgA 5.

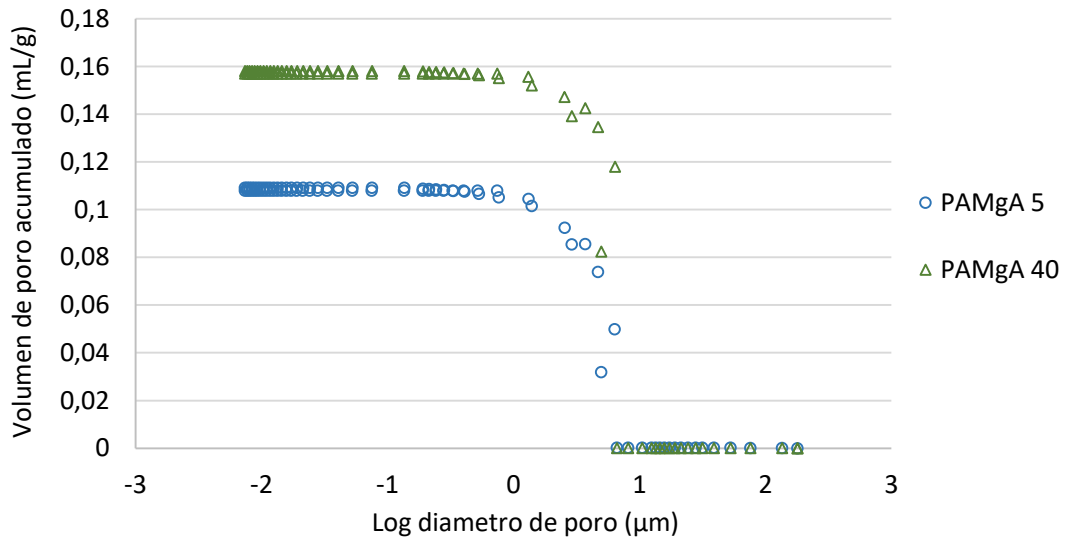


Figura 3.8: Representación gráfica del volumen de poro acumulado con respecto al diámetro de poro de ambos polímeros estudiados PAMgA 5 y PAMgA40.

Siguiendo el modelo de Washburn, que supone que la geometría de los poros es cilíndrica, se calculó el área total de los poros, siendo esta muy similar en ambos polímeros testados, con 0,213 m^2/g para PAMgA 5 y 0,232 m^2/g para PAMgA 40. El diámetro medio de poro de los polímeros se puede expresar en función del volumen o

del área de los poros, dando el valor medio del volumen específico de intrusión (2,90 µm para PAMgA 5 y 4,04 µm para PAMgA 40), o dando el valor medio del área total de los poros (1,71 µm para PAMgA 5 y 2,32 µm para PAMgA 40). Adicionalmente se obtuvieron los resultados del valor medio de diámetro de poro, que se calcula a partir del volumen total intruido y el área de los poros, usando la siguiente ecuación 4V/A. Este valor medio de diámetro de poro es muy similar en ambos polímeros con resultados de 2,04 µm para PAMgA 5 y 2,72 µm para PAMgA 40.

Tabla 3.4. Resultados obtenidos de PAMgA 5 y PAMgA 40 en los ensayos de porosimetría por intrusión de mercurio.

	PAMgA 5	**PAMgA 40**
Peso muestra (g)	0,3956	0,4383
Volumen total de intrusión (mL/g)	0,1091	0,1581
Área total de poros (m^2/g)	0,213	0,232
Diámetro medio de poro – volumen (µm)	2,90	4,04
Diámetro medio de poro – área (µm)	1,71	2,32
Valor medio de diámetro de poro (4V/A)	2,04	2,72
Densidad aparente 1.00 psia (g/mL)	0,49	1,30
Porosidad (%)	5,30	20,50
Permeabilidad (mD)	2,02	10,97
Captación de fluidos (%)	92,35	98,89
Tortuosidad	3,24	3,32

La densidad aparente de la muestra, medida a 1.00 psia, fue de 0,49 g/mL para PAMgA 5 y 1,30 g/mL para PAMgA 40, siendo estos resultados acordes con los obtenidos de densidad esqueletal, que mide la densidad de la parte solida de la muestra, es decir sin espacios, una vez todos los poros son llenados con mercurio.

La porosidad se define como la relación entre el volumen total de los poros y el volumen total de la muestra analizada. El resultado de la porosidad de la formulación elaborada con el hidrogel PAMgA 40, fue del 20,5%, significativamente mayor que la obtenida para la formulación elaborada con PAMgA 5 (5,3 %). Se observa la misma

diferencia en los resultados de permeabilidad, ya que los datos obtenidos para PAMgA 40 fueron de 10,97 mD, en comparación con 2,02 mD obtenidos para PAMgA 5.

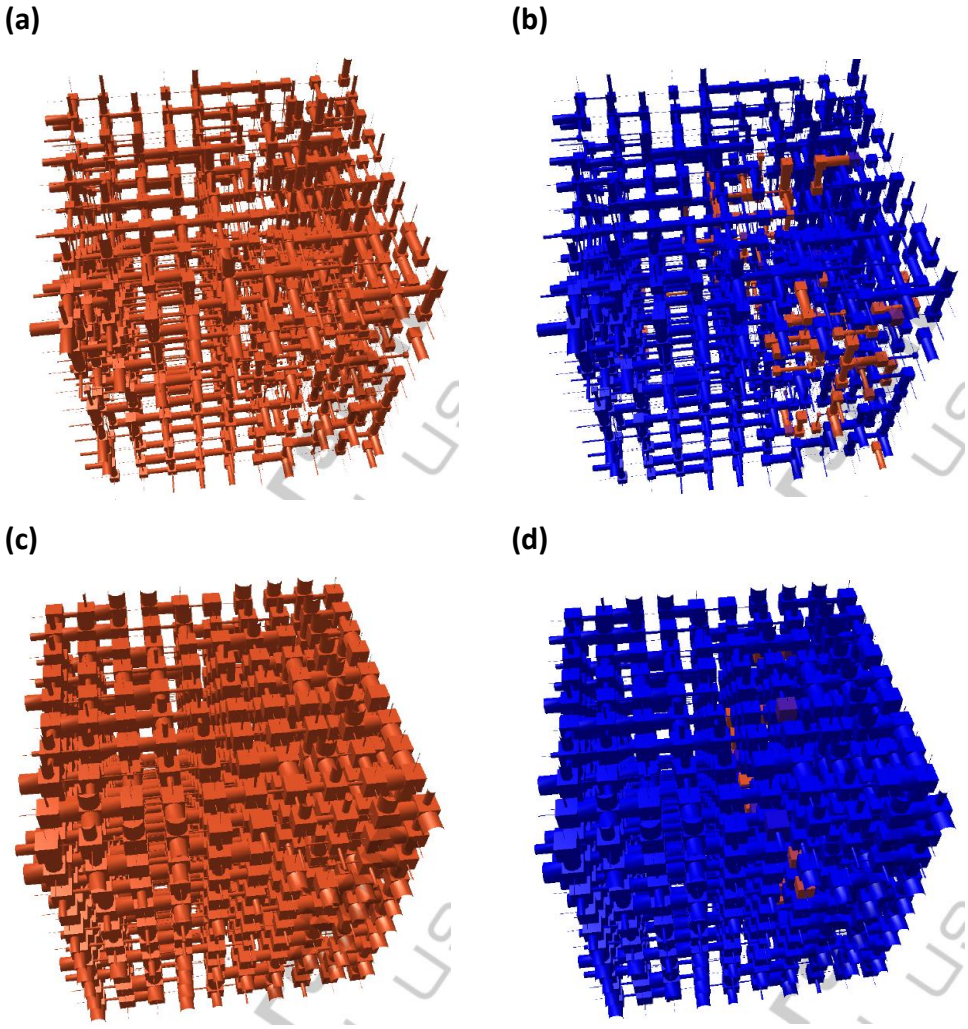


Figura 3.9: Representación gráfica de la estructura porosa de los polímeros (a) PAMgA 5 y (c) PAMgA 40 (en naranja). Las imágenes (b) y (d) corresponden a la representa la misma red de poros de cada polímero, a la que se le ha añadido un fluido, en este caso agua (color azul).

El análisis de los datos obtenidos mediante el software PoreXpert modelling & analysis, genera una representación estructural de la estructura interna de ambos polímeros (figura 3.9), además de calcular el porcentaje de captación de fluidos. En este modelo se usó el agua como fluido para realizar el cálculo, dando lugar a un 98,89 % del

polímero PAMgA 40 y un 92,35 % obtenido para el otro hidrogel, PAMgA 5. En la figura (3.9) se puede aprecia un mayor entramado en el polímero PAMgA 40, por lo que la capacidad de captación de agua es mayor en este polímero, ya que las cadenas del hidrogel pueden albergar mayor cantidad de moléculas de agua en su interior. Estos resultados están de en concordancia con los resultados de porosidad y permeabilidad, ya que el polímero PAMgA 40 presenta un diámetro medio de poro más grande dando lugar a una mayor absorción de fluidos.

3.2.2.6. Estudios de hinchamiento y bioerosión

Para comprobar el comportamiento de los comprimidos, elaborados con ambos hidrogeles PAMgA 5 y PAMgA 40, en medios de disolución biorrelevantes, se realiza el estudio de observación y control de los frentes de disolución. Macroscópicamente se define "frente" como la posición en la matriz en la que las condiciones cambian drásticamente (Colombo et al., 2000).

Se pueden diferenciar tres frentes desde el interior al exterior de un comprimido matricial (Maderuelo et al., 2011):

a) Frente de hinchamiento: con la entrada de medio en el comprimido, el polímero pasa de un estado cristalino a un estado hidratado/gelificado. Este frente se sitúa separando la parte del núcleo del comprimido seco de la parte hidratada.
b) Frente de disolución: conocido como la capa de gel, este frente separa la parte solida (núcleo) donde el API se encuentra en estado sólido, de la parte hinchada/hidratada del polímero, donde el activo se encuentra disuelto. El movimiento de este frente, por tanto, tiene relación con la velocidad de disolución del API.
c) Frente de erosión: corresponde al frente más externo del comprimido y separa la zona gelificada del comprimido del medio de disolución.

Para la realización del ensayo se emplearon comprimidos planos que se situaron entre dos placas Petri, permitiendo únicamente la captación de fluido, y la expansión

del mismo, por la parte lateral del comprimido. Al tratarse de placas de cristal se consiguió la observación directa de los comprimidos, a los diferentes tiempos del ensayo. Se añadió a los medios de disolución una pequeña cantidad de azul de metileno, para facilitar la observación (Figuras 3.10 y 3.11).

El frente de erosión se mueve hacia el exterior cuando el comprimido se hincha, por el contrario, este frente se mueve hacia el interior cuando el comprimido se está disolviendo (erosionando). En el caso del frente de hinchamiento, este se mueve hacia el interior del comprimido a medida que el comprimido se alberga moléculas de medio en su interior. La capa de gel, por tanto, es la diferencia de posición entre el frente de hinchamiento y el frente de erosión.

En pH acido, medio FaSSGF, se pueden observar claramente los tres frentes en ambos polímeros PAMgA, de forma concéntrica. De dentro del comprimido a fuera: frente de hinchamiento, frente de disolución y frente de erosión. En cambio, en el medio con pH 6,8 (FaSSIF) y en el medio de control (agua bidestilada) esta diferencia en los frentes no se observa claramente.

En agua bidestilada (medio de control), se puede apreciar un núcleo interno del comprimido que corresponde a polímero no hidratado, A medida que avanza el ensayo este núcleo desaparee y se va difuminando el frente de erosión, es por eso que se pueden apreciar mayor cantidad de fibras de polímero erosionadas en este medio.

En cuanto al medio a pH 6,8 (FaSSIF) no se aprecian tampoco estos frentes bien diferenciados en ninguno de los polímeros ensayados. PAMgA 5 y PAMgA 40, sino que el comprimido presenta una estructura de “nube” con cadenas de polímero completamente hidratadas, pero unidas en la estructura del comprimido.

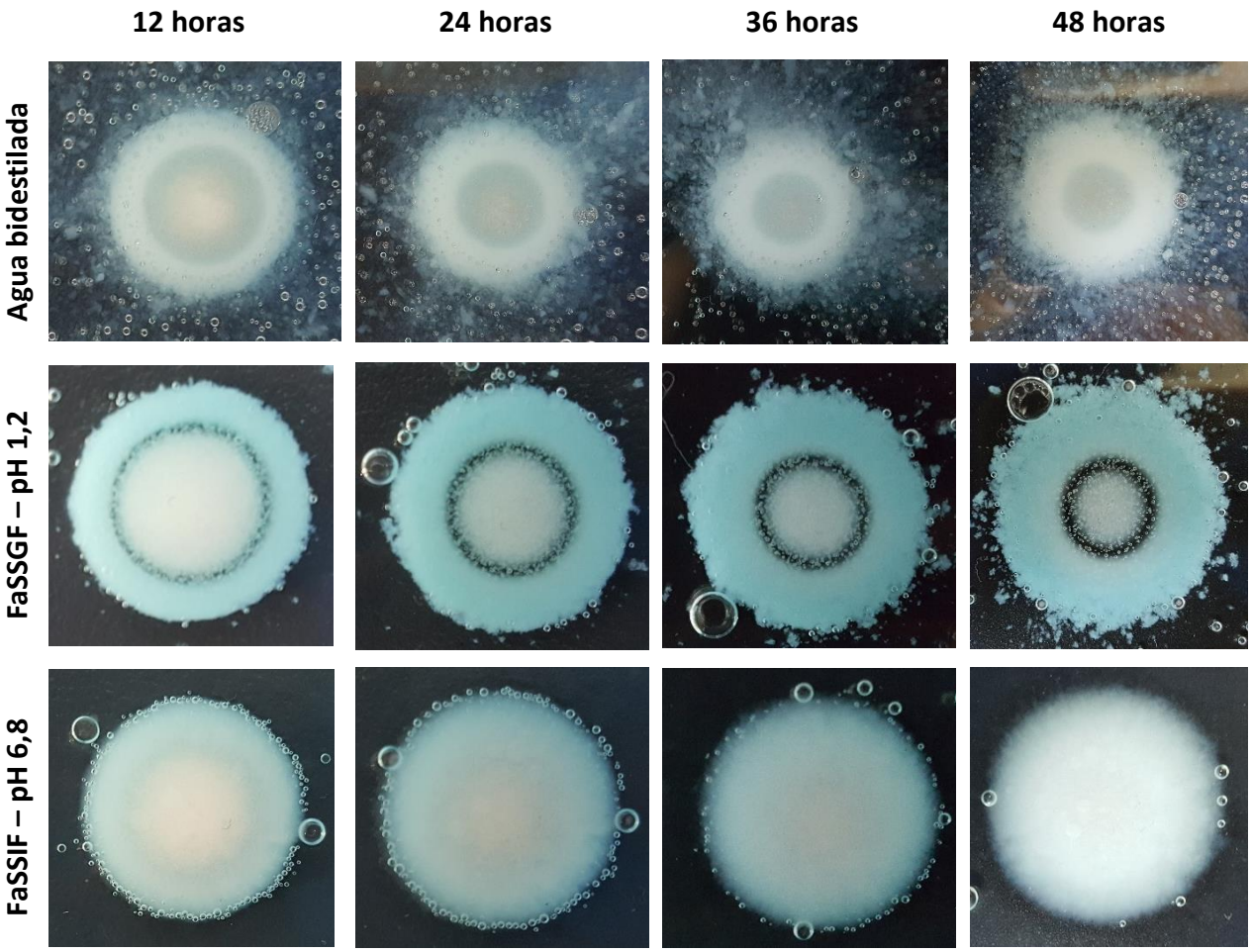


Figura 3.10: Imágenes de los comprimidos de PAMgA 5 a los diferentes tiempos del ensayo en agua bidestilada, medio FaSSGF y medio FaSSIF.

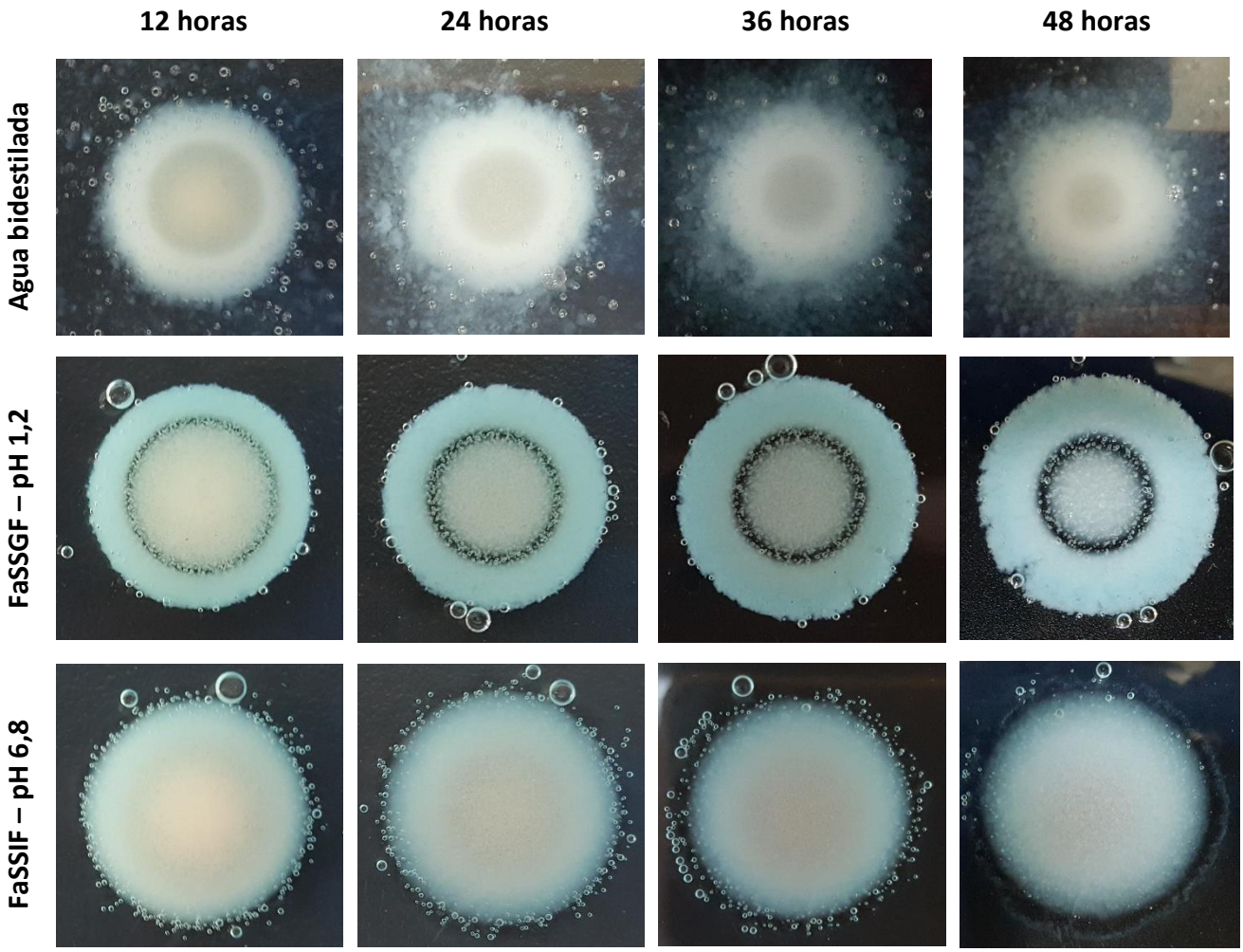


Figura 3.9: Imágenes de los comprimidos de PAMgA 40 a los diferentes tiempos del ensayo en agua bidestilada, medio FaSSGF y medio FaSSIF.

A la vista de los resultados obtenidos, únicamente se realiza los estudios del movimiento de los frentes de disolución de los comprimidos elaborados con PAMgA 5 y PAMgA 40 en el medio biorrelevante FaSSGF a pH 1,2.

En las figuras 3.12 y 3.13 se pueden observar los resultados en el movimiento de estos frentes en los comprimidos elaborados con PAMgA 5 y PAMgA 40 a pH 1,2 (FaSSGF). No se observan diferencias significativas en los resultados de ambos polímeros, aunque el movimiento del frente de erosión en PAMgA 5 es más pronunciado, llegando a un valor de 7,83 mm con respecto a los 5,53 mm de los comprimidos de PAMgA 40.

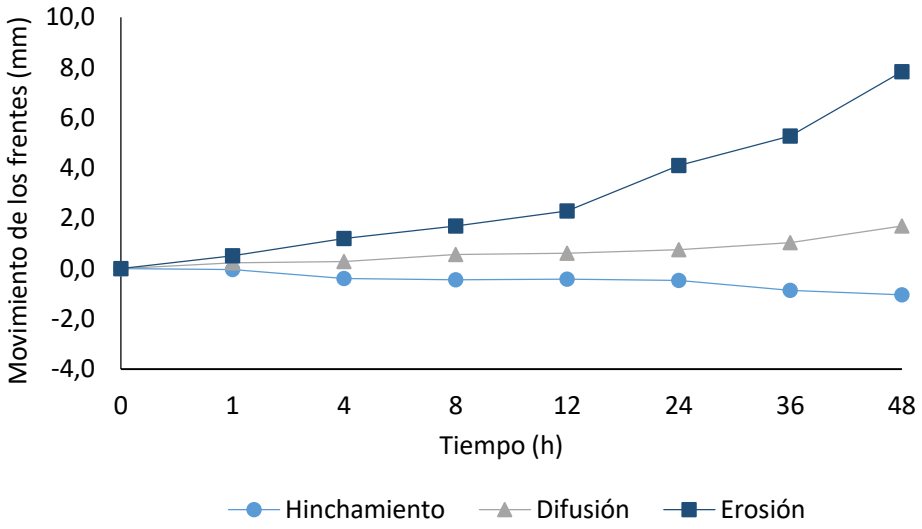


Figura 3.12: Posición de los frentes de hinchamiento, difusión y erosión del polímero PAMgA 5 con respecto al tiempo (h) en medio FaSSGF a pH 1,2.

En cuanto al frente de hinchamiento, el movimiento es progresivo en ambos polímeros, llegando a un -1,048 mm en los comprimidos elaborados con PAMgA 5 y un -0,673 en los elaborados con PAMgA 40. Esto puede ser debido a la limitación de captación de medio lateral, PAMgA 5 que posee menos entrecruzamientos entre sus cadenas poliméricas, por lo que es más fácilmente erosionable. Por otro lado, PAMgA 40 está más entrecruzado, formando una capa de gel más viscosa y densa, por lo que se restringe el movimiento de estos frentes.

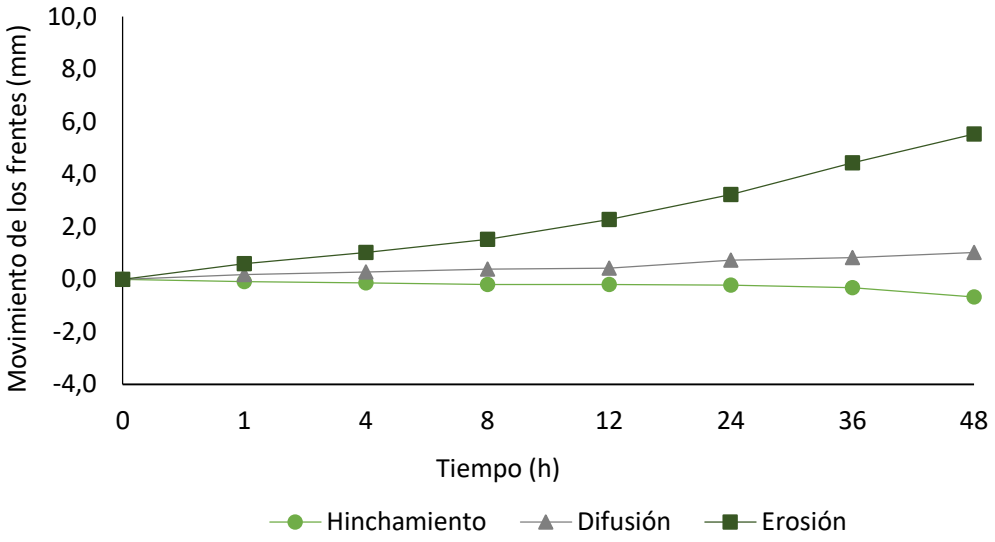


Figura 3.13: Posición de los frentes de hinchamiento, difusión y erosión del polímero PAMgA 40 con respecto al tiempo (h) en medio FaSSGF a pH 1,2.

3.2.2.7. Estudios de bioadhesion

a) Ensayos in vitro: Piel curtida

El trabajo de adhesión de los comprimidos elaborados con PAMgA 5 y PAMgA 40, utilizando piel curtida como sustrato se muestran en la figura 3.14. Con este sustrato se probaron dos condiciones experimentales:

a) Contacto directo entre el comprimido matricial y la piel curtida, donde el medio de disolución era limitado, y el cuero no estaba hidratado.
b) Exceso de medio, donde no había limitación de medio de disolución: Este método se deriva del anterior y, en él, el cuero es sumergido en los medios biorrelevantes para posteriormente realizar el ensayo.

La fuerza máxima de adhesión en la piel curtida se observó en medio FaSSGF a pH 1,2 con comprimidos elaborados con PAMgA 5, alcanzando 1,04 ± 0,10 mJ en el ensayo en contacto directo. En cuanto a los comprimidos elaborados con PAMgA 40 el trabajo

máximo de bioadhesión fue de 0,83 ± 0,15 mJ. Los resultados en medio FaSSIF a pH 6,8 fueron de 0,95 ± 0,18 mJ y 0,83 ± 0,23 mJ para PAMgA 5 y PAMgA 40 respectivamente.

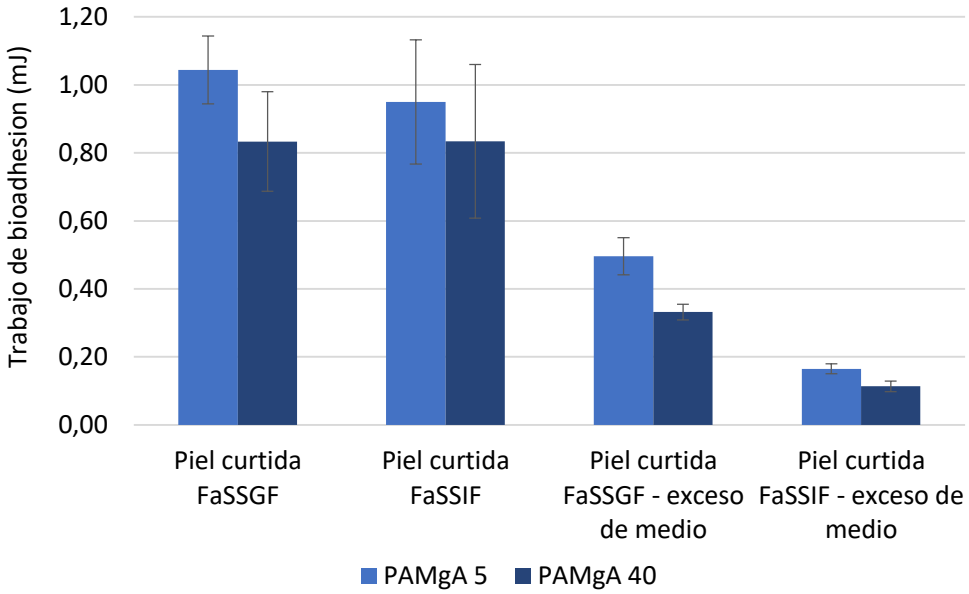


Figura 3.14: Trabajo de bioadhesion expresado en miliJulios (mJ) de las dos condiciones experimentales ensayadas usando como sustrato piel curtida: limitación de medio y exceso de medio usando FaSSGF a pH 1,2 y FaSSIF a pH 6,8.

En los ensayos con exceso de medio, donde no había limitación de fluidos, el trabajo de adhesión se redujo en ambos polímeros, en comparación con el ensayo en el que el medio está limitado. En estos ensayos, el valor máximo se obtuvo con PAMgA 5 en FaSSGF 0,50 ± 0,05 mJ, en cambio en pH 6,8 (FaSSIF) el valor obtenido, para este polímero, fue de 0,17 ± 0,01 mJ.

b) Ensayos ex vivo: mucosa gástrica y duodenal porcina, y mucosa vaginal bovina

En los ensayos ex vivo realizados con tejidos animales, se obtuvieron valores similares a los obtenidos en los ensayos con exceso de medio. Para estos ensayos se utilizaron mucosa gástrica porcina y duodeno proximal porcino como sustratos (figura 3.15). Los medios biorrelevantes usados fueron FaSSGF a pH 1,2 y FeSSIF a pH 5,0 para la mucosa gástrica y el duodeno respectivamente. Los sustratos se limpiaron con los

medios biorrelevantes y se atemperaron a 37ºC. El trabajo máximo de adhesión se obtuvo con la formulación de PAMgA 5 con un valor de 0,34 ± 0,16 mJ en mucosa gástrica. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los resultados obtenido con respecto al polímero PAMgA 40.

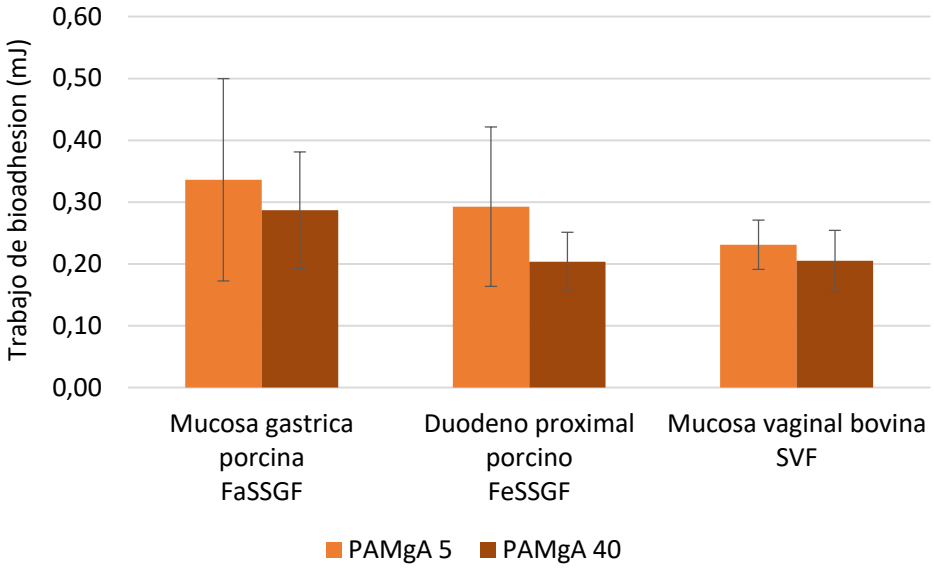


Figura 3.15: Trabajo de bioadhesion expresado en miliJulios (mJ) obtenido en los ensayos ex vivo usando mucosa gástrica porcina (FaSSGF), duodeno proximal porcino (FeSSGF) y mucosa vaginal bovina (SVF) con sus respectivos medios biorrelevantes.

En cuanto a los resultados obtenidos en mucosa vaginal bobina el valor máximo de trabajo de bioadhesion se obtuvo con el polímero PAMgA 5, con un valor de 0,17 ± 0,02 mJ. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre ambos polímeros testados en este sustrato, obteniendo unos valores de trabajo de bioadhesion compatibles con la administración vaginal (Hiorth et al., 2014).

3.2.2.8. Determinación del efecto irritante del polímero PAMgA: Método HET-CAM

Para identificar el potencial irritante y/o para cuantificar el índice de irritación del polímero PAMgA se usó el método HET-CAM - Hen's egg tests - chorioallantoic

membrane. Para ello se testaron ambos polímeros, PAMgA 5 y PAMgA 40 a dos concentraciones.

Para evaluar la viabilidad del ensayo, en cada uno de los huevos testados se usó como control negativo una solución de NaCl 0,9 p/v y como control positivo una solución de NaOH 0.1N. Los resultados obtenidos para el control positivo (NaOH 0.1N) fueron de 17 ± 1, mostrando hemorragia (sangrado de los vasos) aproximadamente a los 22 segundos, lisis vascular (desintegración de los vasos sanguíneos) a los 45 segundos y coagulación (desnaturalización de proteínas intra y extravascular) a los 67 segundos. Por otro lado, no se observó lisis de los vasos, hemorragia y coagulación para la solución de NaCl al 0,9 % p/v. El índice de irritación (IS) de las muestras analizadas, así como los controles positivos y negativos se muestran en la tabla 3.5.

Tabla 3.5. Índice de irritación de las muestras de polímero PAMgA analizadas por (HET-CAM).

Muestras	Índice de irritación (IS)	Clasificación
PAMgA 5 (0,1 % p/v)	0	No irritante
PAMgA 40 (0,1 % p/v)	0	No irritante
PAMgA 5 (0,5 % p/v)	0	No irritante
PAMgA 40 (0,5 % p/v)	0	No irritante
NaCl 0,9 % p/v	0	No irritante
NaOH 1N	17 ± 1	Irritante severo

Una vez la membrana corioalantoidea (CAM) estaba expuesta, se depositaron 0,30 mL de la cada solución de polímero. No se observaron hemorragias, lisis vascular ni coagulación durante el tiempo del ensayo (300 segundos) con ninguna de las soluciones de PAMgA 5 y PAMgA 40. La figura 3.16 muestra las imágenes tomadas durante la realización de la prueba, con ambos polímeros. Se puede, por lo tanto, clasificar los polímeros PAMgA 5 y PAMgA 40 como no irritantes, ya que la puntuación del índice de irritación es igual a 0.

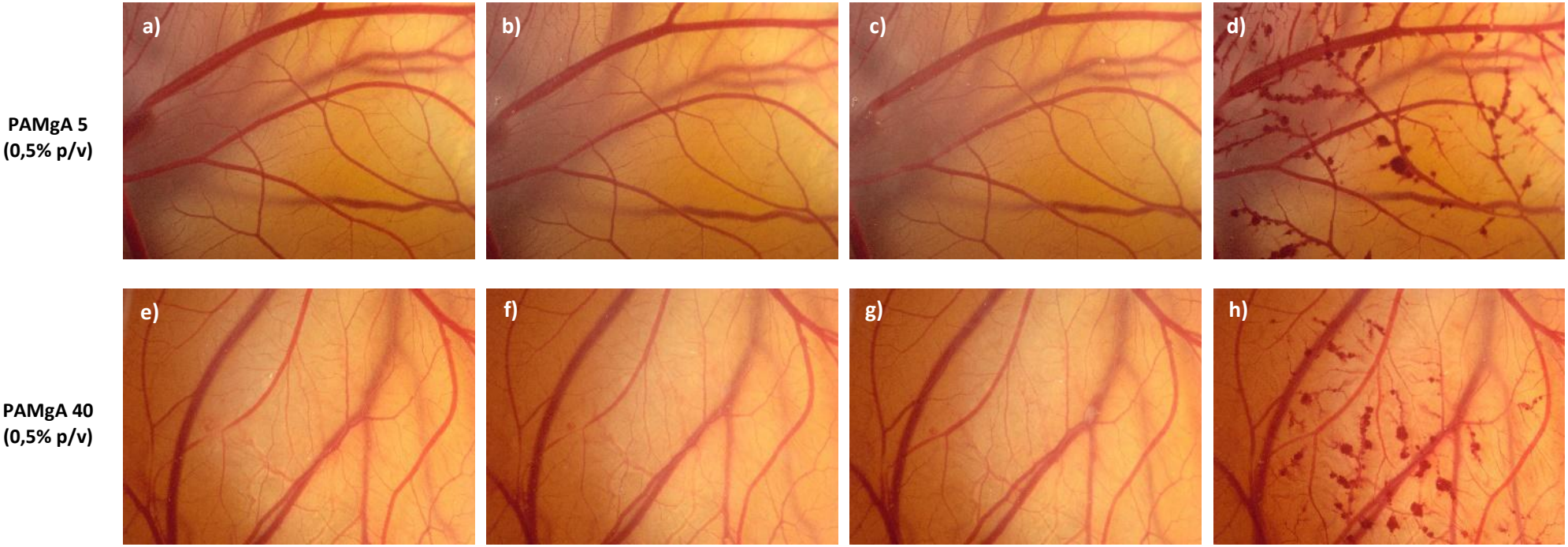


Figura 3.16: Imágenes del ensayo HET-CAM: a) control negativo; b) inicio del ensayo; c) final del ensayo (t=300s) y d) control positivo para la solución de PAMgA 5 al 0.5 % p/v. Mismos tiempos y controles con la solución de PAMgA 40 al 0,5% p/v (e) f) g) y h)).

3.2.2.9. Estudio de toxicidad aguda tras la administración oral de elevadas dosis de PAMgA con alimentos.

La toxicidad aguda de ambos hidrogeles, PAMgA 5 y PAMgA 40, se evaluó empleando dosis elevadas de polímero sólido mezclada con alimentos. Para realizar esta administración se emplearon pellets que se elaboraron a partir de una mezcla de pienso con cada hidrogel al 20% (en estado sólido), PAMgA 5 y PAMgA 40.

No se apreciaron cambios en el peso ni en el consumo de alimentos en ninguno de los animales y el análisis visual del hígado, bazo, pulmones, riñón, estómago e intestino de los animales, después de la eutanasia, no reveló ningún cambio en su morfología.

Tabla 3.6. Respuesta clínica tras 24 horas de la administración de PAMgA 5 y PAMgA 40 en dosis de 1 a 10 g/Kg al estado sólido.

	PAMgA 5 (g/Kg)			**PAMgA 40 (g/Kg)**		
Rango de dosis	1 ± 0,2	5 ± 1	10 ± 2	1 ± 0,2	5 ± 1	10 ± 2
Inquietud	0	0	0	0	0	0
Chirridos	0	0	0	0	0	0
Movilidad	0	0	0	0	0	0
Vómitos	0	0	0	0	0	0
Diarrea	0	0	1	0	0	1
Muerte	0	0	0	0	0	0

No se observaron signos de toxicidad en ninguna de las dosis administradas a los ratones, e incluso en el rango de dosis más alto estudiado (10 g/kg) ambos hidrogeles fueron bien tolerados (tabla 3.12). Todos los animales sobrevivieron al final del ensayo sin ninguna sintomatología significativa. Sin embargo, a la dosis más alta administrada, algunos de los animales experimentaron una ligera diarrea tras 24 horas de la ingesta del polímero.

4. DESARROLLO DE COMPRIMIDOS MATRICIALES DE LIBERACIÓN PROLONGADA: ESTUDIOS PRELIMINARES

En este capítulo se explican los criterios de selección de los dos principios activos utilizados para el desarrollo de los comprimidos de liberación prolongada de PAMgA (Metformina y Budesonida) y los estudios previos realizados con el fin de definir las condiciones para la realización de los estudios de disolución de los principios activos a partir de los comprimidos matriciales. En concreto se seleccionan los medios biorrelevantes utilizados para los estudios de disolución, se ponen a punto los métodos analíticos para la cuantificación de metformina y budesonida en estos medios, y en el caso de la budesonida se realiza un estudio de solubilidad que permita realizar el ensayo de disolución en condiciones sink.

4.1. *MATERIALES Y MÉTODOS*

4.1.1. Selección de los principios activos

Para la realización de la presente tesis doctoral se seleccionaron dos principios activos de administración por vía oral en tratamientos crónicos, que se diferencian en su solubilidad en medio acuoso, y en su uso terapéutico, que demanda perfiles de liberación diferentes cuando se administran por vía oral:

Metformina hidrocloruro, agente hipoglucemiante oral ampliamente utilizado para el tratamiento de la diabetes tipo II. Es una molécula pequeña con una alta solubilidad en medios acuosos. IUPAC:(3-(diaminometiliden)-1,1-dimetilguanidina) ("PubChem Compound Summary for CID 14219, Metformin hydrochloride," 2020).

Budesonida, fármaco del grupo de los glucocorticoide con importantes propiedades antiinflamatorias, que se utiliza por vía oral para el tratamiento de la enfermedad de Crohn. Es una molécula de carácter lipofílico con baja solubilidad en medios acuosos. IUPAC: 16,17-(butilidenebis(oxi))-11,21-dihidroxi-,(11-β,16-α)-pregna-1,4-dieno-3,20-diona ("PubChem Compound Summary for CID 5281004, Budesonide," 2020).

METFORMINA HIDROCLORURO:

El Hidrocloruro de Metformina pertenece al grupo de fármacos hipoglucemiantes orales, excluyendo insulinas, denominado biguanidas. Estructuralmente constituido por 3-(diaminometiliden)-1,1-dimetilguanidina hidrocloruro con fórmula empírica $C_4H_{12}ClN_5$ (figura 4.1).

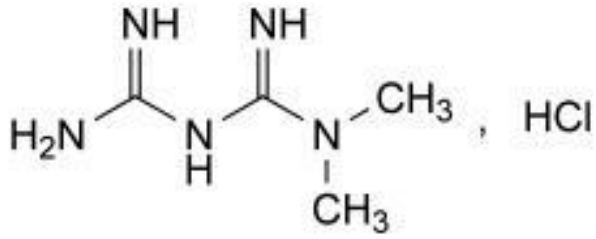


Figura 4.1. Estructura molecular de la metformina Hidrocloruro

La metformina es una molécula pequeña, con un peso molecular de 129,16 g/mol como base, y de 165,63 g/mol en forma de clorhidrato. Se presenta con un aspecto de polvo blanco, o ligeramente amarillento con un pKa 11.5 en forma de base (Graham et al., 2011).

Se trata de un antihiperglucémico de administración oral ampliamente usado para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II, considerado como tratamiento de elección en casos de diabetes por obesidad, ya que existen estudios que relacionan el uso de la metformina con la pérdida de peso (Yerevanian and Soukas, 2019). Las dosis recomendadas varían entre 500 – 1000 mg, dependiendo del estado del paciente, y con una dosis máxima diaria de 3000mg, divididos en 3 tomas. Últimamente la investigación de este activo está ganando mucha importancia también por otras características como su actividad antitumoral, para el tratamiento del hígado graso, prevención del estrés oxidativo o tratamiento de ovarios poliquísticos entre otros (Zheng et al., 2015; Zhou et al., 2018).

Su acción farmacológica en el tratamiento de la diabetes tipo II, se realiza fundamentalmente a nivel hepático, donde reduce la gluconeogénesis y la

glucogenolisis. A nivel periférico, la metformina aumenta la utilización de glucosa, al incrementar la capacidad de transporte de los transportadores de membrana de glucosa (GLUT), y posiblemente también disminuye el apetito y la absorción de glucosa intestinal. La metformina también induce la síntesis intracelular del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1), que favorece la liberación de insulina-glucosa-dependiente por parte del páncreas (Hostalek et al., 2015). Como consecuencia, la administración de metformina reduce los niveles plasmáticos de glucosa tanto basales como post-prandiales, sin riesgo de producir hipoglucemia, ya que no estimula la secreción de insulina. Por último, la metformina también actúa a nivel del metabolismo lipídico, disminuyendo la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos y aumentando la beta oxidación de ácidos grasos, lo que refuerza su utilidad en cuadros de diabetes asociados a obesidad. La biodisponibilidad oral de la metformina está entre el 50 y el 60%, debido en gran parte a una absorción saturable e incompleta. Aproximadamente un 30% del activo es excretado inalterado en heces (McCreight et al., 2016).

Su estructura confiere a la metformina una alta solubilidad en soluciones acuosas, con un coeficiente de solubilidad de 200 mg/mL a una temperatura de 25ºC (aproximadamente 1,2 M) como está recogido en la tabla 4.1 (DrugBank, 2020). En el caso de la metformina el cociente dosis/solubilidad en medios acuosos posee valores muy inferiores a 250mL (entre 2,5 y 5 mL), por lo que no se prevé que su velocidad de disolución suponga ninguna limitación para su incorporación en el organismo cuando se administra por vía oral.

Tabla 4.1: Dosis y solubilidad de la metformina administrada por vía oral.

Uso terapéutico	Dosis (mg)	Solubilidad en agua (RFE)	Dosis/ solubilidad	Clasificación biofarmacéutica (BSC)
Hipoglucemiante oral	500 - 1000	Fácilmente soluble en agua (~ 200 mg/mL)	2,5 - 5 mL	Altamente Soluble

BUDESONIDA:

La budesonida es un glucocorticoide semisintético con alta potencia antiinflamatoria local (actividad glucocorticoide), caracterizado por una mayor potencia y una menor biodisponibilidad oral que los corticoides de primera generación. Estructuralmente constituido por 16,17-(butilidenebis(oxi))-11,21-dihidroxi-(11-β,16-α)-pregna-1,4-dieno-3,20-diona con fórmula empírica $C_{25}H_{34}O_6$ (figura 4.2).

Se utiliza en el tratamiento de la rinitis alérgica y del asma y otras afecciones de las vías respiratorias en forma de aerosol por vía nasal o pulmonar; y en el tratamiento de procesos inflamatorios intestinales, como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, por vía oral (López-Sanromán et al., 2018). La dosis recomendada para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias intestinales es de 3 a 9 mg al día, según la gravedad del paciente.

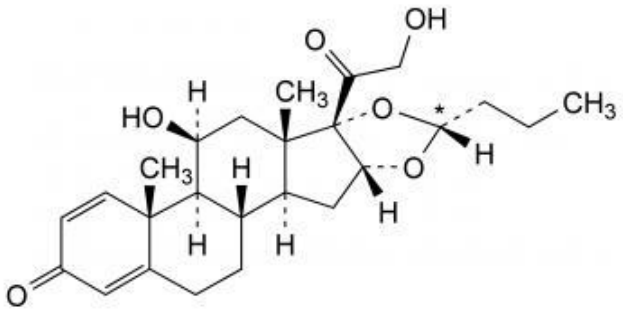


Figura 4.2: Estructura molecular de la budesonida

Su acción farmacológica en el tratamiento de las enfermedades inflamatorias intestinales, se produce a nivel local a lo largo del trasto gastrointestinal. Posee una alta afinidad por el receptor de glucocorticoides, 195 veces mayor a la hidrocortisona y 15 mayor que la prednisolona, por lo que se considera tratamiento de elección en casos de remisión de la enfermedad de Crohn. Se trata de un fármaco ampliamente usado para esta patología ya que, debido a su intenso efecto de primer paso hepático, su biodisponibilidad oral es del 9 – 21 %, de manera que los pacientes experimentan menores efectos adversos (Gareb et al., 2019). Sus metabolitos (75% de la dosis

administrada aproximadamente) se excretan principalmente a través de la orina y en las heces, en menor medida (Lichtenstein, 2016).

La budesonida posee un peso molecular 430,534 g/mol. Se presenta con un aspecto de polvo blanco, su solubilidad a pH fisiológico es de alrededor de 20 μg/mL, considerándose como fármaco prácticamente insoluble en soluciones acuosas como se recoge en la tabla 4.2.(Bandi et al., 2004).

En los fármacos con una solubilidad inferior a 100 mg/mL, ésta puede limitar el proceso de incorporación del fármaco al organismo, ya que la fracción de fármaco que se absorbe es aquella que está disuelta en los fluidos; aunque este efecto depende también de la dosis administrada. En el caso de la budesonida este cociente dosis/solubilidad en medios acuosos posee valores superiores a los 250mL, por lo que en una administración oral es probable que la disolución previa del fármaco condicione su incorporación al organismo.

Tabla 4.2: Dosis y solubilidad de la budesonida administrada por vía oral.

Uso terapéutico	Dosis (mg)	Solubilidad en agua (RFE)	Dosis/ solubilidad	Clasificación biofarmacéutica
Antiinflamatorio	3 - 9	Prácticamente insoluble en agua (~ 20 μg/mL)	150-450mL	Baja solubilidad

4.1.2. Selección de los medios de cesión

Los ensayos de disolución in vitro son ensayos oficiales, recogidos en las diferentes farmacopeas, que nos permiten conocer el perfil de liberación in vitro de las sustancias activas a partir de la forma farmacéutica. Para comprimidos de liberación prolongada, el conocimiento de la cinética de liberación in vitro del principio activo a partir de la forma farmacéutica resulta fundamental, ya que estos estudios proporcionan una aproximación de su comportamiento in vivo, orientándonos sobre las modificaciones a realizar sobre la formulación con el fin de alcanzar el perfil de liberación del fármaco deseado. Habitualmente, en los ensayos de disolución de formas farmacéuticas sólidas orales, para simular las condiciones del estómago se utiliza una solución de ácido clorhídrico 0,1N con pH 1,2; y para simular las condiciones del intestino delgado distal se utiliza tampón fosfato de pH 6,8. En este estudio, para determinar los perfiles de cesión de la metformina y de la budesonida a partir de comprimidos matriciales, se han seleccionado dos medios biorrelevantes, a diferentes pH, con el objetivo de reflejar más fielmente las características de los fluidos biológicos a lo largo de todo el tracto gastrointestinal, dado que el polímero que utilizamos es nuevo y no se tiene experiencia sobre su comportamiento en los fluidos biológicos. Estos medios biorrelevantes son los siguientes:

- Medio biorrelevante pH 1,2 (**FaSSGF**): Este medio de disolución tiene la función de asemejar las condiciones fisiológicas en el estómago vacío.
- Medio biorrelevante pH 5,0 (**FeSSIF**): Este medio de disolución asemeja las condiciones del fluido intestinal proximal después de la ingesta de alimentos.
- Medio biorrelevante pH 6,8 (**FaSSIF**): En este caso el medio elaborado asemeja las condiciones fisiológicas que se dan en el intestino delgado distal, tanto en características de pH como de componentes enzimáticos.

La tabla 4.3 refleja la composición de los medios biorrelevantes seleccionados para los ensayos de cesión, FaSSGF, FeSSIF y FaSSIF.

Tabla 4.3. Composición de los medios biorrelevantes usados para los ensayos de cesión.

Componentes	FaSSGF	FeSSIF	FaSSIF
Taurocolato sódico	80 µM	15 mM	3 mM
Lecitina	20 µM	3,75 mM	0,75 mM
Fosfato sódico monobásico	-	-	3,438 g
Pepsina	0,1 mg/mL	-	-
Cloruro sódico	34,2 mM	6,186 g	6,186 g
Ácido acético glacial	-	8,65 g	-
Pellets de hidróxido sódico	-	4,04 g	-
Ácido clorhídrico concentrado (c.s.p)	pH 1,2	-	-
Hidróxido sódico (c.s.p)	-	-	pH 6,8
Agua bidestilada (c.s.p.)	1 L	1 L	1 L
Osmolaridad (mOsmol/Kg)	120,7 ± 2.5	~ 670	~ 270
Tensión superficial (mN/m)	42,6	~ 72	54
pH	1,2	5,0	6,8

Los fluidos biológicos varían en pH, osmolaridad, viscosidad, tensión superficial, además de la concentración y tipo de las sales biliares a lo largo de todo le tracto gastrointestinal (Mudie et al., 2020). Los medios biorrelevantes incluyen en su composición sales biliares, como el taurocolato sódico y fosfolípidos como la lecitina que pueden llegar a favorecer la solubilidad de principios activos poco solubles mediante la formación de micelas (Klein, 2010).

4.1.3. Puesta a punto de los métodos de cuantificación de metformina y budesonida

La cuantificación del principio activo cedido en los estudios de disolución, es fundamental en el desarrollo de una forma farmacéutica de liberación controlada. Esta cuantificación se lleva a cabo mediante la puesta a punto y validación de métodos

analíticos, los cuales determinan, identifican y cuantifican los principios activos de una manera selectiva, sensible, exacta y precisa para cada principio activo.

El principal objetivo de este estudio es la puesta a punto de los métodos analíticos para la cuantificación de los principios activos empleados en la elaboración de comprimidos, que permitan determinar las cantidades disueltas en los medios de disolución seleccionados, de una manera rápida y selectiva. Para la determinación analítica de la metformina, se ha puesto a punto y validado un método analítico por espectrofotometría ultravioleta directa (UV). En cambio, para la determinación analítica de la budesonida, se ha trabajado con dos técnicas analíticas distintas: l espectrofotometría ultravioleta directa (UV) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Se determina la validez de cada uno de los métodos analíticos desarrollados para la cuantificación de cada uno de los principios activos disueltos en FaSSGS y en FaSSIF, en presencia del polímero y, en el caso de la budesonida, en presencia de lauril sulfato sódico y de Tween 80, posibles tensioactivos a utilizar para mantener las condiciones sink durante los estudios de disolución de este fármaco.

4.1.3.1. Determinación analítica de metformina hidrocloruro mediante espectrofotometría ultravioleta (UV)

Para la cuantificación de la metformina (Fagron Iberica, Barcelona, España) en los estudios de cesión a partir de los comprimidos elaborados con el polímero PAMgA se puso a punto una técnica analítica simple como es la espectrofotometría ultravioleta (UV) directa. Se parte del método descrito en la USP (USP-NF, 2019a) para los ensayos de disolución. La determinación analítica se ha llevado a cabo utilizando un espectrofotómetro UV Beckman DU-7 (Beckman Coulter, EE.UU.). Para la preparación de las muestras se utilizan los dos medios biorrelevantes diferentes, FaSSGF y FaSSIF.

Para cada uno de los medios biorrelevantes se elabora una solución madre de metformina de concentración 1 mg/mL. A partir de cada una de estas soluciones madre

se prepara una disolución patrón de concentración 10 µg/mL de metformina en cada uno de los medios biorrelevantes seleccionados. Con estas disoluciones patrón se determina, en primer lugar, el espectro de absorción entre 215 y 260 nm con el fin de evaluar la selectividad del método e identificar el máximo de absorción del principio activo.

Posteriormente, a partir de las soluciones madre se procede a la preparación de 6 diluciones: en el caso del medio biorrelevante pH 6,8 con concentraciones entre 2-12 µg/mL (2; 4; 6; 8; 10; 12 µg/mL), y en el caso del medio biorrelevante pH 1,2 con concentraciones entre 10 - 50 µg/mL (10; 15; 25; 30; 40; 50 µg/mL). Estas diluciones se preparan sin y con la incorporación de PAMgA a una concentración de 12 µg/mL y 50 µg/mL para cada uno de los medios biorrelevantes.

Con estas muestras se ha evaluado la linealidad, precisión y exactitud del método analítico espectrofotométrico.

4.1.3.2. Determinación analítica de budesonida mediante espectrofotometría ultravioleta (UV)

Para la cuantificación de la budesonida (MP Biomedicals, Illkirch, Francia) en los ensayos de solubilidad se puso a punto un método analítico por espectrofotometría ultravioleta (Beckman DU-7, Beckman Coulter, EE.UU.) en los dos medios biorrelevantes diferentes, FaSSGF y FaSSIF.

Se elabora una solución madre de budesonida en una mezcla hidroalcohólica (60:40) de concentración 1 mg/mL. Se mantiene en ultrasonidos diez minutos para asegurar la completa disolución del principio activo. A partir de ella, y empleando los diferentes medios biorrelevantes, se procede a la preparación de las muestras para las rectas de calibrado. Para ambos medios estudiados la concentración comprende el rango entre 5 - 30 µg/mL de budesonida. La muestra de concentración de 10 µg/mL (dilución patrón) se utiliza para realizar un barrido en el espectro de absorción ultravioleta, entre 400 y 200 nm de longitud de onda, para poder determinar el pico de máxima absorbancia y la

selectividad de la budesonida en los medios biorrelevantes seleccionados, al comparar el espectro obtenido con el de un patrón de igual concentración preparado con mezcla hidroalcohólica (60:40), el obtenido con los medios relevantes en presencia de PAMgA a una concentración de 30 µg/mL, y el obtenido con los medios relevantes a los que se incorpora Tween 80 (Panreac, Barcelona, España) y Lauril sulfato sódico (Fagron Iberica, Bacelona, España) (LSS) a una concentración de 0,5%.

Con las diluciones de las soluciones madre de budesonida (5; 10; 15; 20; 25; 30; µg/mL de budesonida) se realiza un estudio de linealidad, exactitud y precisión intermedia.

4.1.3.3. Determinación analítica de budesonida mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se parte del método de HPLC utilizado para la cuantificación de la budesonida descrito en la Real Farmacopea Española (RFE), adaptado a nuestras condiciones de trabajo. Este método se ha desarrollado con el fin poder cuantificar concentraciones del fármaco inferiores a 5µg/mL, límite inferior del intervalo del método analítico por espectrofotometría UV. Dada la baja hidrosolubilidad de la budesonida y la baja dosis a la que se utiliza por vía oral, resultará necesaria su cuantificación a muy bajas concentraciones en los posteriores ensayos de cesión a partir de comprimidos del principio activo elaborados con el polímero PAMgA.

Se ha utilizado un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) Agilent 1200 series Liquid Chromatography system (Agilent technologies, California, EE.UU.) con una bomba cuaternaria (G1311 Agilent 1200 series) y un inyector automático (G1329, Agilent 1200 series). Las especificaciones usadas para el análisis fueron las siguientes: longitud de onda de detección λ=254 nm; volumen de inyección = 40 µL; flujo = 1.4 mL/min; temperatura ambiente en la columna. El análisis fue llevado a cabo con una columna de fase reversa Mediterranea® Sea C18 (Teknokroma, Barcelona, España) de 150 × 4.6 mm y 5 µm de tamaño de poro.

La fase móvil utilizada para la cuantificación de la budesonida consiste en una mezcla 35:65 (v/v) de solución amortiguadora de pH fosfato:acetonitrilo (Fisher Scientific, Madrid, España). La solución fosfato fue preparada a partir de fosfato dihidrógeno sódico dihidrato (Panreac, Barcelona, España) y acido orto-fosfórico 85% (Acros Organic, EE.UU.) ajustando el pH a 3.2 ± 0.1. La fase móvil es posteriormente filtrada a través de un filtro de nylon de membrana con un diámetro de 47 mm y un tamaño de poro 0,45 µm (Millipore®, Merck Millipore, Cork, Irlanda) y desgasificada en un baño de ultrasonidos previo a su uso.

A partir de la solución madre descrita en el apartado 4.1.3.2 se preparan diferentes diluciones de concentraciones 0,5; 1; 3; 5; 7; 9; 11 µg/mL de budesonida en los dos medios biorrelevantes y en ausencia y presencia de PAMgA, con el fin de determinar la selectividad, linealidad, exactitud, precisión, límite de detección y límite de cuantificación del método analítico.

4.1.3.4. Análisis estadístico de los resultados

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos en la puesta a punto de los métodos analíticos se ha usado el software Minitab v. 18 (Minitab Ltd., Coventry, Inglaterra).

a) Selectividad

La selectividad es la capacidad para determinar el analito en presencia de otros componentes. Para determinar la selectividad se han comparado los espectros de absorción o la lectura cromatográfica obtenidos con soluciones patrón del fármaco elaboradas con disolvente (agua en el caso de metformina y mezcla hidroalcohólica en el caso de la budesonida) y con los medios biorrelevantes, en este último caso en ausencia y en presencia de PAMgA.

b) *Linealidad*

Se utilizan los resultados obtenidos tras la lectura de la absorbancia de 3 rectas de calibrado elaboradas el mismo día.

- *Correlación entre la concentración de analito y la absorbancia medida*

Se determina mediante la realización de un ANOVA para la regresión (F de Snedecor) y mediante el test t de Student para evaluar si la pendiente de la recta que correlaciona la concentración de analito (variable independiente) y la absorbancia (variable dependiente) es significativamente distinta a cero.

  - H0 (hipótesis nula): la pendiente no difiere significativamente de cero ($p > 0,05$).
  - H1 (hipótesis alternativa): la pendiente sí difiere significativamente de cero ($p < 0,05$).

Para cuantificar la correlación entre las variables se calcula el coeficiente de correlación (r) y, a partir de él, el coeficiente de determinación (r^2).

- *Ajuste a un modelo lineal*

Tras realizar un test ANOVA de regresión para verificar la correlación entre ambas variables, se realiza un ANOVA para determinar la falta de ajuste al modelo lineal propuesto. En este test se comparan las variaciones debidas al ajuste lineal frente a las variaciones debidas a errores experimentales o, denominados errores residuales.

  - H0 (hipótesis nula): el modelo es lineal ($p > 0,05$).
  - H1 (hipótesis alternativa): el modelo no es lineal ($p < 0,05$).

- *Test de proporcionalidad*

Para evaluar la proporcionalidad del método analítico, se emplea la prueba estadística de la *t de Student.* Con esta prueba se permite demostrar mediante un test de contrataste, si la ordenada pasa por el origen.

  - H0 (hipótesis nula): la ordenada en el origen no difiere significativamente de cero ($p > 0,05$).
  - H1 (hipótesis alternativa): la ordenada en el origen si difiere significativamente de cero ($p < 0,05$).

c) Exactitud

La determinación de la exactitud del método analítico se realiza mediante el análisis de muestras preparadas a partir de las soluciones madre que contienen el fármaco y el polímero utilizado en la elaboración de los comprimidos. La concentración experimental del fármaco en la muestra se determinó a partir de las curvas de calibrado del estudio de linealidad. Mediante la comparación del valor experimental con el valor real se determina el porcentaje de fármaco recuperado, capaz de cuantificar el método analítico.

d) Precisión intermedia

Se utilizan las mismas muestras del estudio de exactitud, que se elaboran y analizan en 3 días distintos. La precisión del método viene determinada por el coeficiente de variación de las respuestas obtenidas.

e) Resolución de los picos, límite de detección y de cuantificación e idoneidad del sistema cromatográfico

En el caso del análisis por HPLC de las muestras de budesonida se ha calculado, adicionalmente, la *resolución de los picos* (R), que se trata de una medida cuantitativa de la separación de los picos cromatógrafos. Se calcula usando la siguiente ecuación:

$$R = (\Delta t / WB^1 + W\ B^2)$$

Siendo Δt la distancia entre el máximo de los dos picos, WB1 y WB2 la medida de la base del pico 1 y 2 respectivamente. Un valor de 1 representa una resolución del 90%, en cambio un valor de 1,5 representa una separación hasta la línea base de ambos picos. Valores de R inferiores a 1 indican solapamiento de los picos.

En el análisis por HPLC también se ha determinado el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC). El LD se define como la concentración más baja de activo que se puede detectar, pero no necesariamente cuantificar por el método seleccionado. En cambio, el LC es la concentración más baja de activo que se puede determinar con una buena precisión y exactitud. Ambos valores se determinan a partir de las siguientes expresiones (ICH Q2(R1), 2005)

$$LD = 3{,}3 \cdot DE / b$$

$$LC = 10 \cdot DE / b$$

Donde DE es la desviación estándar residual y b es la pendiente de la recta de calibrado obtenida con 7 concentraciones de principio activo en cada medio: 0,5; 1; 3; 5; 7; 9; 11 µg/mL.

Para evaluar la idoneidad del método analítico se han calculado e*l factor de asimetría y el número de platos teóricos.*

El *factor de asimetría* (T) es una medida de la simetría del pico cromatógrafo, se obtiene a partir de la siguiente ecuación

$$T = (W_{0,05}/2f)$$

Donde, f es la distancia entre el máximo del pico y el borde inicial del mismo, y W 0,05 es la anchura del pico al 5% de la altura del pico

Un valor de asimetría alto, indica que el pico no es simétrico, por el contrario, cuanto más cerca este el valor de 1, significa que el pico es simétrico. Este parámetro está relacionado con la precisión del método, intentando tener un valor lo más próximo a 1 posible.

El *número de platos teóricos* (N), es una medida de la eficacia de la columna, se calcula con la siguiente formula:

$$N= 16 (tr/W)^2$$

Siendo tr el tiempo de retención del activo, W la anchura del pico en su base. Es una medida que establece la eficacia de la columna utilizada para ese analito y es característica de cada sistema cromatógrafo.

4.1.4. Estudio de solubilidad de la budesonida en FaSSGF y FaSSIF

La budesonida, es una molécula muy lipófila cuya solubilidad en disoluciones acuosas es muy baja. Para asegurarnos, durante todo el ensayo de cesión *in vitro*, que se mantienen condiciones sink, y que la disolución del principio activo en el medio no estará limitada por la saturación del mismo, se propuso la utilización de tensioactivos que favorezcan su solubilidad en medios acuosos: Tween 80 y Lauril sulfato sódico (LSS).

Los tensioactivos seleccionados Tween 80 (Panreac, Barcelona, España) y Lauril sulfato sódico (Fagron Iberica, Bacelona, España) (LSS) se incorporan en concentraciones que variaron de 0,05% al 1% en los diferentes medios en los que se van a realizar los ensayos de velocidad de disolución: FaSSGF y FaSSIF.

Para realizar el ensayo de solubilidad se utilizaron tubos de ensayo en los que se añadieron, en todos ellos, 10 mg de principio activo y 20 mL de medio biorrelevante (FaSSGF y FaSSIF) con los dos diferentes tensioactivos, a diferentes concentraciones (0; 0,05; 0,1; 0,5 y 1%). La mezcla se llevó a agitación en vórtex durante 1 minuto y posteriormente se mantuvo 10 minutos en ultrasonidos (Transsonic 460, Elma). Pasado este tiempo, se llevaron los tubos al baño termostatizado a 37ºC durante aproximadamente media hora, tras sacarlos del baño se agitaron un minuto en el vórtex y se filtraron mediante un filtro acuoso de membrana 0,45 µm (Millex-LCR, Millipore). Las soluciones resultantes se valoraron mediante espectrofotometría ultravioleta (UV) y HPLC.

A partir de los datos de solubilidad obtenidos con los diferentes tensioactivos se determinó el coeficiente de solubilidad de la budesonida en ambos medios biorrelevantes, FaSSGF y FaSSIF.

4.2. *RESULTADOS*

4.2.1. Determinación analítica de metformina hidrocloruro por espectrofotometría UV

En el barrido realizado en el espectrofotómetro ultravioleta con la disolución de metformina de concentración conocida 10 µg/mL en agua se identificó un pico de máxima absorbancia a una longitud de onda (λ) de 232 nm, correspondiente a la metformina. Con el medio biorrelevante de pH 6,8 se identifica este mismo pico, con un valor de absorbancia (Abs) de 0,732. Sin embargo, al realizar el barrido con el medio biorrelevante a pH 1,2 se observó que el coeficiente de extinción era sensiblemente menor a este pH acido que a pH 6,8, por lo que las diluciones para las rectas de calibrado se prepararon en un intervalo de concentraciones superior.

En la tabla 4.4 se presentan los datos medios de absorbancia obtenidos para las diferentes concentraciones de metformina ensayadas en los medios biorrelevantes FaSSGF y FaSSIF respectivamente.

Tabla 4.4. Valores medios de absorbancia obtenidos en FaSSGF y FaSSIF para las concentraciones ensayadas.

FaSSGF		**FaSSIF**	
Concentración (µg/mL)	**Absorbancia ± DE**	**Concentración (µg/mL)**	**Absorbancia ± DE**
10	0,189 ± 0,002	2	0,135 ± 0,001
15	0,276 ± 0,001	4	0,296 ± 0,004
25	0,453 ± 0,004	6	0,448 ± 0,006
30	0,535 ± 0,001	8	0,589 ± 0,001
40	0,697 ± 0,003	10	0,732 ± 0,004
50	0,856 ± 0,007	12	0,877 ± 0,001

En la figura 4.3 se observa una representación gráfica de la recta de calibrado obtenidas en ambos medios biorrelevantes.

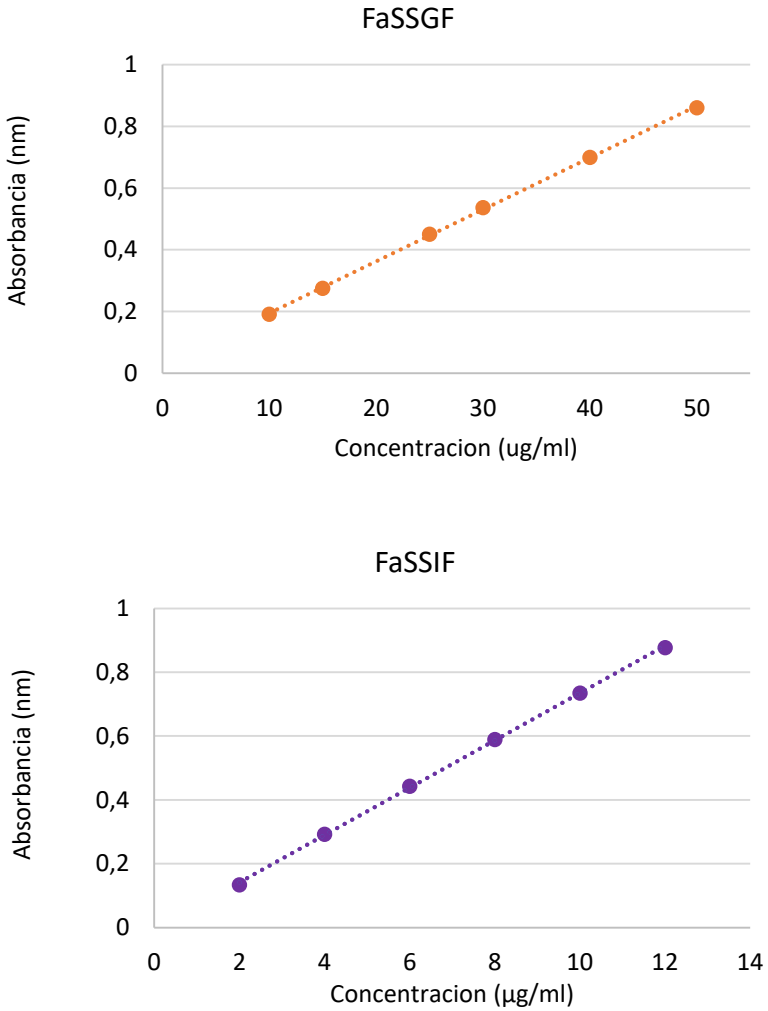


Figura 4.3: Representación gráfica de la recta de calibrado de metformina en a) medio biorrelevante FaSSGF y b) medio biorrelevante FaSSIF

En la tabla 4.5 se muestran los resultados obtenidos en el estudio de linealidad del método analítico por espectrofotometría UV utilizando los dos medios biorrelevantes como disolventes:

Tabla 4.5. Parámetros estadísticos del estudio de linealidad para el método de cuantificación de metformina en FaSSGF y FaSSIF
(p: probabilidad asociada al estadístico correspondiente).

	FaSSGF	**FaSSIF**
Intervalo (µg/mL)	10 - 50	4 - 12
Coeficiente de correlación (R)	0,9994	0,9995
Coeficiente de determinación (R^2)	99,94	99,94
Ordenada en el origen (a)	0,02826	-0,00326
Desviación estándar de "a" (Sa)	0,00443	0,00449
Estadístico t-Student	6,38 (p=0,0000)	-0,73 (p=0,484)
Pendiente (b)	0,01685	0,07373
Desviación estándar de "b" (Sb)	0,00014	0,000576
Estadístico t-Student	118,56 (p=0,000)	127,96 (p=0,0000)
$F_{ANOVA\ regresión}$	14.056,18 (p=0,0000)	16.373,15 (p=0,0000)
Varianza del ajuste (S^2)	0,00670	0,006818
$F_{ANOVA\ falta\ de\ ajuste}$	3,94 (p=0,14)	4,33 (p=0,13)

Mediante el análisis de la varianza de la regresión se evalúa la correlación existente entre las dos variables estudiadas, absorbancia y concentración. Existe una correlación estadísticamente significativa entre ambas variables para los dos disolventes de las muestras utilizados. Esta correlación significativa entre la absorbancia y la concentración de la muestra también se confirman a partir de las pendientes de las rectas de calibración, con valores significativamente distintos de cero y una probabilidad asociada al estadístico "t" de Student igual inferior a 0,05 (p= 0,000) para un nivel de probabilidad del 95%. En ambos medios el coeficiente de correlación (R) tiene un valor próximo a 1 indicando que esta correlación entre la concentración de metformina y la absorbancia es muy elevada. El coeficiente de determinación (R^2) en los dos pH estudiados es mayor de 99,9% por lo que en ese porcentaje la variación del valor de la absorbancia es debida a la variación de la concentración de metformina y el 0,1% restante es debido a otras causas.

En el análisis de falta de ajuste realizado, la probabilidad asociada (p) al valor de F de Snedecor del análisis de la varianza es mayor de p>0,05 en ambos pH: p=0,14 para FaSSGF y p=0,13 para FaSSIF. Estos resultados indican que el modelo seleccionado para el análisis de datos es adecuado para ambos medios biorrelevantes estudiados, con un límite de confianza del 95%, por lo que podemos asegurar que la relación que existe entre las dos variables, absorbancia y la concentración de metformina, es lineal.

Por último, para evaluar si el modelo es proporcional se utilizó la t-Student asociada a la ordenada en el origen (a), obtenida por regresión lineal. La ordenada en el origen no difiere significativamente de cero en FaSSIF, ya que el valor de p> 0,05 (p= 0,484), y por lo tanto el método es proporcional y bastará con la utilización de un patrón para determinar la cantidad de analito en muestras problema. En cambio, en FaSSGF el valor de p< 0,05 (p= 0,000) con un nivel de confianza del 95% establece que la ordenada en el origen difiere significativamente de cero y por lo tanto el método no es proporcional, lo que supone que para determinar la cantidad de analito en las muestras problemas habrá que utilizar al menos dos patrones de diferente concentración.

El ensayo de exactitud y precisión del método de cuantificación del principio activo se ha llevado a cabo con las mismas concentraciones de metformina en cada uno de los medios biorrelevantes que el estudio de linealidad, pero incorporando el polímero que se utilizará en la elaboración de los comprimidos matriciales a una concentración de 50µg/mL y en el medio FaSSGF y de 12 µg/mL en el medio FaSSIF. Los resultados quedan recogidos en las tablas 4.6 y 4.7.

Tabla 4.6. Resultados del ensayo de exactitud y precisión del método de cuantificación de metformina por espectrofotometría UV usando FaSSGF

FaSSGF			
Concentración real (µg/mL)	**Concentración experimental (µg/mL)**	**Recuperación (%)**	**CV (%)**
10	9,66 ± 0,24	96,6	2,44
15	14,82 ± 0,13	98,8	0,85
25	25,44 ± 0,31	101,8	1,22
30	30,39 ± 0,28	101,3	0,92
40	40,11 ± 0,08	100,3	0,19
50	49,58 ± 0,29	99,2	0,59
		99,7	**1,035**

Tabla 4.7. Resultados del ensayo de exactitud y precisión del método de cuantificación de metformina por espectrofotometría UV usando FaSSIF

FaSSIF			
Concentración real (µg/mL)	**Concentración experimental (µg/mL)**	**Recuperación (%)**	**CV (%)**
2	1,88 ± 0,09	94,0	4,45
4	4,06 ± 0,04	101,5	1,01
6	6,12 ± 0,08	102,0	1,36
8	8,03 ± 0,02	100,4	0,24
10	9,98 ± 0,02	99,8	0,17
12	11,94 ± 0,04	99,5	0,33
		99,5	**1,26**

En los dos casos la recuperación media difiere del 100% en menos del 0,5%, con valores individuales comprendidos entre el 96,6% y el 101,78 % en el caso del FaSSGF; y entre el 94% y el 101,5% para las muestras en FaSSIF. Es de destacar que en ambos medios el menos porcentaje de fármaco recuperado, y por lo tanto, el valor más inexacto, se obtiene a la concentración más baja, probablemente debido al mayor porcentaje de polímero respecto al principio activo en las muestras.

En cuanto a la precisión intermedia, el valor medio de los coeficientes de variación es muy próximo a 1, con valores individuales menores en el caso del FaSSGF,

pero siempre inferiores al 5% en todos los casos. Igual que en la determinación de la exactitud, lo peores resultados (coeficientes de variación más altos, se obtienen en las muestras en que la relación metformina: polímero es más baja.

A la vista de los resultados obtenidos, podemos indicar que el método empleado para la determinación de metformina resultó ser selectivo y lineal, y presentó una exactitud y precisión suficientes para su utilización en la determinación del principio activo cedido en los estudios de cesión *in vitro* en ambos medios biorrelevantes, FaSSGF y FaSSIF.

4.2.2. Determinación analítica de budesonida por espectrofotometría UV

En el barrido realizado en el espectrofotómetro ultravioleta con la disolución patrón de budesonida a concentración conocida de 10 µg/mL en medio biorrelevante a pH 6,8, se obtuvo un pico de máxima absorbancia a una longitud de onda (λ) de 246 nm. El mismo resultado se obtuvo cuando se utilizó FaSSGF. Se verificó que no existe ninguna interferencia entre el analito y los medios de cesión cuando se incorporó a los mismos un 0,5% de lauril sulfato sódico, que presentó un máximo de absorción a 215 nm, no interfiriendo con la lectura de budesonida. Sin embargo, cuando se incorporó a los medios de disolución Tween 80 al 0,5% se observó que el tensioactivo presenta un espectro con tres máximos de absorción: a 270nm, 246nm (coincidiendo con el máximo de absorción de budesonida) y 243nm, por lo que no fue posible el análisis selectivo de budesonida en presencia de Tween 80.

En cuanto al estudio de linealidad, en la tabla 4.8 se presentan los datos medios de absorbancia obtenidos para las diferentes concentraciones de budesonida ensayadas en los medios biorrelevantes FaSSGF y FaSSIF respectivamente.

Tabla 4.8. Valores medios de absorbancia en FaSSGF y FaSSIF para la obtención de la curva de calibrado.

FaSSGF		FaSSIF	
Concentración (µg/mL)	**Absorbancia ± DE**	**Concentración (µg/mL)**	**Absorbancia ± DE**
5	0,156 ± 0,005	5	0,152 ± 0,015
10	0,311 ± 0,003	10	0,303 ± 0,013
15	0,471 ± 0,004	15	0,455 ± 0,006
20	0,630 ± 0,002	20	0,609 ± 0,013
25	0,774 ± 0,006	25	0,759 ± 0,011
30	0,927 ± 0,007	30	0,911 ± 0,015

En la figura 4.4 se observa una representación gráfica de las rectas de calibrado de budesonida obtenidas por espectrofotometría en ambos medios biorrelevantes.

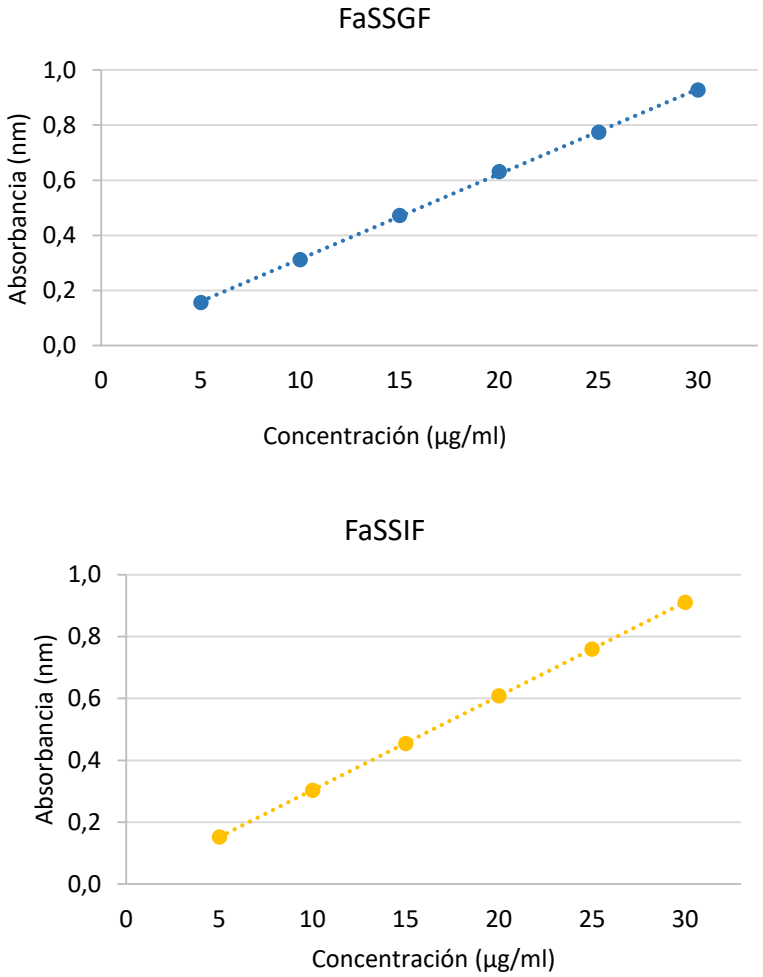


Figura 4.4: Representación gráfica de la recta de calibrado de budesonida en a) medio biorrelevante FaSSGF y b) medio biorrelevante FaSSIF

En la tabla 4.9 se muestran los resultados obtenidos en el estudio de linealidad del método analítico de espectrofotometría UV utilizando los dos medios biorrelevantes como medios de disolución.

Tabla 4.9. Parámetros estadísticos tras el análisis de regresión para el método de cuantificación de la metformina en FaSSGF y FaSSIF (p: probabilidad asociada al estadístico correspondiente)

	FaSSGF	**FaSSIF**
Intervalo (µg/mL)	5 - 30	5 - 30
Coeficiente de correlación (R)	0,9996	0,9997
Coeficiente de determinación (R^2)	99,98	99,88
Ordenada en el origen (a)	0,0047	-0,00042
Desviación de la ordenada (Sa)	0,00400	0,00643
Estadístico t-Student	1,18 (p=0,267)	-0,07 (p=0,949)
Pendiente (b)	0,0308	0,0304
Desviación de la pendiente (Sb)	0,000205	0,000330
Estadístico t-Student	150,45 (p=0,000)	92,09 (p=0,0000)
$F_{ANOVA\ regresión}$	22634,21 (p=0,0000)	8480,78 (p=0,0000)
Varianza del ajuste (S^2)	0,00486	0,01255
$F_{Falta\ de\ ajuste}$	2,39 (p=0,163)	0,01 (p=1)

Mediante el análisis de la varianza de la regresión y el análisis del valor de la pendiente de la recta de regresión se evalúa la correlación existente entre las dos variables estudiadas, absorbancia y concentración. La probabilidad asociada a los estadísticos F de Snédecor y T de Studen, respectivamente, indicó que existía una correlación estadísticamente significativa entre ambas variables. En ambos disolventes el coeficiente de correlación (R) tiene un valor próximo a 1, que indica una muy alta correlación entre las dos variables, y el coeficiente de determinación (R^2), en los dos pH estudiados, es mayor de 99,8%, por lo que en ese porcentaje la variación del valor de la absorbancia es debida a la variación de la concentración de activo.

En el análisis de falta de ajuste realizado, la probabilidad asociada (p) al análisis de la varianza es mayor de p>0,05 en ambos pHs: 2,39 (p=0,163) para FaSSGF y 0,01 (p=1) para FaSSIF; de manera que los datos se ajustan al modelo lineal propuesto.

Para evaluar si el modelo es proporcional se utilizó la t-Student asociada a la ordenada en el origen (a), obtenida por regresión lineal. La ordenada en el origen no difiere significativamente de cero en ambos medios FaSSGF y FaSSIF, ya que la probabilidad es mayor de 0.05 (p>0.05); siendo p=0,267 en FaSSGF y p=0.949 en FaSSIF. Por lo tanto, ambos métodos resultan proporcionales. Ya que la relación entre la concentración de budesonida en ambos medios biorrelevantes y la absorbancia resulta lineal y proporcional, para la cuantificación de muestras problema de budesonida en cualquiera de los dos medios de disolución es suficiente con utilizar un patrón del fármaco en el mismo disolvente.

El ensayo de exactitud y precisión del método de cuantificación del principio activo se ha llevado a cabo con las mismas concentraciones de budesonida en el estudio de linealidad, pero incorporando el polímero que se utilizará en la elaboración de los comprimidos matriciales a una concentración de 30 µg/mL. Los resultados quedan recogidos en las tablas 4.10 y 4.11.

Tabla 4.10. Resultados del ensayo de exactitud y precisión del método de cuantificación de budesonida por espectrofotometría UV usando FaSSGF.

FaSSGF			
Concentración real (µg/mL)	**Concentración experimental (µg/mL)**	**Recuperación (%)**	**CV (%)**
5	4,90 ± 0,07	98,0	1,45
10	9,93 ± 0,05	99,3	0,48
15	15,11 ± 0,08	100,7	0,52
20	20,26 ± 0,19	101,3	0,93
25	24,91 ± 0,06	99,6	0,24
30	29,88 ± 0,09	99,6	0,29
		99,8	**0,65**

Tabla 4.11. Resultados del ensayo de exactitud y precisión del método de cuantificación de budesonida por espectrofotometría UV usando FaSSIF.

FaSSIF			
Concentración real (µg/mL)	**Concentración experimental (µg/mL)**	**Recuperación (%)**	**CV (%)**
5	5,01	100,2	0,13
10	9,98	99,8	0,12
15	14,98	99,9	0,12
20	20,05	100,3	0,18
25	25,00	100,0	0,01
30	29,99	100,0	0,03
		100,0	**0,10**

Destaca la elevada exactitud de ambos métodos, con valores de recuperación media que difieren menos 0,25% del 100%, y valores individuales que no difieren más del 2% del valor real.

En cuanto a la precisión intermedia, los coeficientes de variación son inferiores al 1,5% en todos los casos.

Por tanto, conforme a los resultados obtenidos, la espectrofotometría UV resulta procedimiento válido para la cuantificación de budesonida disuelta en FaSSGF o en FaSSIF, en un intervalo de concentraciones de 5 a 30µg/mL, en presencia tanto del polímero PAMgA como de lauril sulfato sódico, al ser selectivo, lineal, exacto y preciso. Sin embargo, la técnica carece de selectividad para la cuantificación del principio activo en presencia de Tween 80.

4.2.3. Determinación analítica de budesonida por HPLC

En las condiciones analíticas previamente descritas, empleando una longitud de onda de λ=254 nm y un flujo = 1.4 mL/min, se obtuvo un pico máximo en el cronograma a un tiempo de retención de 2,7 minutos correspondiente a la budesonida. Como se puede ver en las figuras 4.5 y 4.6, el pico obtenido está bien definido y, en ambos casos,

separado de los picos correspondientes a los medios biorrelevantes. En efecto, al determinar la resolución entre los picos de budesonida y los picos próximos correspondientes al disolvente se obtienen valores superiores a 5 (tabla 4.12).

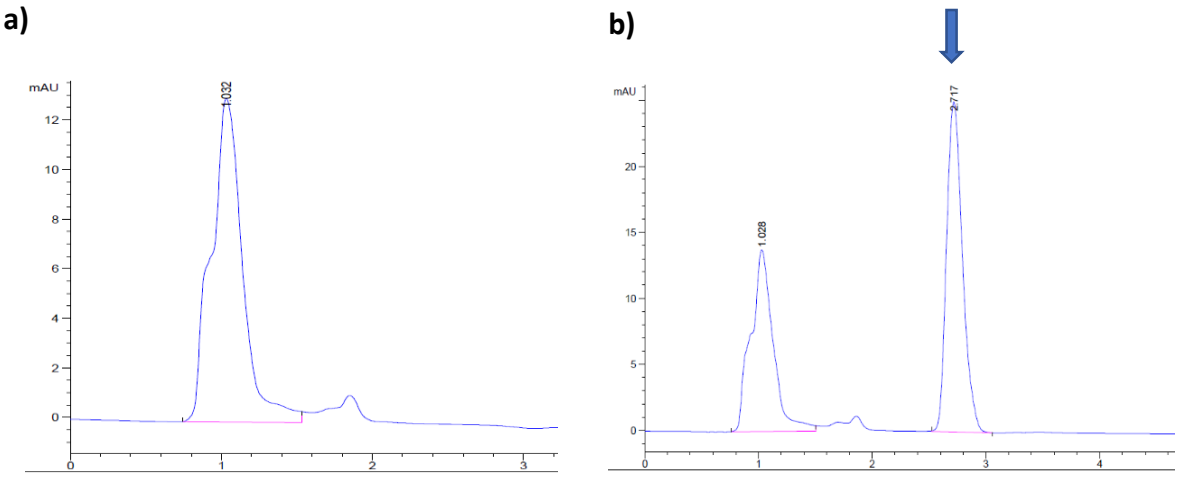


Figura 4.5: Cromatograma correspondiente a una muestra de medio biorrelevante FaSSGF (a) y una solución patrón de budesonida (10µg/mL) en medio biorrelevante FaSSGF (b)

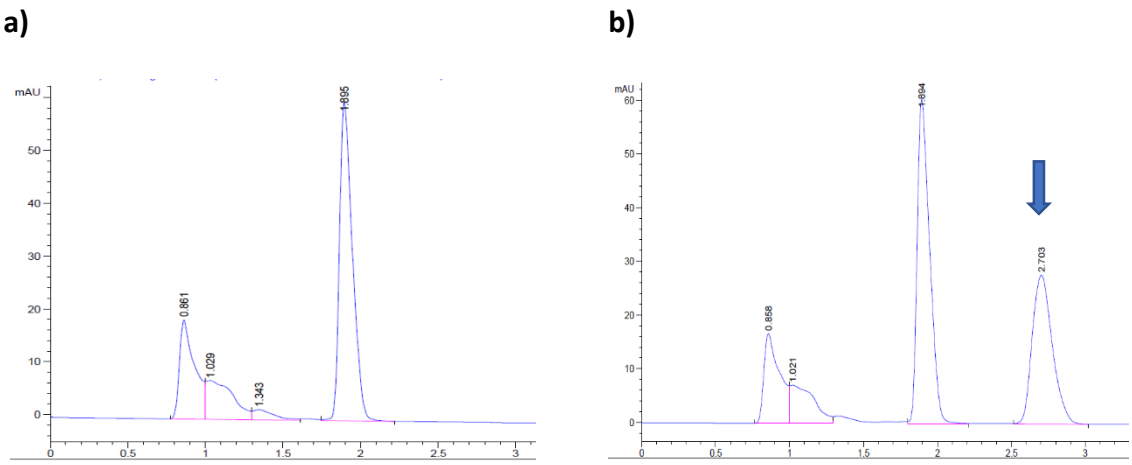


Figura 4.6: Cromatograma correspondiente a una muestra de medio biorrelevante FaSSIF (a) y una solución patrón de budesonida (10µg/mL) en medio biorrelevante FaSSIF (b)

Tabla 4.12. Cálculo de la resolución de los picos cromatográficos

Componente	Anchura de pico (W)	Tiempo de retención (tr)	Resolución (R)
Budesonida	0.1527	2.717	5,553
FaSSGF	0.1885	1.028	
Budesonida	0.1480	2.703	5,553
FaSSIF	0.0870	1.894	

En la tabla 4.13 se muestran los resultados de los parámetros de idoneidad del método analítico: factor de asimetría (T) y número de platos teóricos (N) para el pico correspondiente a la budesonida.

Tabla 4.13. Valores de los parámetros de idoneidad del método por HPLC.

	FaSSGF	FaSSIF
Tiempo de retención (tr)	2,717	2,703
Factor de asimetría (T)	0,869	0,822
Número de platos teóricos (N)	2103,58	2159,20

Los resultados obtenidos en el análisis de los parámetros cromatográficos nos indican que el pico correspondiente a la budesonida es simétrico, en ambos medios biorrelevantes. En nuestras condiciones experimentales, el valor de N obtenido fue superior a 2100 platos teóricos, en los dos medios biorrelevantes, mostrando que la columna utilizada es eficiente para el método analítico de la budesonida por HPLC.

Para el estudio de linealidad se usaron las siguientes concentraciones 0,5; 1; 3; 5; 7; 9; 11 µg/mL de budesonida, en cada uno de los medios biorrelevantes FaSSGF y FaSSIF. En la tabla 4.14 se recogen los valores medios de unidades de área (UA) obtenidos para cada una de estas muestras. Cada muestra ha sido analizada por duplicado.

El cambio de método analítico para la determinación de la budesonida en los medios biorrelevantes vino determinado, como ya se ha indicado, por la necesidad disponer de un método analítico con un límite de detección de como máximo 1µg/mL,

debido a la baja dosis a la que se utiliza este fármaco en formas farmacéuticas de administración por vía oral.

En los ensayos de cesión de budesonida a partir de los comprimidos matriciales, las concentraciones máximas que se alcanzan son de 9µg/mL en el vaso de cesión, valores demasiado bajos para su determinación por espectrofotometría UV (rango ensayado 5 – 30 µg/mL).

Tabla 4.14. Valores medios en UA obtenidos con las muestras del estudio de linealidad en FaSSGF y FaSSIF. DE: desviación estándar.

FaSSGF		**FaSSIF**	
Concentración (µg/mL)	**UA ± DE**	**Concentración (µg/mL)**	**UA ± DE**
0,5	25,275 ± 3,230	0,5	25,900 ± 2,404
1	50,075± 3,667	1	45,000 ± 3,315
3	145,225± 9,085	3	132,933 ± 16,599
5	251,975± 12,708	5	237,667 ± 16,385
7	348,250± 14,343	7	326,450 ± 27,315
9	443,750± 25,506	9	411,297 ± 36,635
11	533,950± 17,723	11	516,900 ± 36,911

En la figura 4.7 se observa una representación gráfica de la recta de calibrado obtenidas en ambos medios biorrelevantes (intervalo 0,5 – 11 µg/mL).

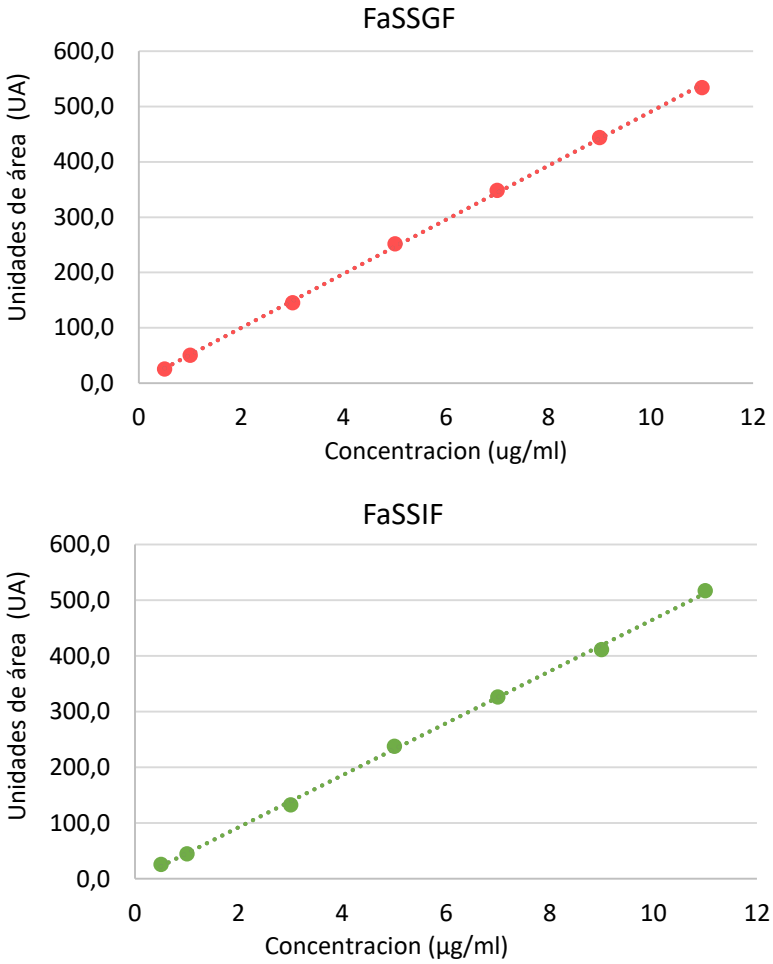


Figura 4.7: Representación gráfica de la recta de calibración de budesonida en a) medio biorrelevante FaSSGF y b) medio biorrelevante FaSSIF por HPLC

En la tabla 4.15 se muestran los resultados obtenidos en el análisis de estos datos del estudio de linealidad del método analítico por HPLC utilizando los dos medios biorrelevantes como medios de disolución.

Tabla 4.15. Parámetros estadísticos del estudio de linealidad del método de cuantificación de budesonida en FaSSGF y FaSSIF.

	FaSSGF	**FaSSIF**
Intervalo (µg/mL)	0,5 - 11	0,5 - 11
Coeficiente de correlación (R)	0,9986	0,9924
Coeficiente de determinación (R^2)	99,49	98,61
Ordenada en el origen (a)	2,25	-1,03
Desviación estándar de "a" (Sa)	4,39	8,35
Estadístico t-Student	0,51 (p=0,612)	-0,12 (p=0,903)
Pendiente (b)	48,842	46,58
Desviación estándar de "b" (Sb)	0,687	1,34
Estadístico t-Student	71,11 (p=0,000)	34,73 (p=0,000)
$F_{\text{ANOVA regresión}}$	742,61 (p=0,000)	151,45 (p=0,000)
Varianza del ajuste (S^2)	14,3361	23,5491
$F_{\text{ANOVA falta de ajuste}}$	0,38 (p=0,857)	0,16 (p=0,973)
Límite de detección (LD)	0,256 µg/mL	0,775 µg/mL
Límite de cuantificación (LC)	0,344 µg/mL	1,042 µg/mL

Tras el análisis estadístico confirmó la alta correlación entre ambas variables: la concentración de analito y el área bajo la curva del pico de budesonida en los cromatogramas. En ambos casos el coeficiente de correlación (R) tiene un valor próximo a 1. El coeficiente de determinación (R2), en los dos pH estudiados, es mayor de 98 % , lo que indica que la diferente respuesta cromatográfica obtenida con las distintas concentraciones se explica, en ese porcentaje, por la variación de la concentración de activo. En ambos medios biorrelevantes podemos asegurar que el modelo se ajusta a un modelo lineal, con valores de F de Snédecor para el ANOVA en el que se evalúa la falta de ajuste superiores a 0,05: p=0,857 para FaSSGF y p=0,973 para FaSSIF.

Para evaluar si el modelo es proporcional se utilizó la t-Student asociada a la ordenada en el origen (a), obtenida por regresión lineal. La ordenada en el origen no

difiere significativamente de cero en ambos medios FaSSGF y FaSSIF, ya que el valor de p> 0,05; p=0,612 en FaSSGF y p=0,903 en FaSSIF.

Por lo tanto, podemos asegurar que la relación que existe entre las dos variables, área bajo la curva y la concentración de budesonida, es lineal y proporcional, pudiendo ser utilizados para la determinación in vitro de la budesonida cedida, a partir de los comprimidos matriciales elaborados, en los medios biorrelevantes seleccionados FaSSGF y FaSSIF. Para la determinación de la concentración de fármaco en estas muestras problemas únicamente será necesaria la utilización de una muestra patrón de budesonida.

Los valores de límite de detección y de límite de cuantificación se han calculado matemáticamente utilizando la desviación estándar residual del ajuste al modelo lineal. Como puede observarse por los datos de la tabla, tanto en el caso del FaSSGF como del FaSSIF, los valores de límite de cuantificación son ligeramente superiores al límite inferior del intervalo (0,5µg/mL). Por tanto, para poder usar el método para la cuantificación de budesonida a concentraciones inferiores a los valores del LC habría que verificar experimentalmente la exactitud y precisión del método a esas concentraciones.

Los estudios de exactitud y de precisión del método de cuantificación del principio activo se ha llevado a cabo con las mismas concentraciones de budesonida en cada uno de los medios biorrelevantes que el estudio de linealidad, pero incorporando el polímero que se utilizará en la elaboración de los comprimidos matriciales a una concentración de 11µg/mL. Los resultados quedan recogidos en las tablas 4.16 y 4.17.

Tabla 4.16. Resultados del ensayo de exactitud y precisión del método de cuantificación de budesonida por HPLC usando FaSSGF

Concentración real (µg/mL)	Concentración experimental (µg/ml)	Recuperación (%)	CV (%)
0,5	0,49 ± 0,02	98,0	4,16
1	0,99 ± 0,01	99,0	1,49
3	2,96 ± 0,05	98,7	1,73
5	5,06 ± 0,08	101,2	1,58
7	7,04 ± 0,06	100,6	0,84
9	9,02 ± 0,03	100,2	0,31
11	10,94 ± 0,08	99,5	0,74
		99,6	**1,69**

Tabla 4.17. Resultados del ensayo de exactitud y precisión del método de cuantificación de budesonida por HPLC usando FaSSIF

Concentración real (µg/mL)	Concentración experimental (µg/ml)	Recuperación (%)	CV (%)
0,5	0,54 ± 0,06	108,0	10,25
1	0,99 ± 0,01	99,0	0,84
3	2,94 ± 0,09	98,0	2,98
5	5,06 ± 0,09	101,2	1,74
7	7,02 ± 0,02	100,3	0,31
9	8,93 ± 0,10	99,2	1,17
11	11,06 ± 0,08	100,6	0,76
		100,9	**2,88**

En los dos casos la recuperación media difiere del 100% en menos del 1 %, con valores individuales comprendidos entre el 98,0% y el 101,2% en el caso del FaSSGF; y entre el 98,0% y el 108,0% para las muestras en FaSSIF. Es de destacar que en ambos medios la mayor desviación en el porcentaje de fármaco recuperado, y por lo tanto, el valor más inexacto, se obtiene a la concentración más baja (0,5 µg/mL), probablemente debido a que se encuentra próxima al límite de cuantificación del método.

En cuanto a la precisión intermedia, el valor medio de los coeficientes de variación es inferior a 3, con valores individuales menores en el caso del FaSSGF. Igual que en la determinación de la exactitud, lo peores resultados (coeficientes de variación más altos) se obtienen en las muestras correspondientes al límite inferior del intervalo: CV 4,16 en FaSSGF y CV 10,25 en FaSSIF; lo que vuelve a confirmar que la concentración de 0,5 µg/mL estaría próxima al límite de cuantificación del método.

A la vista de los resultados obtenidos, podemos indicar que el método empleado para la determinación de budesonida en resultó ser selectivo y lineal, y presentó una exactitud y precisión suficientes para su utilización en la determinación del principio activo cedido en los estudios de cesión in vitro en ambos medios biorrelevantes, FaSSGF y FaSSIF en un intervalo de concentraciones de 1 a 11µg/mL; disminuyendo sensiblemente su exactitud y precisión para concentraciones inferiores a 1µg/mL.

4.2.4. Estudio de solubilidad de la budesonida en FaSSGF y FaSSIF

Como ya se ha comentado, para mantener las condiciones SINK durante todo el ensayo de cesión y evitar que su disolución esté limitada por la saturación del medio, se recurrirá a añadir un tensioactivo al medio de disolución. Inicialmente se seleccionaron dos tensioactivos: un tensioactivo no iónico como es el Tween 80 y un tensioactivo iónico como es el Lauril sulfato sódico (LSS). Sin embargo, en la validación del método por espectrofotometría UV para la cuantificación de budesonida se comprobó que el Tween 80 interfería en la lectura del principio activo, careciendo el método de selectividad, por lo que finalmente el estudio de solubilidad se realizó únicamente con lauril sulfato sódico.

Para determinar la concentración necesaria de lauril sulfato sódico para garantizar las condiciones SINK en los ensayos de cesión, se prepararon disoluciones de budesonida a diferentes concentraciones de LSS en ambos medios biorrelevantes FaSSGF y FaSSIF. Partiendo de una solución patrón de 0,5 mg/mL de budesonida en cada uno de los medios, se fueron añadiendo concentraciones crecientes de LSS en cada uno de los tubos de ensayo: 0 (sin tensioactivo); 0,05; 0,1; 0,5 y 1 %. El contenido de los tubos

de ensayo se filtró y se determinó la concentración de budesonida mediante los dos métodos analíticos desarrollados: espectrofotometría UV (tabla 4.18) y HPLC (tabla 4.19). Se obtuvieron resultados similares.

Tabla 4.18: Datos de solubilidad de la budesonida en los dos medios biorrelevantes medidos por espectrofotometría UV

	FASSGF		FASSIF	
Concentración LSS (µg/mL)	**Concentración (mg/mL)**	**Cs (mg/mL)**	**Concentración (mg/mL)**	**Cs (mg/mL)**
0	0,019	0,019	0,023	0,023
0,05	0,067	0,067	0,086	0,086
0,1	0,159	0,159	0,166	0,166
0,5	0,508	**>0,50**	0,541	**>0,50**
1	0,577	**>0,50**	0,548	**>0,50**

El valor de concentración se corresponde con el coeficiente de solubilidad (Cs) de budesonida en cada caso. En ausencia de tensioactivo se obtienen valores de coeficiente de solubilidad similares a los recogidos en la bibliografía utilizando agua como disolvente. Además, se puede decir que la solubilidad del principio activo es ligeramente superior a pHs básicos si lo comparamos con un pH acido, aunque la diferencia no es significativa.

Tabla 19: Datos de solubilidad de la budesonida en los dos medios biorrelevantes medidos por HPLC

	FASSGF		FASSIF	
Concentración LSS (µg/mL)	**Concentración (mg/mL)**	**Cs (mg/mL)**	**Concentración (mg/mL)**	**Cs (mg/mL)**
0	0,020	0,020	0,045	0,045
0,05	0,071	0,071	0,064	0,064
0,1	0,150	0,150	0,094	0,094
0,5	0,500	**>0,50**	0,497	**>0,50**
1	0,489	**>0,50**	0,522	**>0,50**

Para conseguir trabajar por debajo del 20% del coeficiente de solubilidad, durante todo un ensayo de disolución, realizado con 9 mg de budesonida en 900 mL de

medio biorrelevante (concentración de 0,01 mg/mL), es necesario un coeficiente de solubilidad del principio activo en el medio de al menos 50 µg/mL; y para trabajar por debajo del 10% del coeficiente de solubilidad, este coeficiente de solubilidad tendrá que ser mayor de 100 µg/mL. Comparando estos datos con los resultados obtenidos se concluye que utilizando una concentración de LSS del 0,5% se garantizan, con total seguridad que se trabajará en condiciones SINK durante el ensayo de disolución de budesonida en los dos medios biorrelevantes, FaSSGF y FaSSIF.

5. DESARROLLO DE COMPRIMIDOS MATRICIALES DE METFORMINA

PUBLICACIÓN: *CONTROLLED RELEASE OF HIGHLY HYDROPHILIC DRUGS FROM NOVEL POLY(MAGNESIUM ACRYLATE) MATRIX TABLETS*

pharmaceutics

MDPI

Article

Controlled Release of Highly Hydrophilic Drugs from Novel Poly(Magnesium Acrylate) Matrix Tablets

Rebeca Simancas-Herbada [1], Ana Fernández-Carballido [1,2], Juan Aparicio-Blanco [1,2], Karla Slowing [3], Jorge Rubio-Retama [4], Enrique López-Cabarcos [4] and Ana-Isabel Torres-Suárez [1,2,*]

1 Department of Pharmaceutics and Food Technology, Faculty of Pharmacy, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain; rebecasimancas@gmail.com (R.S.-H.); afernand@ucm.es (A.F.-C.); juan.aparicio.blanco@ucm.es (J.A.-B.)

2 Institute of Industrial Pharmacy, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

3 Department of Pharmacology, Pharmacognosy and Botany, Faculty of Pharmacy, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain; karlas@farm.ucm.es

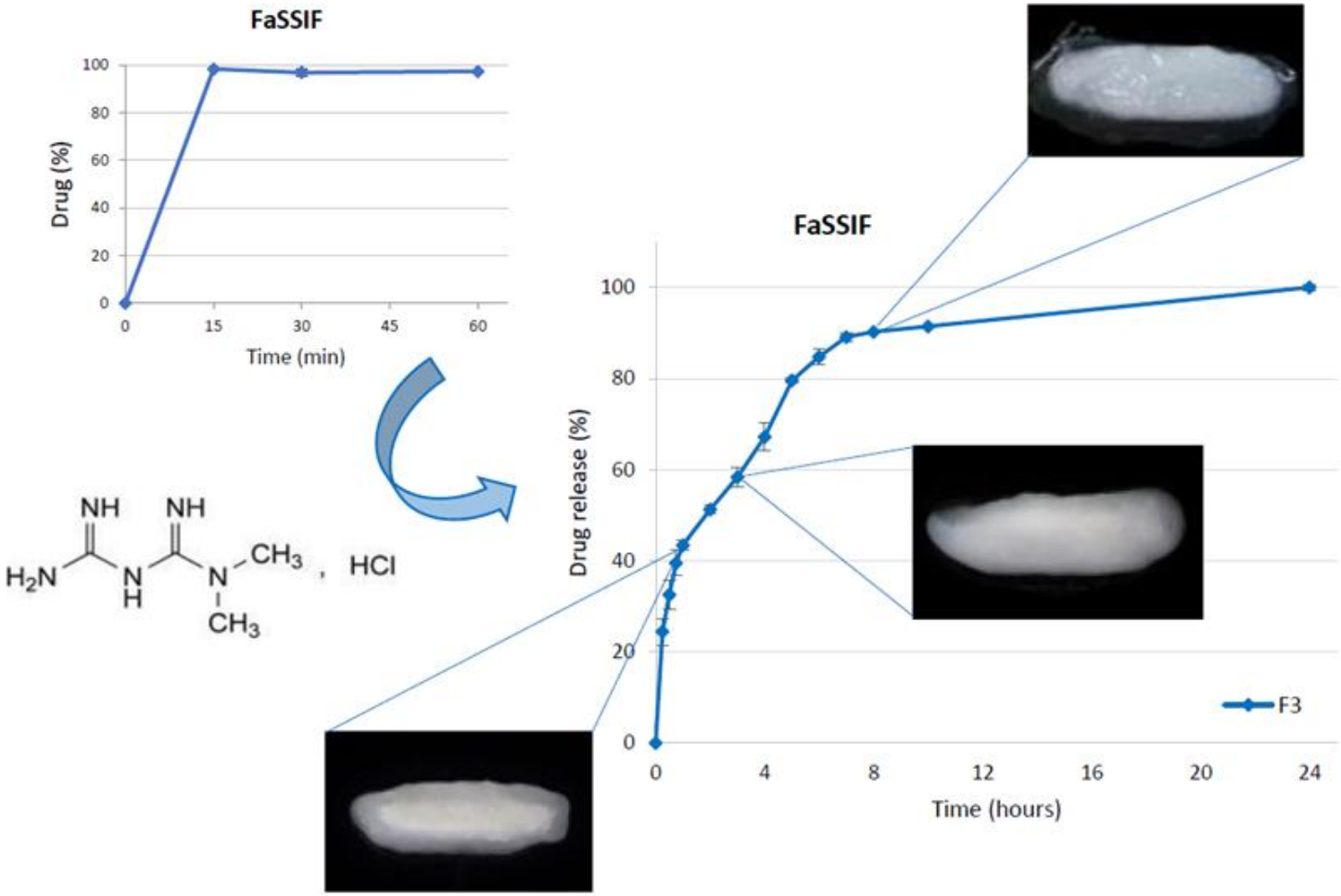
4 Department of Chemistry in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain; bjrubio@ucm.es (J.R.-R.); cabarcos@ucm.es (E.L.-C.)

* Correspondence: galaaaa@ucm.es; Tel.: +34-913-941-735; Fax: +34-913-941-736

Received: 21 January 2020; Accepted: 14 February 2020; Published: 19 February 2020

check for updates

Pharmaceutics **2020**, *12*, 174; doi:10.3390/pharmaceutics12020174 www.mdpi.com/journal/pharmaceutics


FaSSIF
Drug (%)
Time (min)
NH
NH
H_2N
N
H
N
CH_3
CH_3
, HCl
FaSSIF
Drug release (%)
Time (hours)
F3

Abstract: The potential of a new poly(magnesium acrylate) hydrogel (PAMgA) as a pharmaceutical excipient for the elaboration of matrix tablets for the extended release of highly hydrophilic drugs was evaluated. The polymer was synthetized with two different crosslinking degrees that were characterized by FTIR and DSC. Their acute oral toxicity was determined in a mouse model, showing no toxicity at doses up to 10 g/kg. Matrix tablets were prepared using metformin hydrochloride as a model drug and the mechanisms involved in drug release (swelling and/or erosion) were investigated using biorrelevant media. This new hydrogel effectively controlled the release of small and highly hydrophilic molecules as metformin, when formulated in matrix tablets for oral administration. The rate of metformin release from PAMgA matrices was mainly controlled by its diffusion through the gel layer (Fickian diffusion). The swelling capacity and the erosion of the matrix tablets influenced the metformin release rate, that was slower at pH 6.8, where polymer swelling is more intensive, than in gastric medium, where matrix erosion is slightly more rapid. The crosslinking degree of the polymer significantly influenced its swelling capacity in acid pH, where swelling is moderate, but not in intestinal fluid, where swelling is more intense.

Keywords: poly(magnesium acrylate); hydrogel; metformin; matrix tablets; oral controlled release; swelling; erosion studies;)

5.1. *INTRODUCTION*

Metformin HCl (1,1-dimethylbiguanide hydrochloride), belonging to the group of oral hypoglycaemic drugs, is the most used oral treatment in patients with type 2 diabetes mellitus. It exerts its pharmacological action mainly by decreasing both hepatic gluconeogenesis and glycogenolysis. Metformin has low potency and a short biological half-life of approximately 2 h [1]. Consequently, it is used in therapeutics at high-doses and short dose intervals: the usual doses vary between 500 and 1000 mg and they must be administered from 2 to 3 times a day. In immediate-release dosage forms, metformin exhibits an oral bioavailability of 55 ± 16% because, on the one hand, it presents an absorption window limited to the upper segments of the intestinal tract [2]; and, on the other hand, the transporters mediating its absorption are saturable, which makes metformin bioavailability dose-dependent [3]. Moreover, the presence of high concentrations of metformin in the bowel produces gastrointestinal side effects such as diarrhoea, flatulence, vomiting and nausea.

Extended-release tablets are a good alternative to reduce both the gastrointestinal side effects and the frequency of administration thanks to the gradual and prolonged release of the drug [4], and to ultimately improve patient compliance.

Hydrogels are a group of hydrophilic polymer networks that show high capacity to retain in their structure large amounts of water or biological fluids, introducing an elastic modulus and swelling while remaining insoluble and maintaining the shape [5–8]. This makes them good excipients for extended-release tablets wherein the powdered drug is directly mixed with the polymer and compressed to obtain matrix structures. The rate of drug release from hydrogel matrices depends on the polymer swelling, the drug dissolution and the erosion of the swelled polymer chains [9–11].

However, the number of hydrogels used as excipients in the development of new tablet formulations is limited by the need to show adequate mechanical properties, high biocompatibility and a good control of drug release. Indeed, in the case of hydrophobic

drugs, the erosion is the main mechanism for drug release, and in the case of biologics such as peptides and proteins, their high molecular size (~400 Da to 30 kDa) limits their diffusion. On the contrary, in the case of small highly water-soluble drugs, their rapid diffusion would make it difficult to achieve an effective control of their release without incorporating hydrophobic polymers [12].

Therefore, the synthesis of new extended release excipients is focusing on developing hydrogels with adequate properties such as compressibility, mechanical strength and modulus, sensitivity to temperature, sensitivity to pH and/or control of drug release. Among the most interesting non-cellulose hydrogels are poly(acrylic acid) derivatives, which are used in topical and oral administration of drugs. These hydrogels show a good biocompatibility and excellent mucoadhesive properties [13,14].

Considering these potential advantages associated with polyacrylic polymers, we synthesized a poly(magnesium acrylate)-PAMgA-hydrogel (fully characterized by Rubio-Retama and López Cabarcos in previous works [5,15]). This hydrogel could be used as an excipient for the development of extended release matrix tablets.

The main aim of this work was to evaluate the potential of this PAMgA hydrogel as pharmaceutical excipient for the elaboration of matrix tablets for the extended release of highly hydrophilic drugs. Metformin was selected as a prototype of small and highly water-soluble drug. The polymer was synthetized with two different crosslinking degrees. In a first step, the thermal and spectroscopic properties of the polymer were determined, and its acute oral toxicity was evaluated in a mouse model. Later, different formulations of metformin matrix tablets were developed, and their drug release profiles were studied using biorelevant media along with the main mechanism involved in drug release (swelling and/or erosion).

5.2. *MATERIALS AND METHODS*

5.2.1. Materials

Metformin HCl was purchased from Fagron Iberica (Barcelona, Spain). Sodium taurocholate hydrate, acrylic acid, *N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethylethylenediamine (TEMED), ammonium persulfate (PSA), magnesium hydroxide and pepsin from porcine gastric mucosa were provided from Sigma-Aldrich Spain (Madrid, Spain). Lecithin soy refined was supplied by MP Biomedicals (Illkirch, France). Sodium phosphate monobasic from Acros Organics (Geel, Belgium) and Blanose CMC 7LF were purchased from Ashland Chemical Hispania (Castellón, Spain). All other solvents and reagents (analytical grade) were purchased from Panreac Química (Barcelona, Spain) and utilized as supplied.

5.2.2. Synthesis of the Poly(Magnesium Acrylate): PAMgA

The synthesis of the hydrogel was carried out in two steps: a) preparation of the monomer (AMgA) and b) synthesis of the poly (magnesium acrylate) (PAMgA).

The elaboration of the monomer was carried out by a neutralization reaction. An amount of 2 M acrylic acid was added dropwise to a solution of magnesium hydroxide (1 M) in distilled water under constant stirring and controlled temperature (18 °C). When the dispersion changes from off-white to a yellowish transparent solution (24 h), the reaction is concluded. The solution of AMgA is then filtered and concentrated 25% wt. in a rotary evaporator.

The synthesis of PAMgA was carried out by the free radical polymerization method, using ammonium persulfate (PSA) as initiator and TEMED as a catalyst. The hydrogel was synthesized in two different concentrations of PSA: 5 mM (PAMgA 5) and 40 mM (PAMgA 40) that conferred two crosslinking degrees. Polymerization took place at room temperature. The polymers obtained were maintained in distilled water at room temperature for seven days, replacing the water every day. This step was essential to

ensure that any rest of unreacted monomer AMgA was removed. Polymer PAMgA was then lyophilized (LIOALFA-6, Telstar, Madrid, Spain), and the powder obtained was sieved and used as excipient to prepare tablets. The two hydrogels obtained were: PAMgA 5, with long segments between linking points in magnesium acrylate monomer chains (AMgA); and PAMgA 40, with short polymer chains between crosslinking points.

5.2.3. Characterization of the Polymer

Differential scanning calorimetry (DSC): A thermal analysis of both polymers, PAMgA 5 and PAMgA 40, was done with a Mettler 820 DSC (Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland). The temperature scale was calibrated using the melting temperatures of indium and zinc. The rate of dry nitrogen flow and rate of heating were 80 mL/min and 10 °C/min, respectively. Samples (4–5 mg) were double scanned with a heating range from −90 °C up to 250 °C. An empty aluminium pan was used as reference.

Fourier transform infrared spectra (FTIR): Spectra were recorded on a Nicolet IR200 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) within a range of wave number 400–4000 cm^{-1} at room temperature. Potassium bromide (KBr) pellet method was employed.

5.2.4. In Vivo Oral Biocompatibility Study of PAMgA

High doses were used to evaluate the acute toxicity of PAMgA 5 and PAMgA 40. Animal procedures were approved by the Ethics Committee of the Complutense University of Madrid (PROEX 148/17, 3 of November of 2017, Madrid, Spain) and conducted according to European Community Council Directive 010/63/UE. The study was performed with adult male Swiss mice (30 ± 2 g) which were divided in six different groups that received PAMgA polymer at different doses. Mice were kept in standardized conditions of temperature 22 ± 3 °C, 12 h light on/off cycle, feeding and water ad libitum. The polymer was administered at the solid state, mixed at different proportions with maintenance food and forming pellets with a total weight of 2 g. To ensure the ingestion

of the polymer, mice were deprived of food 24 h prior to the administration and pellet consumption was allowed for a maximum time interval of 4 h. To determine the exact amount of hydrogel ingested by each mouse, the difference between the initial weight of the pellets (2 g) and the final weight remaining after ingestion was calculated. To unify the dose, when the weight of the ingested pellet deviates from ± 20% of the reference values (Table 5.1), the animal was rejected.

Table 5.1. Experimental groups for the oral biocompatibility assay.

Group	PAMgA 5	Group	PAMgA 40
I	1 ± 0.2 g/Kg	**IV**	1 ± 0.2 g/Kg
II	5 ± 1 g/Kg	**V**	5 ± 1 g/Kg
III	10 ± 2 g/Kg	**VI**	10 ± 2 g/Kg

General behaviour of mice and symptoms such as changes in mobility, vomiting, restlessness, squeaks and diarrhoea were constantly overseen during the first hour after ingestion, and then after 4, 8, 24, 48 and 72 h, as previously reported [16]. The response of animals to oral administration was assessed on a 0–2 scale as follows. Zero correlates with a no response, or normal response; 1 refers to only one episode or a light response, and 2 is more than one event or a severe response to oral administration. Mice were observed and weighed after 24, 48 and 72 h following the oral administration to detect any signs of toxicity and mortality. At the end of the experiment, the animals were sacrificed and dissected for the observation of the organs.

5.2.5. Preparation of Tablets

Tablets were prepared using both types of powdered PAMgA: PAMgA 5 and PAMgA 40, as excipients for matrix tablets. The active ingredient, metformin HCl, was used as the supplied powder or previously granulated by wet granulation. For the granulation process, a 5% aqueous solution of NaCMC (Blanose CMC 7LF) was used as binder; the wet mass was forced through a 1 mm aperture size sieve; the granules were then dried at 35 °C for 24 h and subsequently sieved through a 1 mm sieve. Metformin, powder or granules, was blended with the polymer in a 50% w/w ratio. Tablets were obtained by

direct compression with a single-punch eccentric tableting machine (J. Bonals 30B, Barcelona, Spain) using 14 mm biconcave oval punches. Table 5.2 shows the composition of the four different batches of tablets prepared.

Table 5.2. Composition of metformin tablets F1–F4.

Ingredients (g)	F1	F2	F3	F4
PAMgA 5	0.50	-	0.50	-
PAMgA 40	-	0.50	-	0.50
Metformin HCl	0.50	0.50	-	-
Metformin HCl granules	-	-	0.50	0.50

5.2.6. In Vitro Drug Release

To determine the release profile of metformin from tablets, biorrelevant media were used: Simulated Fasted Gastric State (FaSSGF) pH 1.2 and Simulated Fasted State Conditions in the Small Intestine (FaSSIF) at pH 6.8. These media resemble physiological conditions of the gastrointestinal track [17] as they incorporate substances that may modify the dissolution rate of the drug, such as pepsin, lecithin or sodium taurocholate [18]. The composition of the biorrelevant media FaSSGF and FaSSIF is shown in Table 5,.3.

Table 5.3. Composition of the biorrelevant media FaSSGF and FaSSIF.

Components	FaSSGF	FaSSIF
Sodium taurocholate	80 µM	3 mM
Lecithin	20 µM	0.75 mM
Sodium dihydrogen phosphate	-	3.438 g
Pepsin	0.1 mg/mL	-
Sodium chloride	34.2 mM	6.186 g
Hydrogen chloride qs ad	pH 1.2	-
Sodium hydroxide qs ad	-	pH 6.8
Deionized water	1 L	1 L
Osmolarity (mOsmol/Kg)	120.7 ± 2.5	~ 270
Surface tension (mN/m)	42.6	54
pH	1.2	6.8

Dissolution tests were carried out using USP dissolution apparatus type II (708-DS, Agilent Technologies, USA), regulated to 100 rpm and 37 ± 0.1 °C. With the purpose of determining the way in which metformin incorporation and the different degree of crosslinking influences drug release from the matrix tablets, two distinct biorelevant media (namely, FaSSGF or FaSSIF (1000 mL)) were used as dissolution medium. Aliquots of 5 mL were withdrawn at predetermined time intervals (15, 30 and 45 min, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 and 24 h) and filtered through 0.45 µm membrane filter (Millex-LCR, Millipore). Drug concentration was determined by spectrophotometry UV at 232 nm (DU-7 Spectrophotometer UV-Vis, Beckman Coulter, USA). Experiments were performed in triplicate for each formulation and results are expressed as percentage of drug dissolved (mean ± SD). Dissolution data were fitted to the exponential equation used to evaluate the behaviour of controlled release pharmaceutical forms—Korsmeyer Peppas release model (equation 1) [19].

This equation is used for polymeric systems where the release mechanism is not well known, or more than one type of release behaviour is involved. M_t/M_∞ is the

fraction of drug released at time t, k is the kinetic constant, which depends on the geometrical properties of the tablet, and n is the release exponent for the drug.

$$\frac{Mt}{M\infty} = k\ t^n \tag{1}$$

For a cylindrical matrix, n values < 0.45 indicate Fickian release mechanism (diffusional controlled release); 0.45 < n < 0.89 indicate an anomalous release (non-Fickian) and n > 0.89 indicate Case II transport kinetics (relaxation-controlled delivery). Only the data corresponding to Mt/M∞ values below 0.60 were used to calculate the value of the release exponent.

The dissolution profiles of tablet formulations were compared by the difference factor (ƒ1) and similarity factor (ƒ2) using the equations (2) and (3), respectively.

$$f1 = \frac{\sum_{t=1}^{n} |Rt - Tt|}{\sum_{t=1}^{n} Rt} \cdot 100 \tag{2}$$

$$f2 = 50 \cdot \log\left\{\left[1 + \frac{1}{n} \cdot \sum_{t=1}^{n} (Rt - Tt)^2\right]^{-0.5} \cdot 100\right\} \tag{3}$$

where n is the number of time points, and R_t and T_t are the percentage of drug released at time t of each of the pairs of metformin tablets compared [20–22]. Only one measurement was considered after 85% of the drug had been released. When the f_1-value is between 0 and 15%, the curves were considered overlapping and with f_2-values between 50 and 100 were considered similar. At last, dissolution data at pH 6.8 of the best formulation was analyzed in order to determine if it meets the specifications listed in the USP monograph of Metformin hydrochloride extended release tablets.

5.2.7. Swelling and Matrix Erosion Behaviour

The dissolution apparatus USP type II at 100 rpm and 37 ± 0.1 °C was used. In this assay, 250 mL of biorrelevant media (FaSSGF or FaSSIF) was used [18]. The matrix tablets (F3 and F4) were weighed and placed in the dissolution vessels containing the medium. The tablets were withdrawn at different time intervals: 1, 4 and 8 h, slightly blotted with a tissue paper to remove excess of medium and re-weighed to calculate swelling capacity. Then tablets were dried in a hot-air oven at 50 °C until constant weight to calculate the erosion percentage. Swelling capacity (SW) and matrix erosion (E) were estimated using equations (4) and (5) respectively, where W_o is the initial weight of the dry matrices; W_f is the final weight after drying; W_i is weight of the swollen matrices after time t; Mt is the amount of drug released at time t; M∞ is the maximum amount of drug released and W_{drug} is the initial weight of drug, as previously described [23].

Both the matrix erosion data and the swelling capacity of the tablets were expressed as mean ± SD of three determinations.

$$SW\ (\%) = \frac{Wi - Wo}{Wo} \times 100 \quad (4)$$

$$E\ (\%) = \frac{Wo - Wf - Wdrug\ \left(1 - \frac{Mt}{M\infty}\right)}{Wo} \times 100 \quad (5)$$

At the same time intervals, morphological studies of the tablets were carried out following the procedure described elsewhere [24].

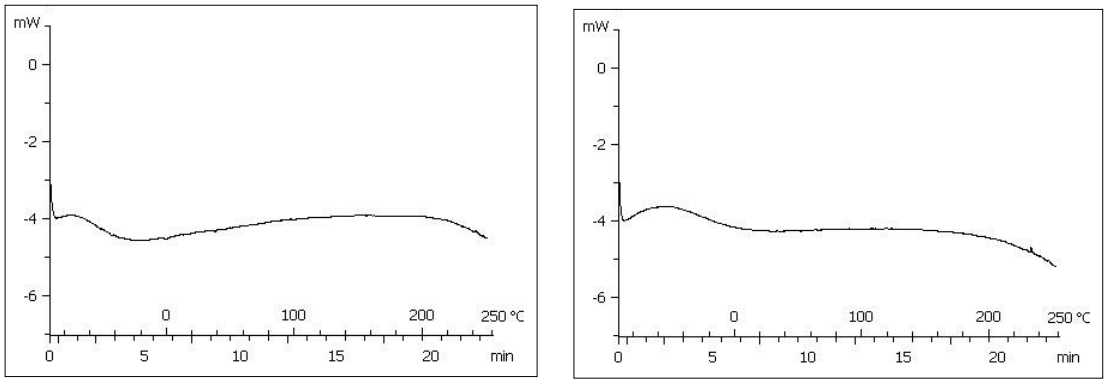
These studies are useful to determine the changes that occur in the matrix tablets during dissolution assays. For these experiments the tablets of batches F3 and F4 were withdrawn from the dissolution vessels after 1, 4 and 8 h. The tablets were blotted to remove excess of medium and sliced in half. Images of the tablets were taken using a camera NIKON COOLPIX S9100 (Nikon España, Barcelona, Spain), and subsequently analysed with IMAGE PRO PLUS 6.0 software.

5.3. *RESULTS*

5.3.1. Characterization of the Polymer

The yield obtained in the synthesis of the polymer was high for both crosslinking degrees, but higher for PAMgA 40 (85.0%) than for PAMgA 5 (71.2%). No significant differences in the appearance of the polymers were observed, obtaining, in both cases, an off-white powder after freeze-drying.

DSC curves of both PAMgA 5 and PAMgA 40 are shown in Figure 5.1. Both polymers were double scanned with temperatures between −90 and 250 °C. The first heating showed a wide endothermic peak around 100–120 °C, which disappeared in the second heating, so this peak corresponds to the loss of moisture present in the polymer. Glass transition or melting events were not identified in this temperature range.



(**a**) (**b**)

Figure 5.1. Second cycle DSC thermogram of (**a**) PAMgA 5 and (**b**) PAMgA 40.

FT-IR spectra of both polymers, PAMgA 5 and PAMgA 40, were recorded using KBr pellet method (Figure 5.2). The broad peak in the region 3550–2500 cm^{-1} is attributed to the –OH stretching vibrations of the carboxylate groups. The C=O groups of the carboxylate groups are also associated with two specific bands in the range 1610–1400 cm^{-1}. These bands appear as an asymmetric stretching vibration between 1610–1550

cm^{-1} and a symmetric stretching vibration peak of the –COO– in the 1450–1400 cm^{-1} range.

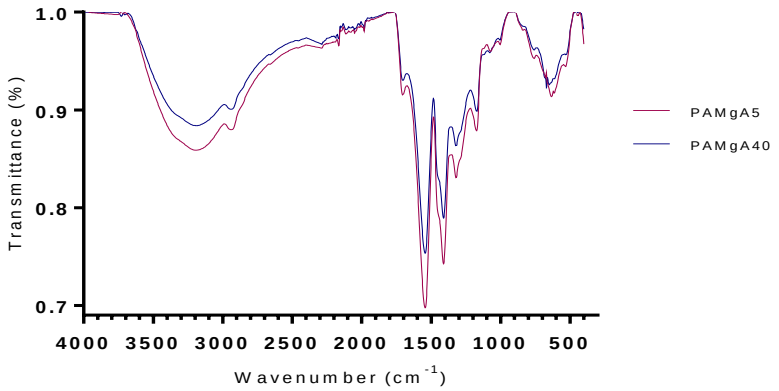


Figure 5.2. FT-IR spectrum of PAMgA 5 and PAMgA 40.

5.3.2. In Vivo Oral Biocompatibility Study

The acute toxicity of both PAMgA hydrogels was evaluated in mice after oral administration of different doses by using pellets that were made from food mixed with each hydrogel. No signs of toxicity were observed at all tested doses, and even at the highest dose range studied (10 g/kg) both hydrogels were well tolerated (Table 4). All animals survived at the end of the experiment without any significant symptomatology. However, at the highest dose tested, some of the animals experienced diarrhoea after 24 h of administration. There were no changes in body weight and food consumption in any of the animals, and the visual analysis of the liver, spleen, lungs, kidney, stomach and intestine of the animals after euthanasia did not reveal any changes in their morphology.

Table 5.4. Clinical response after 24 h of oral administration of both PAMgA 5 and PAMgA 40 at doses between 1–10 g/kg.

Clinical Score	PAMgA 5 (g/Kg)			PAMgA 40 (g/Kg)		
Dose range	1 ± 0.2	5 ± 1	10 ± 2	1 ± 0.2	5 ± 1	10 ± 2
Restlessness	0	0	0	0	0	0
Squeaks	0	0	0	0	0	0
Mobility	0	0	0	0	0	0
Vomiting	0	0	0	0	0	0
Diarrhoea	0	0	1	0	0	1
Death	0	0	0	0	0	0

5.3.3. Characterization of the Tablets

Table 5.5 shows the characteristics of the tablets prepared from PAMgA 5 and PAMgA 40 polymers. The drug was incorporated in a 50% w/w to the matrix tablet, giving rise to oval tablets with suitable dimensions for oral administration and an approximate weight of 1 g. The differences in hardness among formulations were due to the different way of incorporation of metformin HCl, since in formulations F3 and F4 the drug was incorporated as granules with NaCMC as binder, which facilitated the direct compression of the blend and improved the mechanical resistance of the tablets. The direct mix of the drug powder and the polymer was difficult to compress and tablets did not take hardness and tended to capping.

Table 5.5. Characterization of the different batches of PAMgA matrix tablets.

Tablet Characterictics	F1	F2	F3	F4
Weight (mg)	985.0 ± 5.4	989.0 ± 3.6	984.6 ± 6.6	988.5 ± 4.5
Thickness (mm)	6.46 ± 0.01	6.45 ± 0.01	6.46 ± 0.01	6.44 ± 0.01
Diameter (mm)	7.88 ± 0.01	7.89 ± 0.01	7.88 ± 0.01	7.87 ± 0.01
Length (mm)	14.05 ± 0.01	14.03 ± 0.01	14.04 ± 0.01	14.05 ± 0.01
Hardness (N)	64.5 ± 2.0	65.1 ± 1.5	134.7 ± 1.9	136.2 ± 2.3

5.3.4. In Vitro Drug Release

The accumulative percentage of metformin released versus time from the four batches of matrix tablets prepared is shown in Figure 3. In the dissolution assay of the free drug, the dose was immediately dissolved (within the first 15 min) at both pHs studied (Figure 3-small graphics).

On the contrary, when formulated into PAMgA matrix tablets, metformin release was prolonged for at least 6–8 h. On the one hand, in FaSSGF not less than 85% of the drug was released from both F3 and F4 in 6 h and for F1 and F2 this time increased up to 8 and 9 h respectively. On the other hand, in FaSSIF, formulations F3 and F4 released 85% of metformin HCl at 7 h, whereas F1 and F2 reached this percentage after more than 10 h.

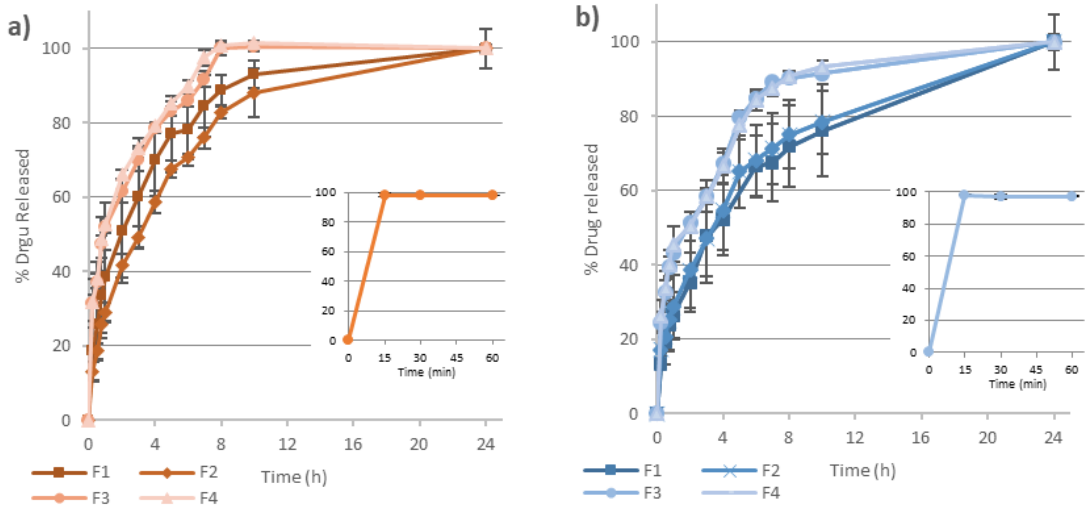


Figure 5.3. Accumulative percentage of dissolved metformin HCl for formulations F1-F4 matrix tablets (large graphics) and drug powder (small graphics) in (**a**) FaSSGF at pH 1.2 and (**b**) FaSSIF at pH 6.8 (n = 3).

To calculate the difference factor and the similarity factor, the number of data points was fixed (n = 5) for all formulations. To determine if the polymer crosslinking affects the drug release, F1–F2 and F3–F4 were compared, in both media of pH 1.2 and 6.8. Furthermore, to determine if the way in which metformin HCl is incorporated in the

matrix affects the drug release, formulations F1–F3 and F2–F4 were also compared. Table 6 shows the results obtained for all these comparisons.

In FaSSGF, F1–F2 presented f_1 and f_2-values of 17.2 and 51.0 respectively, which do not allow to determine in a clear way the similarity of both dissolution profiles. For F3–F4 comparison, f_1 and f_2-values of 2.8 and 81.4 were obtained indicating similarity between both dissolution profiles. When F1 and F3 formulations were compared, f_1 and f_2 values (15.8 and 49.1) are in the limit of the non-similarity; and when F2–F4 formulations were compared, the value of f_1 was clearly greater than 15 and the value f_2 smaller than 50, which indicates no similarity.

Table 5.6. Values of f_1 and f_2 obtained in the comparison of the 4 formulations of tablets (F1, F2, F3, F4) in both pH assayed. S: similar; NS: non-similar.

	FaSSGF				**FaSSIF**			
	F1–F2	**F3–F4**	**F1–F3**	**F2–F4**	**F1–F2**	**F3–F4**	**F1–F3**	**F2–F4**
f_1	17.2	2.8	15.8	32.2	4.2	0.4	39.8	42.5
f_2	51.0	81.3	49.1	33.3	80.5	92.7	26.8	23.8
	NS/S	S/S	NS/NS	NS/NS	S/S	S/S	NS/NS	NS/NS

In FaSSIF, results were clearer than those obtained in acid pH, with values of f_1 and f_2 for formulations F1–F2 of 4.2 and 80.5 respectively, and for F3–F4 of 0.4 and 92.7, which confirm the similarity of the compared release profiles. Conversely, both the comparison of F1–F3 (with f_1 and f_2-values of 39.8 and 26.8, respectively) and of F2–F4 (with f_1 and f_2-values of 42.5 and 23.8, respectively) evidenced the non-similarity between their metformin release profiles.

When metformin release data were fitted to Korsmeyer-Peppas equation, the correlation coefficient (r^2), release rate constant (k), and release exponent (n) shown in Table 7 were obtained. All the release profiles fitted well the Korsmeyer-Peppas model, with correlation coefficients (r^2) above 0.98 in all cases both in FaSSGF and FaSSIF. The value of the release constant, k, was higher for F3 and F4 formulations, especially in

FaSSGF, suggesting a faster drug release from these matrices. For F1 and F2 the diffusional exponent (n) was in the range of $0.45 < n < 0.89$, indicating that the release of the drug from the tablets was a combination of more than one mechanism, diffusion of the drug through the hydrated gel layer and matrix erosion. In the case of F3 and F4, the n-value was below 0.45, indicating that the release mechanism was mainly controlled by diffusion of the drug from the gel layer.

Table 5.7. Korsmeyer-Peppas model fitting of formulations F1–F4 of metformin HCl in FaSSGF and FaSSIF.

	FaSSGF				FaSSIF			
	Release Exponent (n)	**Release Rate Constant (k)**	**Correlation Coefficient (r^2)**	**Order Release**	**Release Exponent (n)**	**Release Rate Constant (k)**	**Correlation Coefficient (r^2)**	**Order Release**
F1	0.4917	37.273	0.9968	Anomalous transport	0.4924	26.564	0.9975	Anomalous transport
F2	0.5425	28.009	0.9973	Anomalous transport	0.4944	27.841	0.9968	Anomalous transport
F3	0.3772	51.404	0.9815	Fickian diffusion	0.3441	41.314	0.9906	Fickian diffusion
F4	0.3759	52.393	0.9825	Fickian diffusion	0.3117	42.276	0.9873	Fickian diffusion

5.3.5. Swelling and Erosion Behaviour

Figure 5.4 shows swelling and erosion data for both F3 and F4 tablet formulations in both pHs evaluated. The erosion percentage for formulations F3 and F4 was 9.9 ± 4.7% and 5.7 ± 1.9% respectively, in the first hour of the experiment in FaSSGF (Figure 5.4a). These percentages increased up to 70.4 ± 1.6% and 57.4 ± 4.6% at the end of the experiment (8 h). In FaSSIF, the erosion percentage was negligible in the first hour of the experiment for both F3 and F4 but at the end of the experiment the erosion of F3 and F4 matrix tablets reached 42.5 ± 0.9% and 44.2 ± 0.2%, respectively (Figure 5.4b).

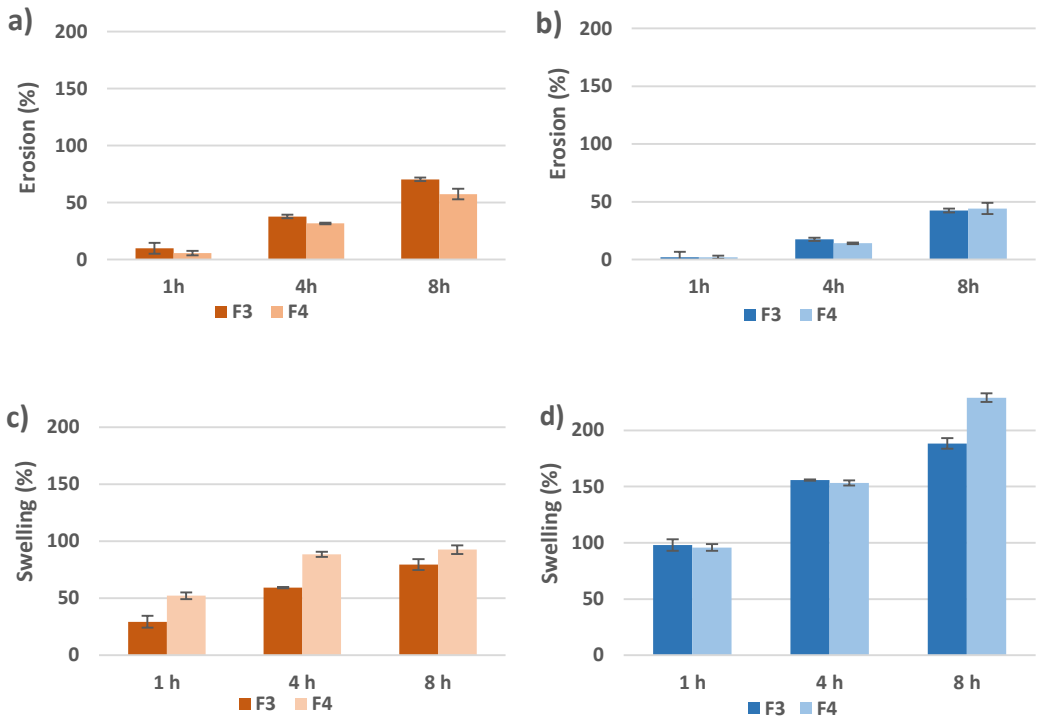


Figure 5.4. Accumulative erosion percentages for F3 and F4 in (**a**) FaSSGF and (**b**) FaSSIF and accumulative swelling percentages for F3 and F4 in (**c**) FaSSGF and (**d**) FaSSIF.

Regarding swelling, after 1 h in FaSSGF, the swelling percentage of F3 and F4 were 29.4 ± 5.2% and 52.2 ± 2.9% respectively, and after 8 h, these percentages increased up to 79.4 ± 4.7% and 92.6 ± 3.8%. These values were significantly lower than those obtained with the same formulations at pH 6.8: the swelling percentage of F3 and F4 matrix tablets was 97.9

± 2.9% and 95.8 ± 3.2% in the first hour, reaching a 188.0 ± 4.3% and 229.1 ± 0.8% swelling percentage after 8 h. The swelling process at this pH took place rapidly when the medium moistened the polymer matrix.

After 1 h in contact with FaSSIF, the dry core of the tablets was surrounded by a whitish layer of high viscosity gel. By increasing the contact time, the volume of the dry core decreased, and was transformed into gel, in such a way that after 8 h the dry core was negligible. Around the whitish layer of gel, a layer of transparent gel grows, being clearly distinguished in the photos after 8 h.

5.4. *DISCUSSION*

Acrylic acid-based hydrogels show good physical characteristics for the elaboration of matrix tablets for extended release of drugs. In the present study, we evaluated the potential of a new poly(magnesium acrylate) hydrogel, called PAMgA, as a new excipient for extended released tablets using metformin HCl as a model drug. Metformin is a small molecule (MW = 129.16) that is classified as highly water-soluble and very rapidly dissolving drug, with all the dose dissolved in less than 15 min at pH 1.2; 4.5 (data not shown) and 6.8 (Figure 3-small graphics) [25]. Both characteristics make especially difficult to achieve the extended release of this drug from hydrophilic matrices.

The synthesis of PAMgA polymer was carried out in two stages, elaboration of the monomer and subsequently the polymerization stage. Since hydrogel characteristics are related to their polymeric network, PAMgA with two crosslinking degrees was synthetized: PAMgA 5 and PAMgA 40. The yield of the reaction for PAMgA 5 and PAMgA 40 was high, although slightly higher in the case of PAMgA 40. This difference could be attributed to the distillation process, as in the case of PAMgA 5 is more likely to disentangle the acrylic chains because of its lower the crosslinking degree.

The FT-IR spectra obtained with both hydrogels overlap, as the same behaviour occurs. With regard to DSC analysis, PAMgA 5 and PAMgA 40 showed no differences in the

thermograms, so the crosslinking degree of the polymer is not a key factor in the thermal behaviour of the hydrogel. In a study on Carbopol® polymers, Gómez-Carracedo et al. also found that their thermal behaviour was independent of their cross-linking degree and molecular weight [26]. In this study all Carbopol® compacts showed a glass temperature between 130 and 140 °C. However, in our study, no thermal events were detected between −90 and 250 °C, which ensured that the polymer state is kept unaltered during tablet preparation and residence in the gastrointestinal tract following oral administration. Hetper et al. investigated the decomposition temperature of metal polyacrylates with other temperature range (25–600 °C). These authors indicated that the maximum decomposition temperature for magnesium polyacrylates was 460 °C and the polymer decomposed into magnesium oxide [27].

In a previous study [16], in vitro and in vivo toxicity of the polymer was evaluated. Cytotoxicity of the hydrogels was studied by a direct contact method and two indirect techniques (MTT colorimetric assay and flow cytrometry analysis). Cytotoxicity was tested on mouse embryonic fibroblast NIH-3T3 cells. In no case was cell damage evidenced. Toxicity in vivo was tested in mice by different routes (namely, intraperitoneal, subcutaneous and oral) at a dose ranging from 10 to 500 mg/kg. In no case was any physiological neither histological alteration evidenced, nor did the animals develop any symptoms. However, high doses by the oral route were not evaluated. In the current study, the oral biocompatibility studies in mice revealed that with doses of up to 10g/kg no signs of toxicity were observed, changes in body weight and food consumption were not detected and symptoms as restlessness, squeaks, lack or hypermobility or vomiting were not reported. Diarrhoea was observed but only in some animals belonging to the highest dose group. The diarrhoea could be attributed to an osmotic effect of the polymer, present in high amounts in the faeces, rather than to a chemical irritation of the intestine caused by the polymer. The morphological analysis of the liver, spleen, lungs and kidneys after animal euthanasia did not show any alteration, even stomach and intestine showed an intact mucosa with a normal organ appearance. Sarkar et al. evaluated the toxicity of a poly(acrylic acid) grafted gellan gum (PAAc-g-GG) mucoadhesive polymer [13]. They reported that when LD50 is greater than 2 g/kg, the substance is considered as nontoxic. In our study, the maximum dose administrated was 10g/kg of the polymer, clearly higher to that

administered by Sarkar et al., and none of the animals died during the study. All these results suggest that PAMgA could be classified as a nontoxic excipient for oral dosage forms, and the maximum oral daily intake of PAMgA polymer could be at least 10 g/kg regardless of the crosslinking degree of the polymer.

Matrix tablets of PAMgA 5 and PAMgA 40 containing a dose of 500mg of metformin HCl were prepared. Due to the high relative percentage of metformin within the formulation (a consequence of its high therapeutic dose), tables obtained by direct compression of the drug-polymer blend (F1 and F2) showed low mechanical resistance and capping tendency. Therefore, metformin was previously granulated with NaCMC as binder to obtain F3 and F4 matrix tablets, which facilitated the compression of the blend with the polymer and improved the mechanical resistance of the tablets.

Extended release of metformin was achieved from the four formulations of matrix tablets prepared, with 85% of the dose released between 6 and more than 10 h, depending on the formulation and the release media.

The drug release was seemingly influenced by the pH of the media, being slightly faster in FaSSGF than in FaSSIF (Figure 3). Biorelevant media were used in the in vitro drug release assays to better simulate physiological conditions. For the FaSSIF, the presence of bile salts (sodium taurocholate) and phospholipids (lecithin) facilitates the wetting of some drugs and excipients, making easier the penetration of the dissolution medium through the pores of the matrix structure. This effect could accelerate drug dissolution, especially in the case of poorly water-soluble drugs, where their solubility could also increase by micelles formation [28]. However, in the case of a highly water-soluble drug, as it is the case of metformin, this effect is negligible, and the different drug release rate could be attributed to the different behaviour of the polymer in both release media. Hydrogel matrices in contact with aqueous media gradually imbibe water in their structure and swell, forming an increasingly high viscosity layer of gel whereby the drug diffuses. Later, at the interface between the gel layer and the surrounding medium, the polymer chains gradually disentangle from the interface by erosion, thus enhancing drug release. The swelling and erosion studies were carried out in 250 mL of the two biorrelevant media, FaSSGF (pH 1.2) and FaSSIF (pH 6.8). These

processes are pH-dependent in the case of crosslinked acrylic acid polymers as Carbopol®, where at low pH the gel layer has lower viscosity than at pH > 5, facilitating matrix erosion [29]. As shown in Figure 4, in the case of PAMgA, matrix erosion is slightly more rapid at pH 1.2 than at pH 6.8, whereas in FaSSIF polymer swelling is more intensive than in FaSSGF. When the polymer becomes in contact with FaSSGF, the COOH groups are not ionized, and a lower swelling ratio is observed. The low viscosity of the gel layer formed favoured the erosion of the matrix. Swelling of the polymer occurs at a pH above the pKa of the carboxyl group of the hydrogel [30].

At pH 6.8 the COOH groups ionized into negatively charge species so this resulted in electrostatic forces that forced the hydrogel to expand, and therefore to increase the swelling ratio [31]. A high viscosity gel layer was formed, that delayed matrix erosion. In the case of F3 and F4 formulations, the presence of NaCMC as part of the gel layer could also contribute to their swelling capacity.

The erosion and swelling capacity of the PAMgA tablets were related to the metformin release rate, being slower at pH 6,8 than in acidic medium. On the one hand, matrix erosion conducted to drug release, in such a way that more than 85% of the drug was released from all the formulations after 8 h at pH 1.2; and on the other hand, the drug needed to go through the gel layer to be released from the tablet and this path was thicker and more viscous in FaSSIF, which lead to lower percentages of metformin released after 8 h at pH 6.8. Although the different behaviour of the matrix according to the release medium could account for the slightly faster release of metformin in FaSSGF than in FaSSIF, the difference is not greater due to the high solubility of the drug in both aqueous mediums.

Difference and similarity factors are a statistical tool widely used to measure the similarity of in vitro drug release profiles. When drug release from matrix tablets prepared with metformin incorporated in different way was compared, significant differences were detected in the release rate, being slightly slower in formulations wherein the metformin was incorporated as a powder (F1 and F2) than when the drug was previously granulated with NaCMC (F3 and F4). In order to determine the main mechanism responsible for drug release from the matrix tablets, dissolution data were fitted to Korsmeyer–Peppas

equation. There are several possible mechanisms involved in drug release from the polymeric matrix: a) drug diffusion through the gel layer of the matrix, b) erosion of the polymer and c) a combination of both mechanisms: diffusion of the drug and erosion of the hydrogel [20]. The values of the diffusional exponent (n) for F1 and F2 formulations (Table 7) indicate that the mechanism of metformin release was a combination of diffusion of the drug through the hydrated gel layer and matrix erosion (anomalous transport). The drug was entrapped within the polymeric network in the dry tablets, and as the contact time with the release medium increased, the polymer matrix progressively imbibed water and began to swell, forming the gel layer. As reported by Ghori and Conway, highly soluble drugs like metformin, are released by diffusing though the gel layer matrices and this mechanism is considered the principal way of release [32]. However, F1 and F2 tablets, with a 50% w/w of drug directly mixed with the polymer, showed lower hardness and tendency to capping, since metformin HCl is difficult to compress directly. This lower hardness could contribute to drug release by matrix erosion.

On the contrary, the values of diffusional exponent (n) for F3 and F4 formulations indicate that the drug release was mainly controlled by its diffusion through the gel layer (Fickian diffusion). Formulations F3 and F4 also include NaCMC to granulate the metformin HCl and it contributes to stabilize the gel layer. The presence of NaCMC increased the robustness and resistance of the hydrated gel layer of the matrices [33].

Rubio-Retama et al. postulated that the presence of crosslinking molecules in the PAMgA polymer introduced structural inhomogeneities that could modify the macroscopic properties of the polymer and its application [15]. However, when drug release from matrix tablets prepared with PAMgA of different degree of crosslinking were compared (F1 vs F2 and F3 vs F4), no significant differences were detected in FaSSGF neither, more clearly, in FaSSIF (Table 6). When swelling behaviour was compared only significant differences between F3 and F4 at all the tested times were detected in the experiment carried out in FaSSGF, showing a greater swelling capacity the F4 tablets (Figure 4). However, in FaSSIF the greater swelling capacity of F4 tables was only observed after 10 h in contact with the release medium. The increase in swelling ratio observed for F4 tablets, prepared with PAMgA 40, may be due to the increase of hydrophilic hydroxyl groups allowing water

absorption into the hydrogel, in such a way that this effect of the crosslinking degree of the polymer on its swelling capacity results more evident for low capacity of swelling (acid pH). These differences in swelling behaviour related to crosslinking degree of the matrices did not affect the rate of metformin release, probably due to its high water-solubility.

In the US Pharmacopoeia, 10 dissolution tests for Metformin Hydrochloride Extended-Release Tablets are described, where apparatus II at 100rpm is used. In all these tests dissolution medium pH 6.8 is used. Formulation 3 meets tolerance limits established for 500 mg tablets in three of these tests (test 10, test 11 and test 14), that are 25–45% dissolved after 1 h; 50–70% dissolved after 3 h and not less than 85% dissolved after 10 h.

In Figure 5 metformin release from F3 tablets is represented together with photographs of a longitudinal cut of tablets along with the dissolution test. When the matrix tablets were moistened with the dissolution medium, they begun to swell and form the gel layer. The water penetrated the polymer chains from the outer side of the matrix until they reached the inner zone. Because of the relaxation of the polymer chains that leads to the formation of the gel layer, the tablets increased in size. The more water imbibed, the thicker the gel layer. Erosion process was a consequence of the disentanglement of the polymer chain in the external surface of the swelling tablets and led to a reduction in tablet size. The rate of drug release from hydrogel matrices is primarily governed by the rate and extent of polymer swelling, the dissolution of the drug in the absorbed water, the diffusion of the drug through the swelled polymer network and, finally, the erosion/dissolution rate of the swelled polymer chains. All these processes lead to the formation of three different fronts in a matrix structure: the swelling front, the diffusion front and the erosion front [34]. In the photos of Figure 5 these fronts can be differentiated:

- The swelling front (polymer glassy-rubbery region transition): this front was formed between the dry core of the tablet and the gel layer (also known as the rubbery region). This is clearly observed after 1h in contact with the release medium; after 4 h it has moved inwards and after 8h it is not possible to see any glassy inner core in any tablet.

- The diffusion front (solid drug-drug solution boundary): between the swelling and the erosion front. This front separates the zone where the drug is undissolved from the zone the drug has already dissolved in the gel layer and moves inwards. It is near the swelling front in matrices containing highly water-soluble drugs, so is thin and difficult to see [35]. This front cannot be seen in any photo due to the high water-solubility and very rapid dissolution of metformin HCl.

- The erosion front (swollen matrix-solvent): appears between the gel layer and the dissolution medium. This front disappears along the process of matrix erosion. This front is clearly visible in all the photos. After 8h, a new front is clearly observed, delimiting high viscosity-low viscosity gel layers. At this point, the polymer was yet able to maintain the original shape of the tables after swelling.

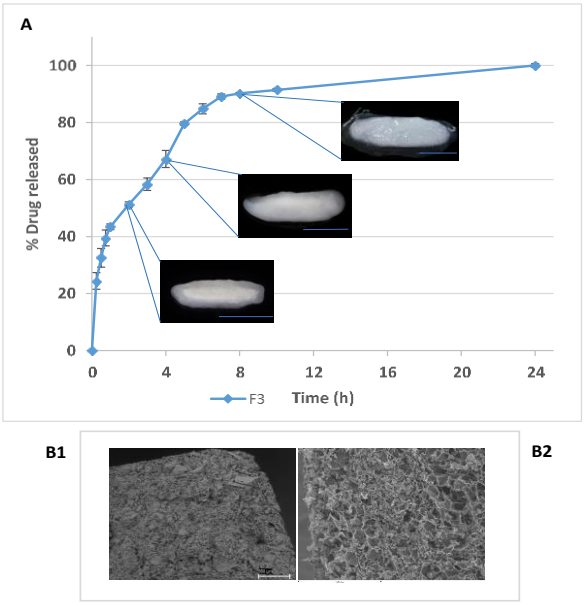


Figure 5.5. (**A**) F3 release profile and photograph of the tablets after 1, 4 and 8 h in FaSSIF (scale bar: 1 cm). (**B**) SEM images on tablet surface ((**B1)**: dry tablets; (**B2)**: tablets moistened following 8 h incubation with phosphate buffer and freeze-dried subsequently).

5.5. *CONCLUSIONS*

PAMgA can be classified as a nontoxic excipient for solid oral dosage forms, with maximum oral daily intake of at least 10 g/kg regardless of the crosslinking degree of the polymer. This new hydrogel effectively controls the release of small and highly hydrophilic molecules when formulated in matrix tablets for oral administration, in such a way that metformin extended-release tables that meet USP specifications have been obtained. The rate of metformin release from PAMgA matrices is mainly controlled by its diffusion through the gel layer (Fickian diffusion). The swelling capacity and the erosion of the PAMgA tablets influence the metformin release rate, that is slower at pH 6.8, where polymer swelling is more intensive, than in gastric medium, where matrix erosion is slightly more rapid. The crosslinking degree of the polymer significantly influences its swelling capacity in acid pH, where swelling is moderate, but not in intestinal fluid, where swelling is more intensive.

Author Contributions: Conceptualization, A.F.-C. and A.-I.T.-S.; Data curation, R.S.-H., A.F.-C. and A.-I.T.-S.; Formal analysis, R.S.-H. and J.A.-B.; Funding acquisition, A.-I.T.-S.; Investigation, R.S.-H. and K.S.; Methodology, A.F.-C., J.R.-R., E.L.-C. and A.-I.T.-S.; Writing – original draft, R.S.-H. and A.F.-C.; Writing – review & editing, J.A.-B. and A.-I.T.-S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by Complutense Research Fund (Ref. FEI16/83) and by the Complutense University UCM research group “Formulation and bioavailability of new drug products” (Ref. UCM-910939

Conflicts of interest: The authors declare no conflict of interest.

5.6. *REFERENCES*

1. Wisher, D. Martindale: The Complete Drug Reference. *J. Med. Libr. Assoc.* **2012**, *100*, 75–76, doi:10.3163/1536-5050.100.1.018.
2. Graham, G.G.; Punt, J.; Arora, M.; Day, R.O.; Doogue, M.P.; Duong, J.K.; Furlong, T.J.; Greenfield, J.R.; Greenup, L.C.; Kirkpatrick, C.M.; et al. Clinical Pharmacokinetics of Metformin. *Clin. Pharmacokinet.* **2011**, *50*, 81–98, doi:10.2165/11534750-000000000-00000.
3. Proctor, W.R.; Bourdet, D.L.; Thakker, D.R. Mechanisms underlying saturable intestinal absorption of metformin. *Drug Metab. Dispos.* **2008**, *36*, 1650–1658, doi:10.1124/dmd.107.020180.
4. Derosa, G.; D'Angelo, A.; Romano, D.; Maffioli, P. Effects of metformin extended release compared to immediate release formula on glycemic control and glycemic variability in patients with type 2 diabetes. *Drug Des. Dev. Ther.* **2017**, *11*, 1481–1488, doi:10.2147/dddt.S131670.
5. Otegui, J.; Fernandez, E.; Rubio-Retama, J.; Lopez-Cabarcos, E.; Mijangos, C.; Lopez, D. Swelling and Viscoelastic Properties of New Magnesium Acrylate Hydrogels. *Polym. Eng. Sci.* **2009**, *49*, 964–969, doi:10.1002/pen.21293.
6. Conti, S.; Maggi, L.; Segale, L.; Machiste, E.O.; Conte, U.; Grenier, P.; Vergnault, G. Matrices containing NaCMC and HPMC 2. Swelling and release mechanism study. *Int. J. Pharm.* **2007**, *333*, 143–151, doi:10.1016/j.ijpharm.2006.11.067.
7. Capanema, N.S.V.; Carvalho, I.C.; Mansur, A.A.P.; Carvalho, S.M.; Lage, A.P.; Mansur, H.S. Hybrid Hydrogel Composed of Carboxymethylcellulose-Silver Nanoparticles-Doxorubicin for Anticancer and Antibacterial Therapies against Melanoma Skin Cancer Cells. *ACS Appl. Nano Mater.* **2019**, *2*, 7393–7408, doi:10.1021/acsanm.9b01924.
8. Ozkahraman, B.; Emeriewen, K.; Saleh, G.M.; Thanh, N.T.K. Engineering hydrogel nanoparticles to enhance transdermal local anaesthetic delivery in human eyelid skin. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 3926–3930, doi:10.1039/C9RA06712D.
9. Nokhodchi, A.; Raja, S.; Patel, P.; Asare-Addo, K. The role of oral controlled release matrix tablets in drug delivery systems. *BioImpacts* **2012**, *2*, 175–187, doi:10.5681/bi.2012.027.

10. Nakagawa, M.; Kawai, T. Tuning Gel-Sol Transition Behavior of a Hydrogel Based on 12-Hydroxystearic Acid and a Long-Chain Amidoamine Derivative. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2019**, *92*, 435–440, doi:10.1246/bcsj.20180337.
11. Lisuzzo, L.; Cavallaro, G.; Parisi, F.; Milioto, S.; Fakhrullin, R.; Lazzara, G. Core/Shell Gel Beads with Embedded Halloysite Nanotubes for Controlled Drug Release. *Coatings* **2019**, *9*, 8, doi:10.3390/coatings9020070.
12. Sharpe, L.A.; Daily, A.M.; Horava, S.D.; Peppas, N.A. Therapeutic applications of hydrogels in oral drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2014**, *11*, 901–915, doi:10.1517/17425247.2014.902047.
13. Sarkar, D.; Nandi, G.; Changder, A.; Hudati, P.; Sarkar, S.; Ghosh, L.K. Sustained release gastroretentive tablet of metformin hydrochloride based on poly (acrylic acid)-grafted-gellan. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *96*, 137–148, doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.12.022.
14. Bromberg, L.; Temchenko, M.; Alakhov, V.; Hatton, T.A. Bioadhesive properties and rheology of polyether-modified poly(acrylic acid) hydrogels. *Int. J. Pharm.* **2004**, *282*, 45–60, doi:10.1016/j.ijpharm.2004.05.030.
15. Rubio-Retama, J.; Tamimi, F.M.; Heinrich, M.; Lopez-Cabarcos, E. Synthesis and characterization of poly(magnesium acrylate) microgels. *Langmuir* **2007**, *23*, 8538–8543, doi:10.1021/la700696h.
16. Cheddadi, M.; Lopez-Cabarcos, E.; Slowing, K.; Barcia, E.; Fernandez-Carballido, A. Cytotoxicity and biocompatibility evaluation of a poly(magnesium acrylate) hydrogel synthesized for drug delivery. *Int. J. Pharm.* **2011**, *413*, 126–133, doi:10.1016/j.ijpharm.2011.04.042.
17. Jantratid, E.; Janssen, N.; Reppas, C.; Dressman, J.B. Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: An update. *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 1663–1676, doi:10.1007/s11095-008-9569-4.
18. Vertzoni, M.; Dressman, J.; Butler, J.; Hempenstall, J.; Reppas, C. Simulation of fasting gastric conditions and its importance for the in vivo dissolution of lipophilic compounds. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2005**, *60*, 413–417, doi:10.1016/j.ejpb.2005.03.002.
19. Peppas, N.A.; Sahlin, J.J. A simple equation for the description of solute release. 3. Coupling of diffusion and relaxation. *Int. J. Pharm.* **1989**, *57*, 169–172, doi:10.1016/0378-5173(89)90306-2.

20. Cascone, S. Modeling and comparison of release profiles: Effect of the dissolution method. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, *106*, 352–361, doi:10.1016/j.ejps.2017.06.021.
21. Mason, L.M.; Chessa, S.; Huatan, H.; Storey, D.E.; Gupta, P.; Burley, J.; Melia, C.D. Use of the Dynamic Gastric Model as a tool for investigating fed and fasted sensitivities of low polymer content hydrophilic matrix formulations. *Int. J. Pharm.* **2016**, *510*, 210–220, doi:10.1016/j.ijpharm.2016.06.034.
22. Li, L.; Wang, L.L.; Li, J.F.; Jiang, S.; Wang, Y.T.; Zhang, X.; Ding, J.J.; Yu, T.Y.; Mao, S.R. Insights into the mechanisms of chitosan-anionic polymers-based matrix tablets for extended drug release. *Int. J. Pharm.* **2014**, *476*, 253–265, doi:10.1016/j.ijpharm.2014.09.057.
23. Ghosh, S.; Pal, S. Modified tamarind kernel polysaccharide: A novel matrix for control release of aspirin. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *58*, 296–300, doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.04.002.
24. Conti, S.; Maggi, L.; Segale, L.; Machiste, E.O.; Conte, U.; Grenier, P.; Vergnault, G. Matrices containing NaCMC and HPMC 1. Dissolution performance characterization. *Int. J. Pharm.* **2007**, *333*, 136–142, doi:10.1016/j.ijpharm.2006.11.059.
25. ICH: International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use. In Proceedings of the ICH Q6A Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria For New Drug Substances And New Drug Products: Chemical Substances, CPMP/ICH/367/96 , May 2000, London, UK.
26. Gomez-Carracedo, A.; Alvarez-Lorenzo, C.; Gomez-Amoza, J.L.; Concheiro, A. Glass transitions and viscoelastic properties of Carbopol (R) and Noveon (R) compacts. *Int. J. Pharm.* **2004**, *274*, 233–243, doi:10.1016/j.ijpharm.2004.01.023.
27. Hetper, J.; Balcerowiak, W.; Beres, J. Thermal-decomposition of metal polyacrylates. *J. Therm. Anal.* **1981**, *20*, 345–350, doi:10.1007/bf01912883.
28. Klein, S. The Use of Biorelevant Dissolution Media to Forecast the In Vivo Performance of a Drug. *AAPS J.* **2010**, *12*, 397–406, doi:10.1208/s12248-010-9203.
29. Molecular Weight of Carbopol®* and Pemulen®* Polymers. Technical data sheet 222.. Lubrizol Advanced Materials, Inc.:Wickliffe, OH, USA, 2007.
30. Pillai, J.J.; Thulasidasan, A.K.T.; Anto, R.J.; Chithralekha, D.N.; Narayanan, A.; Kumar, G.S.V. Folic acid conjugated cross-linked acrylic polymer (FA-CLAP) hydrogel for site

specific delivery of hydrophobic drugs to cancer cells. *J. Nanobiotechnol.* **2014**, *12*, 9, doi:10.1186/1477-3155-12-25.

31. Lim, L.S.; Rosli, N.A.; Ahmad, I.; Lazim, A.M.; Amin, M. Synthesis and Swelling Behavior of pH-Sensitive Semi-IPN Superabsorbent Hydrogels Based on Poly(acrylic acid) Reinforced with Cellulose Nanocrystals. *Nanomaterials* **2017**, *7*, 13, doi:10.3390/nano7110399.
32. Ghori, M.U.; Conway, B.R. Hydrophilic Matrices for Oral Control Drug Delivery. *Am. J. Pharmacol. Sci.* **2015**, *3*, 103–109.
33. He, W.; Huang, S.J.; Zhou, C.Y.; Cao, L.; Yao, J.; Zhou, J.P.; Wang, G.J.; Yin, L.F. Bilayer Matrix Tablets for Prolonged Actions of Metformin Hydrochloride and Repaglinide. *AAPS PharmSciTech* **2015**, *16*, 344–353, doi:10.1208/s12249-014-0229-1.
34. Maderuelo, C.; Zarzuelo, A.; Lanao, J.M. Critical factors in the release of drugs from sustained release hydrophilic matrices. *J. Control. Release* **2011**, *154*, 2–19, doi:10.1016/j.jconrel.2011.04.002.
35. Colombo, P.; Bettini, R.; Santi, P.; Peppas, N.A. Swellable matrices for controlled drug delivery: Gel-layer behaviour, mechanisms and optimal performance. *Pharm. Sci. Technol. Today* **2000**, *3*, 198–204, doi:10.1016/S1461-5347(00)00269-8.

© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

6. DESARROLLO DE COMPRIMIDOS MATRICIALES DE BUDESONIDA

PUBLICACIÓN: *MATRIX TABLETS BASED ON A NOVEL POLY (MAGNESIUM ACRYLATE) HYDROGEL FOR THE TREATMENT OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASES*

Matrix tablets based on a novel poly (magnesium acrylate) hydrogel for the treatment of inflammatory bowel diseases

Rebeca Simancas Herbada [1], Ana Isabel Torres Suárez [1,2], Francisco J. Otero-Espinar[3,.4], Ana Isabel Fraguas Sanchez [5], Enrique Lopez-Cabarcos[6], Jorge Rubio-Retama[6], Ana Fernández-Carballido [1,3]

[1] Department of Pharmaceutics and Food Technology, Faculty of Pharmacy, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

[2] Institute of Industrial Pharmacy, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

[3] Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, University of Santiago de Compostela, Campus Vida s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain

[4] Institute of Industrial Pharmacy, University of Santiago de Compostela, Campus Vida s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain

[5] Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Helsinki, 00014, Finland

[6] Department of Chemistry of medicament, Faculty of Pharmacy, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

Abstract

The objective of this study is to formulate oral matrix tablets with a new poly (magnesium acrylate) hydrogel (PAMgA), for colonic release of budesonide, a poorly soluble drug used in inflammatory bowel disease such as ulcerative colitis and Crohn's disease. Budesonide tablets with two reticulation grade of PAMgA hydrogel (5 and 40) were elaborated and characterized in terms of drug release using biorrelevant gastric and intestinal media. For bioadhesion ex vivo assays goat tanned leather and porcine gastric and proximal duodenum mucosa were used as model substrates. Water uptake and erosion were also investigated and related with polymer porosity characteristics. The local irritant effect of PAMgA hydrogel was also evaluated by Hen's egg chorioallantoic membrane (HET-CAM) in vitro assay.

PAMgA was shown as a non-irritating hydrogel suitable for remaining in contact with the digestive mucosa for long periods of time. PAMgA 5 tablets presented higher bioadhesive properties than PAMgA 40 tablets, being the bioadhesion less intense in acid medium than in intestinal medium. Water uptake and erosion of PAMgA tablets was influence by the reticulation grade of the polymer and the biorrelevant media assayed, being water uptake higher for PAMgA 40 tablets in intestinal fluid, whereas PAMgA 5 showed more intense erosion in this biorrelevant media. Budesonide was released slowly from the PAMgA tablets, both in gastric and intestinal environment, following case II transport kinetics (relaxation controlled delivery), with a lag time of around 1 hour in both biorelevant media and regardless of the polymer used. When the dissolution medium was changed sequentially throughout the trial, 75% of the budesonide dose was released in a sustained manner between 4 and 20 hours of testing from PAMgA tablets containing 2% of sodium lauryl sulphate (SLS).

In conclusion, budesonide tablets elaborated from PAMgA 40, lactose and SLS 2% could be a good formulation for the treatment of inflammatory bowel diseases.

KEY WORDS: Bioadhesion; Budesonide; HET-CAM; Hydrogel; Inflammatory bowel diseases; Matrix tablets; Poly (magnesium acrylate).

6.1. *INTRODUCTION*

The term inflammatory bowel disease is used to refer to a series of chronic inflammatory processes of autoimmune origin that predominantly affect the intestine. It groups several diseases, but the most frequent are Crohn's disease and ulcerative colitis. Although both are intestinal inflammatory processes, in ulcerative colitis the colon is affected while in Crohn's disease there is involvement of the small intestine (mainly the distal ileum). Corticosteroids are used for the treatment of moderate and severe flare-ups but, in general, they are not recommended as maintenance therapy due to the important systemic side effects that occur due to their oral absorption.

However, budesonide, a potent second-generation glucocorticosteroid, presents an extensive first pass hepatic metabolism, that significantly reduces its systemic toxicity, making it a good candidate for treating inflammatory bowel diseases; although its high absorption in the first portions of the small intestine limits its access to inflamed areas of the distal small intestine and the colon (no more than 30% of the dose) and, therefore, its efficacy in the treatment, mainly, of ulcerative colitis. Thus, compared to other glucocorticoids, budesonide has good local anti-inflammatory and less systemic action, reducing considerably adverse effects (Yan et al., 2019). For this, it is considered by The European Crohn´s and Colitis Organisation (ECCO) as first line treatment for mild to moderate active ileo-colonic Crohn´s disease, at doses from 3 to 9 mg once a day (Gareb et al., 2019).

The development of modified delivery systems for budesonide oral administration looking for a selective and sustained drug release at distal intestine and colon level are a good approach to increase its efficacy in the treatment of inflammatory bowel diseases (Gareb et al., 2016).

Hydrogels are three dimensional hydrophilic polymer networks that show high capacity to retain in their structure large amounts of water or biological fluids, introducing an elastic modulus and swelling, maintaining the shape (Peppas et al., 2000). Hydrogels are

used as excipients for sustained released matrix tablets for oral administration, mainly of hydrophilic drugs, where drug release is controlled by hydrogel swelling and drug diffusion through the gel layer (Li and Mooney, 2016; Vasile et al., 2020). As for hydrophobic drugs, such as budesonide, one of the main limitations of hydrogels in the development of matrix tablets is its low loading and drug release capacity, due to the high hydrophilicity of the three-dimensional structure (Knoos et al., 2015; McKenzie et al., 2015). For these drugs, the erosion is the main mechanism for drug release from the hydrogel matrix.

Poly (acrylic acid) (pAA) polymer is known for its pH responsible behaviour as it is composed of polymeric backbones with ionic groups. These carboxylic groups undergo the transition to increase volume of the hydrogel in response to pH of the media. At pH smaller than pKa of pAA (pKa ~ 4.5) , carboxylic groups are protonated and the hydrogel is in narrowed state, while at pH higher than pKa carboxylic groups are dissociated, and the polymer is swollen (Mackiewicz et al., 2019). Moreover, the ability of pAA to adhere, for a long time, to biological tissues promoting bioadhesion, make pAA and its derivate good excipients for sustained release of widely pharmaceutical forms. Finally, as their surface tension in biological fluids is low these hydrogels show good biocompatibility to biological tissues (Alghamdi et al., 2018; Chuah et al., 2018; Kutyła et al., 2013).

Considering the requirements of good compressibility, mechanical strength, sensitivity to pH and drug released control, we have synthesized a poly (magnesium acrylate) hydrogel, PAMgA, derived from pAA, for its used as novel excipient for oral sustained release pharmaceutical forms. PAMgA polymer has been characterised in previous works, showing very low oral toxicity, even at high doses, and an excellent capacity to control the release of highly hydrophilic drugs when it is used as excipient of matrix tablets (Cheddadi et al., 2011; Simancas-Herbada et al., 2020).

The main objective of this work is to determine the potential of PAMgA hydrogel as excipient for the elaboration of matrix tablets for the treatment of bowel inflammatory diseases, using budesonide, a highly lipophilic molecule, as drug. These tablets should release the drug mainly in distal intestine and colon, in a sustained manner. Budesonide tablets with two reticulation grade of PAMgA hydrogel were elaborated and characterized

in terms of drug release using biorelevant gastric and intestinal media. Bioadhesion assays were done using goat tanned leather and porcine gastric and proximal duodenum mucosa as model substrates. Water uptake and erosion were also investigated and related with polymer porosity characteristics. The local irritant effect of PAMgA hydrogel was also evaluated by Hen's egg chorioallantoic membrane (HET-CAM) in vitro assay.

6.2. *MATERIALS AND METHODS*

6.2.1. Materials

Budesonide was purchase from MP Biomedicals (Illkirch, France). Sodium taurocholate hydrate, acrylic acid, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), ammonium persulfate (PSA), magnesium hydroxide and pepsin from porcine gastric mucosa were provided from Sigma-Aldrich Spain (Madrid, Spain). Lactose, Sodium Lauryl Sulphate (SLS), Lecithin soy refined from MP Biomedicals (Illkirch, France), Sodium phosphate monobasic and Glacial acetic acid from Acros Organics (Barcelona, Spain). All other solvents and reagents (analytical grade) were purchased from Panreac (Barcelona, Spain) and used as supplied.

6.2.2. Elaboration of matrix tablets

Two different reticulation grades of the hydrogel, PAMgA 5 (PSA 5mM) and PAMgA 40 (PSA 40 mM) were used to prepare matrix tablets. Synthesis of the polymer was performed as previously reported following free radical polymerization method (Simancas-herbada et al., 2020).

Six types of tablets (F3-F8) were prepared by mixing the active ingredient, budesonide at a dose of 9mg, the pulverized polymer, lactose (20%) and different proportions of sodium lauryl sulphate (SLS) according to the composition described in table 6.1. Tablets were obtained by direct compression with a single-punch eccentric tableting

machine (J. Bonals 30B, Barcelona, Spain) using 9 mm flat punches. Two types of tablets (F1 and F2) were also elaborated only with polymer.

Table 6.1. Composition of tablets F1 – F8. (SLS: sodium lauryl sulphate)

	Formulation composition (mg)				
Formulation code	**Budesonide**	**PAMgA 5**	**PAMgA 40**	**Lactose**	**SLS**
F1 (blank)	-	200	-	-	-
F2 (blank)	-	-	200	-	-
F3	9	151	-	40	-
F4	9	-	151	40	-
F5	9	149	-	40	2
F6	9	-	149	40	2
F7	9	147	-	40	4
F8	9	-	147	40	4

Weight (mg); thickness (mm); diameter (mm); hardness (n) of matrix tablets were determined.

6.2.3. In vitro drug release assays

To determine the release profile of budesonide from tablets (F3 to F8) and select most suitable formulation, in vitro drug release tests were performed using different biorrelevant media: Simulated Fasted Gastric State (FaSSGF) pH 1.2, Fed State Simulated Intestinal Fluid (FeSSIF) pH 5.0 and Simulated Fasted State Conditions in the Small Intestine (FaSSIF) at pH 6.8. These media contain enzymes, bile salts and other electrolytes in order to simulate the complex composition of the gastrointestinal track (Klein, 2010; Vertzoni et al., 2005; Zoeller and Klein, 2007). The composition of the biorrelevant media FaSSGF, FeSSIF and FaSSIF is shown in table 6.2.

Table 6.2. Composition of the biorrelevant media used for dissolution tests.

Components	FaSSGF	FeSSIF	FaSSIF
Sodium taurocholate	80 µM	15 mM	3 mM
Lecithin	20 µM	3.75 mM	0.75 mM
Sodium dihydrogen phosphate	-	-	3.438 g
Pepsin	0.1 mg/mL	-	-
Sodium chloride	34.2 mM	11.874 g	6.186 g
Glacial acetic acid	-	8.65 g	-
Hydrogen chloride qs ad	pH 1.2	-	-
Sodium hydroxide qs ad	-	pH 5.0	pH 6.8
Deionized water	1 L	1L	1 L
Osmolarity (mOsmol/Kg)	120.7 ± 2.5	635 ± 10	~ 270
Surface tension (mN/m)	42.6	48	54
pH	1.2	5.0	6.8

Dissolution tests were carried out using USP dissolution apparatus type II (708-DS, Agilent Technologies, USA), regulated to 100 rpm and 37 ± 0.1 ºC. 1000 mL of dissolution medium were used. Sodium lauryl sulphate (SLS) at a concentration of 0.5% (w/v) was added to each dissolution medium in order to guarantee that all the test was carried out in sink condition.

Budesonide concentration in the release medium was determined by HPLC using an Agilent 1200 series Liquid Chromatography system (Agilent technologies, California, USA) equipped with a quaternary pump (G1311 Agilent 1200 series), a 1200 series Autosampler (G1329, Agilent 1200 series), a vacuum degasser, a thermostatted Column Compartment (G1316 Agilent 1200 series) and a DiodeArray Detector (G1315 Agilent 1200 series). The analytical column was a Mediterranea®-Sea C18 (150 × 4.6 mm i.d., 5 µm) (Teknokroma, Barcelona, Spain). The mobile phase consisted of 35:65 (v/v) buffer solution:acetonitrile. Buffer solution was prepared from sodium hydrogen phosphate dehydrate and ortho-phosphoric acid 85% adjusted to pH 3.2 ± 0.1 and was filtered through a Millipore® membrane filter (47mm diameter, 0.45 µm pore size, nylon) and degassed in an ultrasonic

bath before use. The chromatographic conditions were as follows: λ=254 nm; injection volume = 40 µL; flow rate = 1.4 mL/min; no column temperature control; run time = 4 minutes.

Aliquots of 5 mL were withdrawn from dissolution medium at predetermined time intervals (15, 30 and 45 minutes, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 24 hours) and filtered through 0.45 µm membrane filter (Millex-LCR, Millipore). The tests were performed in triplicate for each formulation and the results were indicated as mean ± standard deviation.

Two type of drug release assays were performed:

6.2.3.1. Standard drug release tests

The dissolution medium used in each test did not change during all the test. Formulations F3 to F8 were analysed using FaSSGF and FaSSIF as biorrelevant media.

The dissolution data were fitted to the exponential equation of Korsmeyer Peppas release model (equation 6.1) (Lafayette, 1989), in order to investigate the mechanism involved in drug release from matrix tablets.

$$\frac{Mt}{M\infty} = k\ t^n \qquad (6.1)$$

This equation is used for polymeric systems where the release mechanism is not well known, or more than one type of release behaviour is involved. Mt/M∞ is the fraction of drug released at time t, k is the kinetic constant, which depends on the geometrical properties of the tablet, and n is the release exponent for the drug. For a cylindrical matrix, n values of < 0.45 indicate Fickian release mechanism (diffusional controlled release); 0.45 < n < 0.89 indicate an anomalous release (non-Fickian) and n > 0.89 indicate Case II transport kinetics (relaxation controlled delivery).

6.2.3.2. Sequential drug release tests

To determine the effect of the change in pH along the digestive tract on the release of budesonide from the matrix tablets, dissolution tests were carried out in which the dissolution medium composition was changing throughout the test. This procedure resembles the pH change over the time in the gastro-intestinal track. For this purpose, the formulations of matrix tablets selected after standard drug release tests were placed in the dissolution vessels with FaSSGF media at pH 1.2 for 2 hours, then transferred to another dissolution vessel containing FeSSGF at pH 5.0 for 1 hour, and finally placed in FaSSIF media until the end of the study (24 hours). Aliquots of 5 mL were withdrawn at predetermined time intervals and budesonide concentration was determined as previously described.

6.2.4. Water uptake and matrix erosion behaviour

The behaviour of matrix tablets in contact with the different biorrelevant media was studied by the determination of their swelling and erosion. The results obtained were related with porosity of the tablets determined by mercury intrusion porosimetry.

6.2.4.1. Porosity measurements

The pore size distribution of the formulations F1 and F2 (blank formulations) were measured with mercury intrusion porosimetry (Micromeritics, Model AutoPore® IV 9500 Series, Norcross, GA, USA) in order to evaluate porosity of PAMgA hydrogel (PAMgA 5 and PAMgA 40). For the measurement of the pore size distribution two tablets were used. Low pressure measurements were performed from 0 to 0.2 MPa. High pressure measurements were performed from 0.2 to 212 MPa. The surface tension of mercury was assumed to be 480 mN/m and the contact angle of mercury with the sodium chloride was assumed to be 140º. PoreXpert modelling & analysis software was used for data processing.

6.2.4.2. Swelling and erosion

Swelling and erosion of tablets were studied after different time in contact with the biorrelevant media FaSSGF and FaSSIF. Each tablet was weighed and introduced in dissolution apparatus USP type II with 250 mL of biorrelevant media, at 100 rpm and a temperature of 37 ± 0.1 ºC. This volume was selected as simulates the total available volume in stomach for oral dosage forms (Vertzoni et al., 2005).

The tablets were withdrawn at different time intervals: 4, 8, 12, 16 and 20 hours, slightly blotted with a tissue paper to remove excess of medium and re-weighed to calculate water uptake. Then tablets were dried in a hot-air oven at 50 ºC until constant weight to calculate the erosion percentage.

Water uptake and matrix erosion (E) were estimated using equations (6.3) and (6.4) respectively, where Wo is the initial weight of the dry matrices; Wf is the final weight after the oven and Wi is weight of the swollen matrices after time, t. Blank formulations F1 and F2, as well as selected budesonide tablets were used for this study. Results are reported as a mean of three determinations.

$$Water\ uptake\ (\%) = \frac{Wi - Wf - Wo}{Wo} \cdot 100 \quad (6.3)$$

$$E\ (\%) = \frac{Wo - Wf}{Wo} \cdot 100 \quad (6.4)$$

The internal structure of the swollen tablets was determined by scanning electron microscopy (SEM, Jeol, JSM-6400, Tokyo, Japan). For this, tablets were withdrawn from the dissolution apparatus after 12 hours, slightly blotted with a tissue paper and lyophilised at – 50ºC and 0.2 mbar. The freeze-dried samples were mounted onto aluminium stubs and coated with gold. SEM photographs were taken at 100 x in three different points of the tablet, the inner part (core of the tablet), middle part and external part (in contact with medium). Biorelevant media FaSSGF (pH 1.2) and FaSSIF (pH 6.8) were used for this study, and distilled water was used as control.

6.2.5. Bioadhesion and local toxicity studies

The ability of PAMgA matrix tablets to adhere to the mucosa of the digestive tract was determined by performing bioadhesion tests. In addition, the local irritant capacity of the polymer was determined by Hen's egg test on chorioallantoic membrane.

6.2.5.1. Bioadhesion tests

Bioadhesive capacity of PAMgA tablets was measured using TA-XT Plus texture analyser (TA Instruments, Newcastle, UK) using results of maximum detachment force and the bioadhesion work. Several substrates were used for these assays: goat tanned leather, selected as model to determine bioadhesion (Blanco-Fuente et al., 1996b, 1996a; Campaña-Seoane et al., 2014); and porcine gastric and proximal duodenum mucosa for the ex vivo assays. Fort the ex vivo method, porcine samples were obtained from the local slaughter house (Compostelana de Carnes S.L., Santiago de Compostela, Spain) after the animal was sacrificed.

Two experimental conditions were used with goat tanned leather:

- Direct contact between the tablet and the dry tanned leather, where the medium was limited.
- Excess of fluid, where there was no medium limitation: This method was derived from the previous one. The tanned leather was submerged in the media and then run the assay.

For these assays FaSSGF at pH 1.2 and FaSSIF at pH 6.8 biorelevant media were used.

Tablets only with polymer (F1 and F2) as well as previously selected budesonide tablets were used for these experiments. The tablets were stuck in the above cylindrical probe of the texture analyser using a double-side adhesive tape. Tanned leather was attached on the centre of a Petri dish using a cyanoacrylate adhesive that was fixed to the lower support of the texture analyser using a clamp.

For direct contact experiments between the tablets and the tanned leather, 0.25 µL of biorelevant medium at room temperature were added to the centre of the tanned leather. Then the upper probe with the tablets was lowered at a constant rate of 1 mm/s until contact between the tablet, the media and the tanned leather surface was established. A force of 50 N was applied for 60 seconds to assure contact, then the probe returned to its initial position at 1 mm/s, and the force vs. elongation results were recorded.

For excess of media assay, tanned leather was attached to a Petri dish using a cyanoacrylate adhesive and completely covered with biorelevant media, FaSSGF or FaSSIF, at 37ºC, to simulate gastrointestinal conditions, approximately 50 mL. The assay runned in the same conditions as explained above.

For ex vivo studies, porcine gastric mucosa and proximal duodenum substrates were cleaned with simulated fluids, FaSSGF at pH 1.2 and FeSSIF at pH 5.0 respectively, in order to eliminate food residues. These substrates were submerged in FaSSGF and FeSSGF respectively for 5 minutes at 37ºC. Then, the substrates were attached to a Petri dish with cyanoacrylate adhesive and 100 µL of biorelevant media were placed in the centre of the substrate. The upper probe with the tablets attaches was lowered at 1mm/s and 50 N of force during 60 seconds were applied to get in contact the tablet with the mucosa. Force vs. elongation results were recorded until the complete detachment of the tablet at 1mm/s. Bioadhesion work was calculated as the area under the force - elongation curve in all cases.

6.2.5.2. Hen's egg test on chorioallantoic membrane (HET-CAM)

The irritating effect of poly (magnesium acrylate) hydrogel was evaluated by Hen's egg chorioallantoic membrane (HET-CAM) in vitro assay. Two different reticulation grades of the hydrogel, PAMgA 5 and PAMgA 40 were tested.

The test was carried out following ICCVAM - Recommended Test Method Protocol: Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM), 2010). Briefly, selected

fertile Broiler chicken eggs weight between 50-60g, were placed in the incubator (Ineltec, model CC SR 0150, Barcelona, Spain) at 38.0 ± 0.5° C and 70 % relative humidity. At day 9, the eggs were taken from the incubator and the shell was pierced at the widest part, in order to expose the chorioallantoic membrane (CAM). The membrane was then hydrated with NaCl solution 0.9 % (w/v) for 15 minutes and peeled off.

A solution at 0.5 % (w/w%) in distilled water of both polymers were prepared for the assay. NaCl solution 0.9 % (w/v) was used as negative control and NaOH solution 0.1 N was used as positive control. 0.3 mL of the polymer dissolution were added on the CAM and observed for 300 seconds under a stereomicroscope (Olympus SZ-STN) in order to evaluate the haemorrhage, lysis and coagulation times. The Irritation score (IS) was then calculated using analysis method B (equation 6.2):

$$\mathrm{IS} = 5 \text{ x } \frac{(301 - Hem\ t)}{300} + 7\ x\ \frac{(301 - Lis\ t)}{300} + 9\ x\ \frac{(301 - Coa\ t)}{300} \qquad (6.2)$$

Where:

Hem t is haemorrhage time (bleeding from the vessels); *Lis t* is vascular lysis time (blood vessel disintegration) and *Coa t* is coagulation time (intra- and extra-vascular protein denaturation). The tests were performed for triplicate. Irritation category classified according to the Irritation score (IS) is detailed in Table 6.3:

Table 6.3. Irritation category evaluated by hen's egg chorioallantoic membrane (HET-CAM)

Irritation score (IS)	Irritation classification
IS < 1	Non - irritant
1 ≤ IS < 5	Slight irritant
5 ≤ IS < 9	Moderate irritant
9 ≤ IS < 21	Severe irritant

6.3. *RESULTS*

6.3.1. Elaboration of matrix tablets

Eight types of flat cylindrical tablets, with an approximate weight of 200 mg were elaborated, four of them with PAMgA 5 and the other four with PAMgA 40. F1 and F2 tablets only contain polymer. In the rest, budesonide, at a dose of 9mg, and lactose at 20% were mixed with the polymer. Whereas formulations F3 and F4 did not contain SLS; a 1% and 2% of SLS was added to tablets F5-F6 and F7-F8 respectively. Table 6.4 shows the characteristics of all these tablets.

Table 6.4. Characterization of the different batches of PAMgA matrix tablets

FORMULATIONS	Weight (mg)	Thickness (mm)	Diameter (mm)	Hardness (N)
F1 (BLANK)	198.75 ± 2.10	3.58 ± 0.12	9.13 ± 0.01	71.35 ± 1.55
F2 (BLANK)	197.25 ± 3.30	3.46 ± 0.10	9.11 ± 0.02	72.15 ± 1.89
F3	198.45 ± 3.05	3.61 ± 0.11	9.11 ± 0.02	65.66 ± 1.45
F4	199.67 ± 2.23	3.66 ± 0.09	9.11 ± 0.01	65.34 ± 1.23
F5	198.96 ± 3.09	3.79 ± 0.09	9.12 ± 0.01	66.55 ± 1.76
F6	199.66 ± 3.59	3.53 ± 0.09	9.11 ± 0.01	65.75 ± 1.54
F7	199.87 ± 1.98	3.41 ± 0.08	9.11 ± 0.01	64.87 ± 1.89
F8	199.23 ± 2.23	3.62 ± 0.09	9.11 ± 0.02	65.55 ± 1.44

Formulations F1 and F2 (blank tablets) shows slightly higher hardness values. This is due to the good compressibility characteristic of the polymer that enables its use as excipient for matrix tablets. The addition of lactose as excipient in a ratio of 20% (w/w) to the tablets (formulations F3 and F4) slightly reduced matrix tablet hardness. No significant difference in hardness was observed when sodium lauryl sulphate (SLS) was added to the tablets in a ratio of 1 % (formulations F5 and F6) or 2 % (formulations F7 and F8).

6.3.2. In vitro drug release assays

The selection of the most suitable budesonide tablet formulation was made considering, in a first instance, the dissolution profiles of the drug both in simulated gastric medium and simulated intestinal medium. The accumulative percentage of budesonide released versus time (hours) from the different batches of matrix tablets elaborated, is shown in figure 6.2 in both pH assayed FaSSGF and FaSSIF.

For all batches elaborated a controlled drug release was observed, which lasted for at least 24h. The drug release was seemingly influenced by the pH of the media being faster in FaSSIF than in acid medium. In all cases, the release in FaSSGF were very low in 9 first hours. This fact is very important in order to reduce the release in the stomach and ensure that a greater amount of drug arrive the colon. In FaSSGF only a 20 % of the drug was released from formulations F7 y F8 in 9 hours reaching approximately 90 % of drug released at the end of the study (24 hours). For formulations containing lactose 20 % w/w and SLS 1% w/w, F5 formulated with PAMgA 5 and F6 with PAMgA 40, at 9 hours the percentage of drug released was of nearly a 15 % and F5 reached 75 % and F6 a 85 % at 24 hours. Formulations with lactose 20 % w/w, F3 and F4 released 62 % and 32 % of the drug at the end of the study respectively.

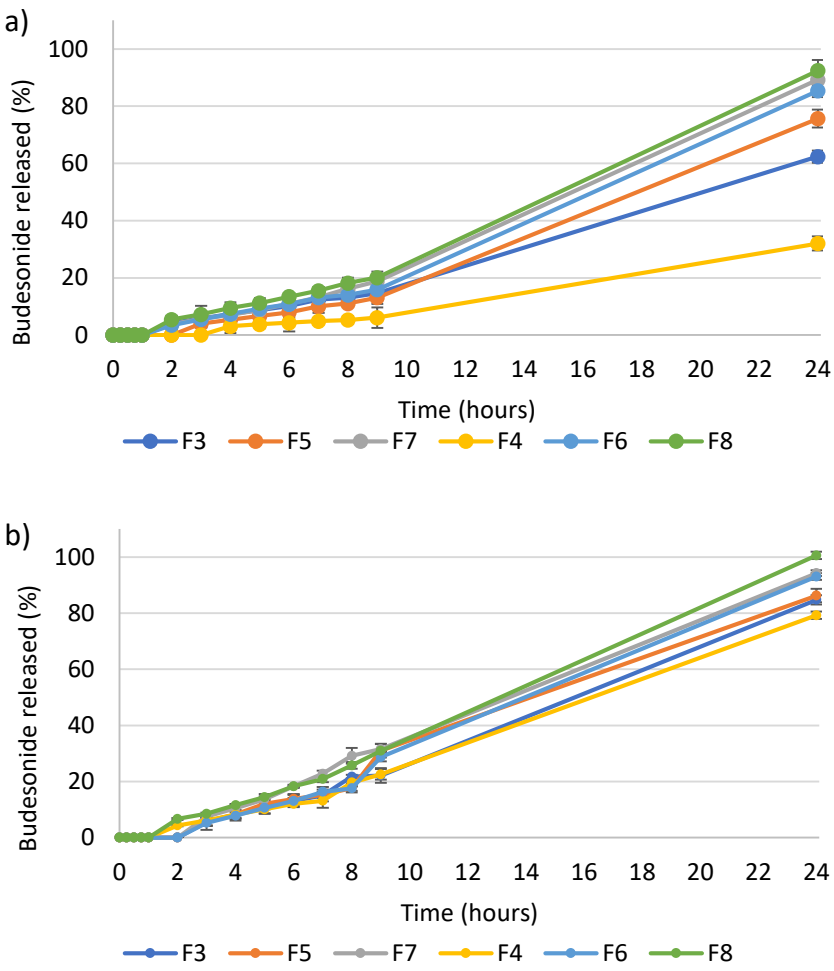


Figure 6.1. Accumulative percentage of dissolved budesonide for formulations F3-F8 matrix tablets in a) FaSSGF at pH 1.2 and b) FaSSIF at pH 6.8 plotted as function of time (n=3).

On the other hand, in FaSSIF, formulations F7 and F8 released the total percentage of budesonide (9 mg) at the end of the study. Formulations F5 and F6 released over 85 % of budesonide at the end of the dissolution study, whereas formulations F3 and F4 did not reach this percentage after 24 hours of test.

All the release data of the matrices fit well the Korsmeyer-Peppas model as the values of the correlation coefficient (r2) were greater than 0.97 in all formulations in FaSSIF, and the correlation coefficient (r2) for the formulations in FaSSGF was over 0.96. The values of the correlation coefficient (r2), release rate constant (k), and release exponent (n) are shown in table 6.5 rely upon the pH assayed.

The value of the release constant, *k*, was low in all formulations, suggesting no burst release of budesonide from the matrices neither in FaSSGF or FaSSIF. For the six formulations assayed the diffusional exponent (n) was in the range $n > 0.89$, indicating that the release of the drug from the tablets follows Case II transport kinetics.

Table 6.5. Korsmeyer-Peppas model fitting of formulations F3-F8 of budesonide in FaSSGF and FaSSIF

	FaSSGF					FASSIF			
	Release exponent (*n*)	**Release rate constant (k)**	**Correlation coefficient (r^2)**	**Order release**		**Release exponent (n)**	**Release rate constant (k)**	**Correlation coefficient (r^2)**	**Order release**
F3	1.055	1.689	0.9643	Case II transport kinetics	**F3**	1.305	1.311	0.9948	Case II transport kinetics
F4	1.315	0.411	0.9554	Case II transport kinetics	**F4**	1.182	1.616	0.9809	Case II transport kinetics
F5	1.406	0.700	0.9715	Case II transport kinetics	**F5**	1.313	1.347	0.9776	Case II transport kinetics
F6	1.236	1.280	0.9707	Case II transport kinetics	**F6**	1.395	1.115	0.9895	Case II transport kinetics
F7	1.224	1.298	0.9738	Case II transport kinetics	**F7**	1.243	1.958	0.9932	Case II transport kinetics
F8	1.176	2.001	0.9619	Case II transport kinetics	**F8**	1.122	2.559	0.9882	Case II transport kinetics

Matrix tablets corresponding to formulations F7 and F8 were selected as results in FaSSIF showed the complete release of the drug after 24 hours and in FaSSGF only a 20 % of the drug was released in 9 hours. With these two formulations sequential dissolution tests were performed.

The in vitro release of budesonide from both types of tablets (F7 and F8) on sequential exposure to pH 1.2 (2 h), pH 5 (1 h) and pH 6.8 (21 h) is shown in Figure 6.3. This dissolution test simulates transit through all the gastrointestinal track: stomach, proximal and middle small intestine (duodenum and jejunum).

Budesonide release from formulation F7 in the simulated fasted gastric state (FaSSGF) was negligible (3 %). Released was sustained throughout all the entire simulated GI and complete at the end of the study, 97.18 ± 2.58 % with a correlation coefficient (r^2) of 0.975 fitted to Korsmeyer-Peppas model. Similar profile was obtained with F8 matrix tablets, were budesonide release was negligible in FaSSGF and sustained and controlled until the end of the study, reaching complete release of budesonide (99.65 ± 0.31 %). Correlation coefficient (r^2) for this formulation was of 0.9808. For both formulations release exponent (n) was in the range n > 0.89, indicating that budesonide release from the tablets follows Case II transport kinetics.

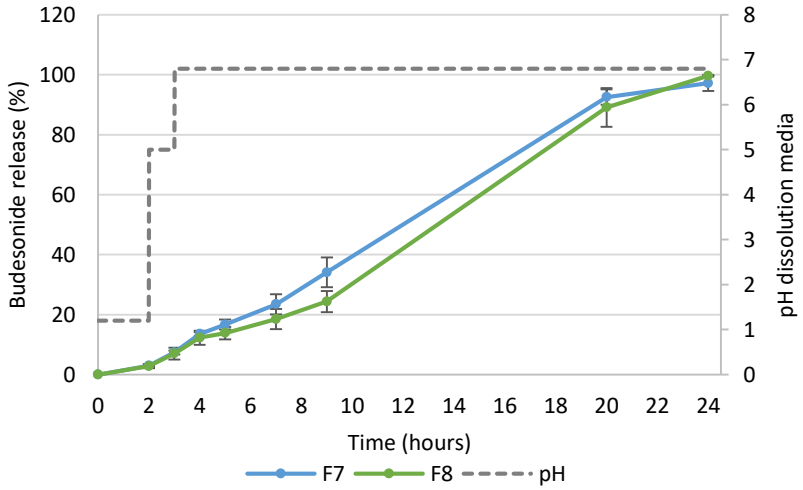


Figure 6.2. Acumulative percentage of dissolved budesonide for formulations F7 and F8 matrix tablets in sequential dissolution tests plotted as function of time (n=3). pH change over time is depicted as well.

6.3.3. Porosity measurements

To determine pore size distribution of the formulations, three tablets of blank formulations F1 (PAMgA 5) and F2 (PAMgA 40) were used. For data processing, PoreXpert modelling & analysis software was used, see results in table 6.6.

Table 6.6. Results obtained of blank PAMgA matrix tablets in mercury intrusion test.

Formulations	Porosity (%)	Permeability (mD)	Fluid Uptake (%)	Average Pore Diameter (µm)	Median Pore Diameter Volume (µm)
F1 (BLANK)	5.3	2.02	92.35	2.04	2.90
F2 (BLANK)	20.5	10.97	98.89	2.72	4.03

Porosity result of formulation F2, manufactured with PAMgA 40 hydrogel, was of 20.5%, significantly higher compared with 5.3 % obtained for formulation F1 (PAMgA 5). Same difference is observed in permeability results, as data obtained for F2 was of 10.97 mD and 2.02 mD for F1 formulations. Regarding median pore diameter, PAMgA 40 hydrogel formulation presents 4.03 µm compared with 2.90 µm obtained if F1 formulation.

Fluid uptake percentage in F2 formulation was of 98.89 % in comparison with 92.35 % obtained for F1 formulation. These results are in accordance with porosity and permeability results, as F2 formulation presents wider pore volume giving rise to a higher fluid uptake.

6.3.4. Swelling and erosion

To perform the water absorption and erosion behaviour tests of the selected tablets, a previous test with blank matrix tablets was carried. Figure 6.3 shows water uptake and erosion data for both blank matrix batches F1 and F4 in both pH assayed, FaSSGF and FaSSIF. The water uptake in FaSSGF was 381.2 ± 2.6 % and 453.7 ± 20.1 % for formulations F1 and F2 after 12 hours of study (figure 6.3 a). This percentage remained constant during the performance of the test, reaching 389.0 ± 14.4 % and 479.2 ± 25.4 % for F1 and F2 at the end of the study. These values were significantly lower than those obtained with the same formulations in FaSSIF: the water uptake percentage of F1 and F2 matrix tablets was 748.9 ± 114.6 % and 1112.6 ± 168.1 % after 12 hours. Formulation F2 reached 1682.2 ± 117.5 % of water uptake after 20 h, on the other hand, F1 formulation decrease the water uptake percentage at the end of the study (20 h) with results of 676.2 ± 43.8 %. This decrease in water uptake is directly related with erosion of the hydrogel as the study progresses.

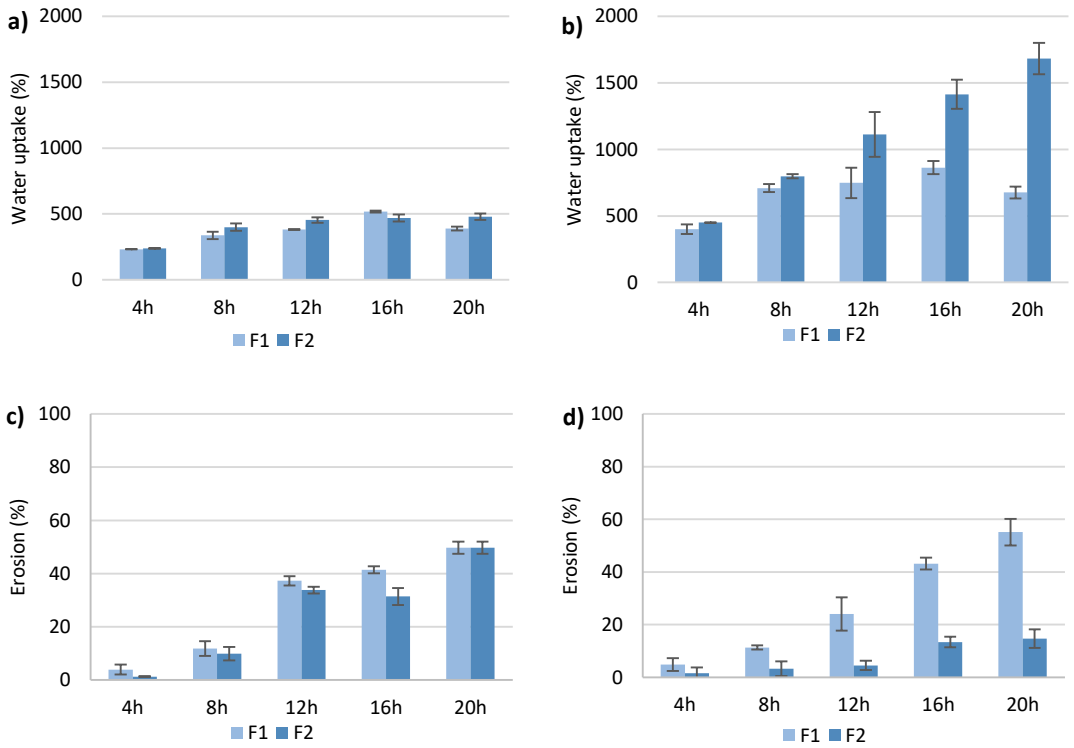


Figure 6.3. Accumulative % erosion data for batches F1 and F2 blank matrix tablets of budesonide in a) FaSSGF and b) FaSSIF and accumulative % water uptake data for batches F1 and F2 in c) FaSSGF and d) FaSSIF.

On the other hand, erosion percentage was negligible after 4 hours of the assay for both formulations F1 and F2 (figure 6.3 c) in FaSSGF. At the end of the study the erosion of the tablets reached almost the 50 % in both F1 and F2 matrix tablets. In FaSSIF, two different erosion profiles were observed for the formulations tested. F1 matrices showed an increasingly erosion percentage during the study reaching 55.1 ± 5.1 % at 20 hours (figure 6.3 d). By contrast, F2 formulation, reach only 14.7 ± 3.5 % at the end of the study. These results are in accordance with the ones obtained in water uptake percentage, as F1 formulations experience a steep erosion in FaSSIF medium opposite F2 that presents an intense water uptake in the same media.

Regarding formulations F7 and F8, similar profiles of erosion and water uptake were obtained, although the results of both formulations were lower for water uptake compared with blank tablets, and higher in erosion percentage. These results are due to de addition of soluble excipients to the formulations such as lactose in a 20% w/w and SLS in a 2% w/w. Figure 6.8 show the data obtained for F7 and F8 in FaSSGF and FaSSIF.

Water uptake of F8 in FaSSGF after 12 hours was of 446.2 ± 93.0 %, the maximum obtained at that pH. Formulation F7, on the contrary, showed lower water uptake results, with 310.00 ± 22.3 % at the same time of the assay (figure 6.4 a). In this pH the progression of water uptake reaches a high percentage at the beginning of the assay and is in the same range until the end of the assay. Water uptake process for F8 at pH 6.8 took place rapidly as the medium moistened the tablets, reaching 1141.5 ± 68.8 % in 8 hours, remaining in the same range until the end of the study (20h). Formulation F7 reached 786.8 ± 40.3 at that same time, and begun a decrease in water uptake as the trial proceeds, with 407.1 ± 36.4 % at 20 h (figure 6.4 b).

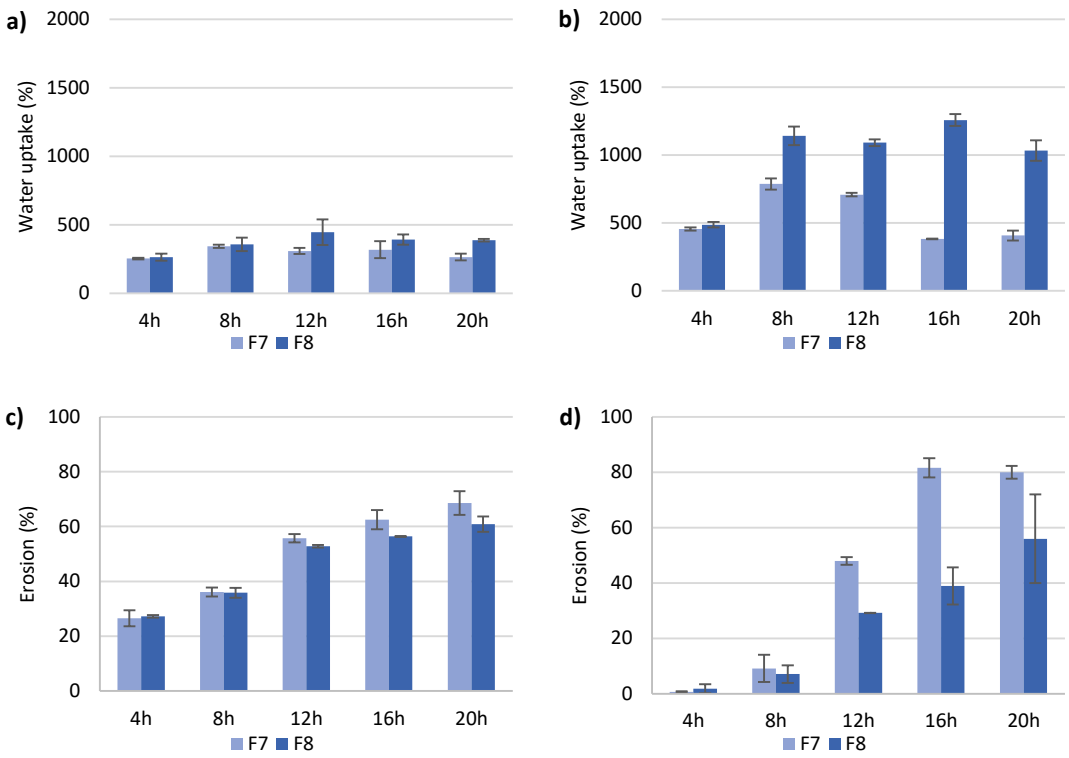


Figure 6.4. Accumulative % erosion data for batches F7 and F8 matrix tablets of budesonide in a) FaSSGF and b) FaSSIF and accumulative % water uptake data for batches F7 and F8 in c) FaSSGF and d) FaSSIF.

Erosion profiles in FaSSGF are similar for both formulations, with a constant increase during the assay, reaching 68.6 ± 4.3 % and 60.9 ± 2.8 % for F7 and F8 respectively at the end of the study (figure 6.4 c). In FaSSIF medium, F7 show the maximum value at 16 h with an 81.6 ± 3.5 % of erosion, while F8 obtained and erosion of 38.9 ± 6.7 % at that assay time (figure 6.4 d). At the end of the study (20 h) F8 reached 56.0 ± 16.1 % while F7 remain above the 80 % of erosion. The addition of excipients to the matrix tablets leads to the formation of pores as the excipients are solubilizing during the assay, enabling the moistening of the tablets with the medias.

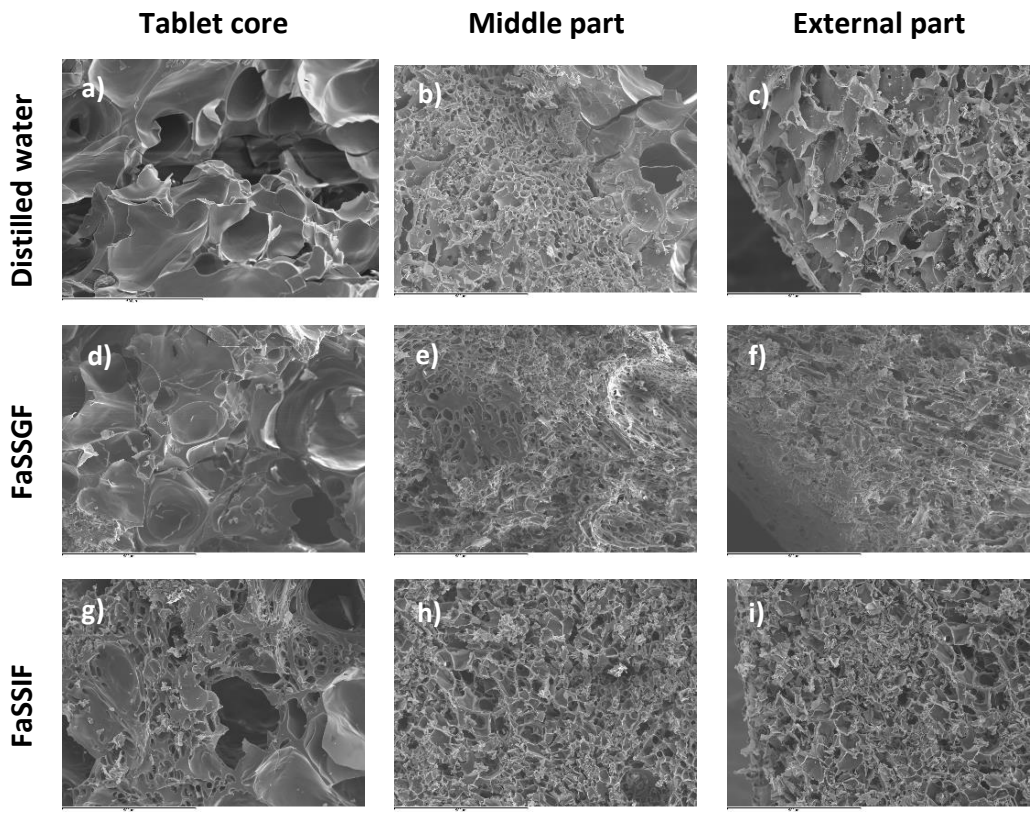


Figure 6.5. SEM images of tablets F2 after 12 hours in distilled water (a, b and c), FaSSGF (d, e and f) and FaSSIF (g, h and i)

SEM images of moistened blank tablets were obtained, in order to evaluate the structure of the polymer in the different pH assayed. Figure 6.5 shows SEM images taken after 12 hours of assay, and freeze-dried. The observation of the samples revealed a sponge-like structure that seemingly facilitates water diffusion in all directions. In tablets in FaSSIF possessed numerous pores with a superporous structure in the external part of the tablet. In FaSSGF, on the contrary, the core of the tablet presents a solid structure were no pores are visible seen, whereas the outer part presents small pores similar to the ones observed in FaSSIF.

6.3.5. Bioadhesion tests

For the bioadhesion study goat tanned leather and porcine stomach and intestine were used. The adhesion work of blank-tablets (F1 and F2) and budesonide tablets F7 and F8, using goat tanned leather as substrate are shown in Figure 6.6. Two experimental conditions were tested with this substrate:

- Direct contact between the tablet and the dry tanned leather, where the medium was limited.
- Excess of fluid, where there was no medium limitation: This method was derived from the previous one. The tanned leather was submerged in the media and then run the assay.

Maximum work of adhesion in goat tanned leather using FaSSGF medium at pH 1.2 was seen with F1 tablets (PAMgA 5 blank formulation) reaching 1.04 ± 0.10 mJ in direct contact test (figure 6.6). Regarding F2 formulation (PAMgA 40 blank tablets) maximum bioadhesion work was 0.83 ± 0.15 mJ. Results in FaSSIF media at pH 6.8 were 0.95 ± 0.18 mJ and 0.83 ± 0.23 mJ for F1 and F2 formulations respectively. No statistical difference is foreseen between blank formulation, although results showed bioadhesion work decreased in formulations F7 and F8. Formulations F7 and F8 contain lactose in a 20% w/w and SLS 2% w/w as excipients and the addition of excipients leads to a decrease in adhesion work, as the percentage of polymer in the tablets is reduce. Results with formulation F7 were 0.95 ± 0.06 mJ and 0.88 ± 0.12 mJ and in FaSSGF and FaSSIF mediums respectively. Formulation F8 present lower bioadhesion work, results also was observed in blank formulations with PAMgA 40, with 0.72 ± 0.12 mJ in FaSSGF and 0.81 ± 0.05 mJ in FaSSIF.

For excess of medium assay, where there was no fluid limitation, the work of adhesion was reduced compared with limited medium assay for all the formulations tested. Maximum value was obtained with F1 formulation in FaSSGF 0.50 ± 0.05 mJ. At pH 6.8 (FaSSIF) maximum value result was obtained with F1 blank formulation (PAMgA 5) as reported in al test performed, 0.17 ± 0,01 mJ.

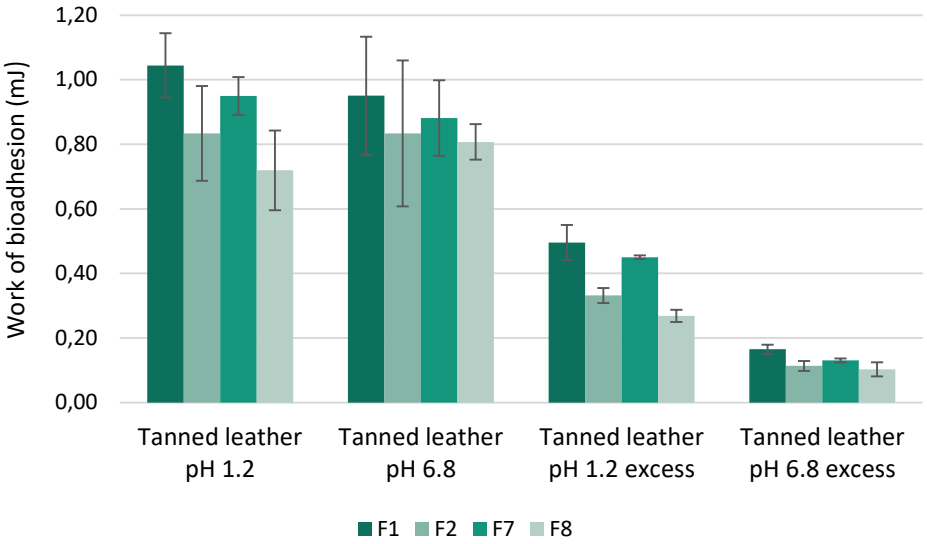


Figure 6.6: Bioadhesion work values expressed as milliJoule (mJ), obtained using goat tanned leather as bioadhesive substrate: where the medium was limited and with excess of fluid, using both biorelevant mediums FaSSGF at pH 1.2 and FaSSIF at pH 6.8.

Similar values to those obtained in the excess of medium assay were obtained in the ex vivo tests, using porcine gastric mucosa and proximal duodenum as substrates (figure 6.7). For the ex vivo assays, FaSSGF at pH 1.2 and FeSSIF at pH 5.0 were used as medias for porcine gastric mucosa and proximal duodenum respectively. The substrates were cleaned and tempered at 37 ± 0.5 ºC with the media for the test. Maximum work of adhesion was obtained with blank formulation of PAMgA 5 with a value of 0.34 ± 0.16 mJ. No significant difference is obtained with the other formulations testes, although results in F7 and F8 (tablets with excipients) are slightly lower.

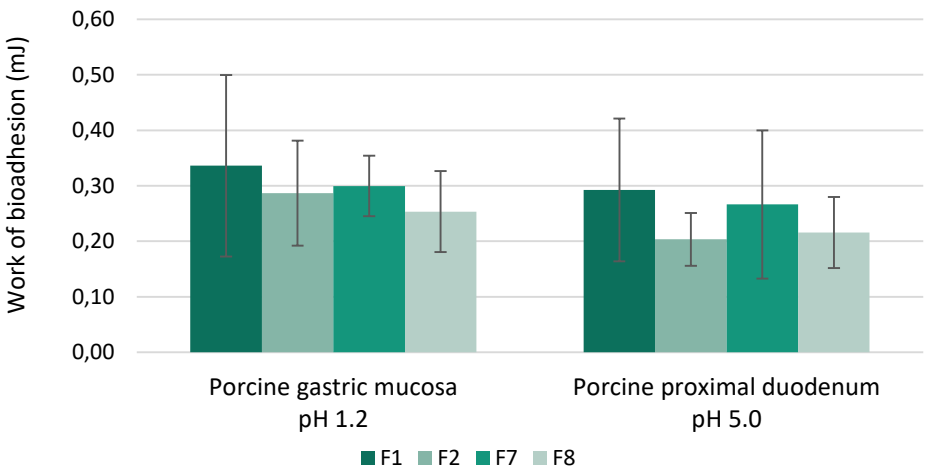


Figure 6.7: Bioadhesion work values expressed as milliJoule (mJ), obtained in *ex vivo* studies using porcine gastric mucosa and FaSSGF medium at pH 1.2 and proximal duodenum and FeSSIF at pH 5.0.

6.3.6. Hen's egg test on chorioallantoic membrane (HET-CAM)

In the local irritation test on chorioallantoic membrane, NaCl 0.9 w/v solution and NaOH 0.1N solution were used as negative and positive controls respectively in order to evaluate assay viability. IS for positive control (NaOH 0.1N) was 17, showing haemorrhage (bleeding from the vessels) at 22 seconds, vascular lysis (blood vessel disintegration) at 45 seconds and coagulation (intra- and extra-vascular protein denaturation) at 67 seconds. On the other hand, vessel lysis, haemorrhage, and coagulation were not observed for 0.9 % w/v NaCl solution. The irritation scores of the samples testes, as well as the positive and negative controls are shown in table 6.7.

Table 6.7. Irritation scores of samples evaluated by hen's egg test-chorioallantoic membrane assay (HET-CAM).

SAMPLES	IRRITATION SCORE (IS)	IRRITATION CLASSIFICATION
PAMgA 5 (0.5 % W/W)	0	Non - irritant
PAMgA 40 (0.5 % W/W)	0	Non - irritant
NaCL 0.9 % W/V	0	Non - irritant
NaOH 1N	17	Severe irritant

Once the membrane was hydrated with and the chorioallantoic membrane (CAM) was expose, 0.3 mL of polymer solution were placed. No haemorrhage, lysis or coagulation were observed during the test (300 seconds) with both hydrogels solutions, PAMgA 5 and PAMgA 40. Figure 6.9 shows the images taken during the performance of the test, with both polymers. Therefore, PAMgA 5and PAMgA 40 hydrogels can be classified as non-irritant, as irritation score is 0.

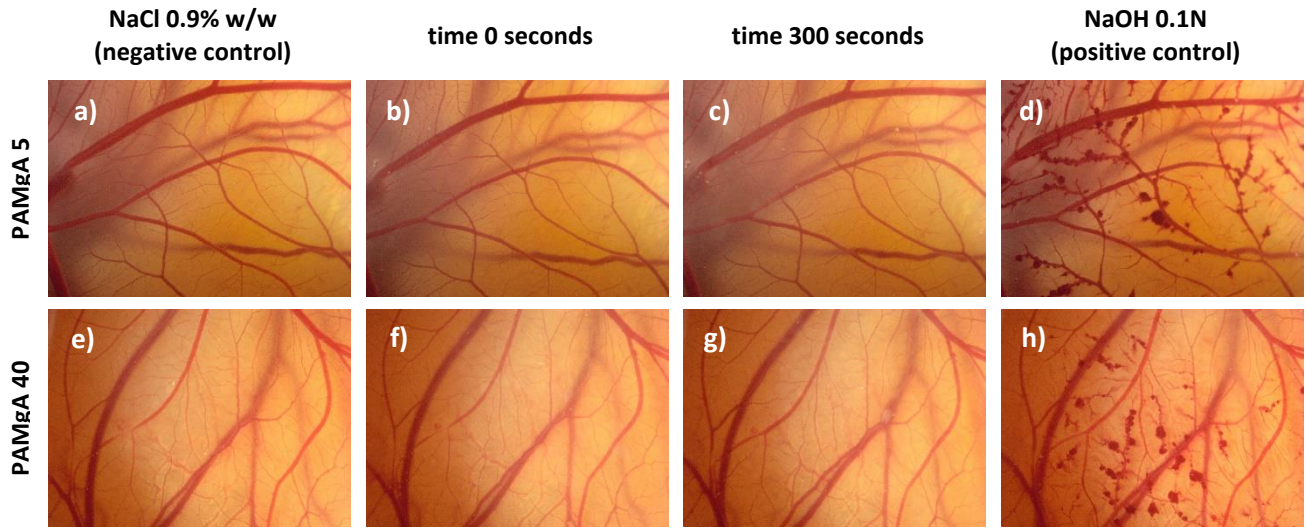


Figure 6.8: Images of HET-CAM test: a) NaCl 0.9 % solution (negative control); b) Time 0 seconds; c) Time 300 seconds and d) NaOH 0.1N solution (positive control) for 0.5 % w/w solution with PAMgA 5 hydrogel. e) NaCl 0.9 % solution (negative control); f) Time 0 seconds; g) Time 300 seconds and h) NaOH 1N solution (positive control) for 0.5 % w/w solution with PAMgA 40 hydrogel.

6.4. *DISCUSSION*

We have elaborated budesonide matrix tablets using a new hydrogel derived from acrylic acid called PAMgA. As reported previously by our group, (Cheddadi et al., 2011; Simancas-herbada et al., 2020) PAMgA hydrogel showed good results regarding easy synthesis, biocompatibility and physical characteristics that lead to its used as excipient for matrix tablets for oral administration of highly soluble drugs. In the present study we evaluated the potential of PAMgA hydrogel as excipient for extended release matrix tablets of budesonide, a poorly soluble drug used for inflammatory diseases that occur in the medium-last portions of the gastrointestinal tract. Budesonide is a second-generation costicosteroid, classified as practically insoluble in water with a molecular weight of 430.5 g/mol ("PubChem Compound Summary for CID 5281004, Budesonide," 2020). This drug has low systemic bioavailability after oral administration, due to extensive first pass hepatic effect, so approximately 75% of the drugs is excreted in the urine and feces (Lichtenstein, 2016). Its antiinflammatory action at the local level, for the treatment of ulcerative colitis and Crohn's disease, is achieved with effective concentrations in the distal duodenum, jejune and colon. PAMgA extended release matrix oral tablets are designed to release budesonide in the distal intestine and prevent its release at the stomach level. Two PAMgA hydrogels were used for this study, PAMgA 5 and PAMgA 40, which differ in their polymeric network, due to the interaction of Mg^{2+} ions and COO^- groups of polymer chains (Wurm et al., 2020b).

Matrix tablets of PAMgA 5 and PAMgA 40 (blank tablets) and containing a dose of 9 mg of budesonide were elaborated (Table 6.1). Tablets, obtained by direct compression, showed good mechanical resistance in all formulations F1 to F8. The addition of excipients, lactose and sodium lauryl sulphate (SLS), decrease tablets hardness, although no capping nor disgregation was observed.

The budesonide released from the matrix tablets at the stomach and intestine level, is a critical factor for the development colonic system. Suitable matrix tablet of PAMgA could be extended release and to target budesonide in the colon and prevent its release at

the stomach level. For this, biorelevant media were used in the in vitro drug release assays to better simulate physiological conditions, as USP buffers and solutions do not mimic the properties and compositions of the gastrointestinal track. GI fluids vary in pH, buffer species, buffer concentration, osmolality, viscosity, and surface tension, as well as the concentration and type of bile components along the length of the intestine (Mudie et al., 2020). The presence of bile salts such as sodium taurocholate and phospholipids (lecithin) have been shown to enhance solubility of poorly water-soluble drugs where their solubility could also increase by micelles formation (Klein, 2010).

Budesonide could be used also as non-soluble model drug to study drug release behaviour of PAMgA hydrogels, in concentration under sink conditions thus, technically below the limit where the tablets are considered poorly soluble.

Extended release of budesonide was achieved from all the six formulations of matrix tablets prepared with PAMgA hydrogels. The drug release was influenced by the pH of the media, being faster in FaSSIF than in FaSSGF (figure 6.1). In all cases, the release in FaSSGF was less than 20%. Taking into account that the normal residence time in stomach about 1 hour and its increase as consequence bioadhesion of the polymer, the release in the stomach will be, probably, very low. In addition, formulations F7 and F8 practically the total amount of drug in the tablet was released in 24 hours in FaSSIF.

In order to determine the mechanism responsible for drug release from the matrix tablets, dissolution data were fitted to Korsmeyer–Peppas equation. This model is generally used to analyse the release of pharmaceutical polymeric dosage forms, when the release mechanism is not well known or when more than one type of release phenomena could be involved (Figueiras et al., 2010). In table 6.5 are detailed the results in release exponent (n) of the six formulations in both pH assayed, FaSSGF and FaSSIF. As it is possible to observe, in all formulations release exponent is over 1, indicating that the release of the drug follows super case-II transport (Cascone, 2017). This super case-II transport, supports time-independent constant drug release kinetics, as the gradient between the dispersed drug in the hydrogel and its dissolution media enables the drug diffusion from a zone of higher concentration (in the inner core of the matrix tablet) to a lower concentration region

(dissolution media). This process is also known as anomalous transport as it combines two simultaneous mechanisms of drug release: a) drug diffusion into the swollen polymer and b) matrix swelling due to the penetration of the dissolution medium (Narayanaswamy and Torchilin, 2019).

Budesonide is added to the matrix tablets and entrapped within the polymeric network of the tablets. When the tablet gets in contact with the release medium, begun to imbibed water and therefore begun to swell forming gel layer. Due to the anionic nature of PAMgA polymer, budesonide release may be media dependent. In FaSSIF media (pH 6.8), the –COOH groups of the polymer chains are ionized, which results in swelling of the polymer (Nagra et al., 2019). As reported Uzair Nagra et al. this gel formation acts as a barrier and prolongs drug release. In his studies, Carbopol 934P polymer (anionic polymer) showed good matrix forming properties enhancing release of poorly soluble drugs in neutral or basic buffers, such as Aceclofenac. Budesonide is a water insoluble drug, but its solubility is enhance in after binding to hydrophilic carriers thus the dissolution medium may favoured both the drug release and sustained effect due to polymer (Yan et al., 2019).

Taking into account the results obtained, formulations F7 and F8 were selected as lead formulations and the following assays are carried out with both formulations.

The GI environment is highly variable and complex, and is influence by several factors that impact in pH, composition and volume. In humans, the pH of the stomach is 1 - 2, and rises to 6.5 - 6.8 in the small bowel (Gareb et al., 2020). Sequential in vitro drug release tests simulates transit through all the gastrointestinal track: stomach, proximal and middle small intestine (duodenum and jejunum), enabling a better prediction of the in vivo release profile. The select formulations F7 and F8 that showed the best release profile in FaSSIF so were therefore tested in sequential releases test (figure 6.2). Complete drug release was achieved in both formulations after 24 hours, following sequential exposure to different pH media simulating in vivo gastrointestinal transit: pH 1.2 (2 h), pH 5 (1 h) and pH 6.8 (21 h).

As reported in FaSSGF and FaSSIF biorrelevant medias, sequential dissolution data were fitted to Korsmeyer–Peppas equation, were release exponent of both formulations was over 1 (n >1), indicating that the release of the drug follows super case-II transport. The release is therefore predominantly controlled by matrix swelling/dissolution, reaching zero order release (Yehia et al., 2009) indicating slow and continuous release over a period of 21 h in pH 6.8. 75% of the budesonide dose was released in a sustained manner between 4 and 20 hours of testing.

Water uptake, swelling, diffusion, and erosion are the processes involved in the release of a drug from hydrogel matrix tablets.

Swelling and erosion studies were carried out in 250 mL of the two biorelevant media, FaSSGF (pH 1.2) and FaSSIF (pH 6.8) with blank tablets (F1 and F2) and F7 and F8 formulations. As the PAMgA matrices get in contact with the media, water penetrates in their structure giving way to matrix swelling and gel layer formation. As time goes by, polymer chains begun to disentangle from the matrix, causing the erosion of the tablet. Therefore, the drug diffuses through the gel layer to be released to the medium, yet the drug is also release by erosion of the outer part of the tablet.

Regarding blank formulations, as shown in Figure 6.3, water uptake is more intense in FaSSIF than in FaSSGF for both formulations, whereas erosion for F1 formulation is similar in both pH assayed, erosion percentage for F2 decreases significantly in FaSSIF. PAMgA hydrogel possesses a number of ionizable acid groups in its structure. When the hydrogel gets in contact with FaSSIF (pH 6.8), the COOH groups are ionized into negatively charge species. The resulting electrostatic forces generated from COO- leads the hydrogel to expand and increase swelling ratio or water uptake (Chuah et al., 2018; Lim et al., 2017).

Mercury porosimetry measurements of pure PAMgA 5 and PAMgA 40 tablets revealed that average pore diameter was very similar for both matrix tablets (table 6.6), on the other hand, median pore diameter showed higher results in F2 formulation. A higher pore volume will enable the water to come easily and more quickly into the tablet matrix, thereby fluid uptake results for F2 formulation showed a higher values than F1 formulation

(Pandey et al., 2018). Although, both PAMgA polymers were sieve through a 1 mm after freeze drying to obtain the powder used as excipient for tablets, direct compression process may melt polymer particles that held together, increasing pore size. No significant differences in compression between the polymers were observed during tablet formation, although results in porosity are greater in F2 formulations. The increase in pore size, hence the increase in porosity of the tablets, and therefore permeability of the fluids. These data agree with the data obtained from the swelling tests, as blank tablets of PAMgA 40 (F2 formulation) showed higher water uptake capacity regarding PAMgA 5 tablets.

In the case of F7 and F8 formulations (figure 6.4), the presence of excipients such as lactose and SLS contribute to a lower water uptake of the tablets. As reported Bendgude et al. (2010) lactose is a water-soluble and hydrophilic compound, that facilitates gel formation and shortens the penetration of the dissolution media into the matrix. This excipient rapidly dissolves in dissolution media diffusing outwards, forming channels in the matrix tablets increasing porosity.

The erosion and swelling capacity of the PAMgA tablets were related to the budesonide release rate, being slower at pH 1.2 than in alkaline medium. In FaSSIF, regarding mesh size of the polymer, two different behaviours were observed. On one hand, PAMgA 5 showed higher erosion values in both, blank and final formulations, on the other hand, PAMgA 40 showed greater water uptake percentage in the same media. These differences in behaviour of PAMgA hydrogels were not observed in acid pH, as results in erosion and water uptake could be considered similar for both blank and final formulations. The drug needed to go through the gel layer to be release from PAMgA 40 polymer formulations, being this gel layer more thick and viscous in FaSSIF. Besides that, the release of the drug in PAMgA 5 formulations is erosion dependant in that same biorrelevant media. Although the different behaviour of the tablet matrix according to dissolution medium could carry out differences in release profiles, the fact is that release profiles of budesonide of formulations F7 and F8 show no significant difference.

No difference in water uptake of swelling capacity of PAMgA hydrogels were observed in FaSSGF media.

Acrylic acid-derived polymers tend to have bioadhesive properties. Bioadhesion is considered as the phenomenon between two materials, which are held together for extended periods of time by interfacial forces. Bioadhesion is referred when interaction occurs between polymer and epithelial surface, on the order hand, mucoadhesion when occurs with the mucus layer covering a tissue. In this study, goat tanned leather was used as a model for determining bioadhesion of PAMgA hydrogels as tanned leather has been useful for different routes of administration, i.e., buccal mucosa (Blanco-Fuente et al., 1996a), vaginal mucosa (Campaña-Seoane et al., 2014) or ocular tissues (Fernández-Ferreiro et al., 2014).

Previously, the blank formulations F1 and F2 were analysed to study only the bioadhesion due to polymer. Blank formulations F1 and F2 showed higher bioadhesion regarding formulations F7 and F8 in both tests assayed: with medium limitation and with excess of medium. When a higher concentration of polymer is present in the matrix tablets (blank tablets), more adhesive units of polymer chains can interpenetrate with the substrate enhancing bioadhesion by forming hydrogen bonds (Li and Mooney, 2016). As the amount of medium available is higher this adhesion is decreased, as the hydrogel begun to swell and the external polymer chains begun to disentangle from the tablet. Although no statistical difference in bioadhesion work is observe between both medias assayed FaSSGF and FaSSIF, in pH 6.8 medium, the water uptake of the tablets is very quick, so the adhesion of the tablets is lower than the adhesion work reported for acid pH (FaSSGF). Regarding formulations F7 and F8, bioadhesion work is lower than the obtained for blank tablets. As commented above, these tablets have lower percentage of polymer as lactose and SLS are added in a 20% w/w and 2% w/w to the tablets. Water solubility of lactose give way to the formation of pores in the matrix tablets that enables medium penetration as the excipient begun to solubilize (Bendgude et al., 2010).

Same behaviour to the one observed in excess of media tests are reported for ex vivo studies using porcine gastric mucosa and FaSSGF medium at pH 1.2 and proximal duodenum and FeSSIF at pH 5.0. For oral administration, the adhesion to the epithelium prolongs the retention of the tablets, enabling the release of the drug in the desire site of

the gastrointestinal track. Intestinal epithelium is wet, dynamic and slippery, limiting this ability of hydrogels to adhere. Poly(acrylic acid) hydrogels are known to form hydrogen bonds with the mucosa, these work adhesion needs to be in a range of magnitude that hold the tablets through the gastrointestinal track without damaging the lining of the mucosa (Campaña-Seoane et al., 2014). Results obtained in both porcine gastric mucosa and proximal duodenum suggests PAMgA hydrogels may adhere to the intestinal mucosa, encouraging drug release.

Regarding PAMgA polymer used, an increase in mesh size gave rise to a decrease in adhesion work (figures 6.6 and 6.7), this is due to the changes in density and mobility of the polymer chains (Blanco-Fuente et al., 1996a). PAMgA 5 hydrogel display more flexibility and elasticity than PAMgA 40, thus when the tablet gets in contact with the medium and the substrate, the chains would diffuse and create the hydrogen bond, and a higher separation work will be needed.

In a controlled release system an increasing on residence time of tablets in intestinal tract could be interesting. Nevertheless, in the case of budesonide a low bioadhesion in stomach than intestine is better, aiming to reduce drug absortion.

As already mentioned, in previous studies carried out by our research group we found that PAMgA has very low oral toxicity. However, given the long time that budesonide tablets will foreseeably remain in contact with the intestinal mucosa, it is advisable to additionally evaluate the local irritant power of the polymer used.

Hen's egg chorioallantoic membrane (HET-CAM) test is a sensitive, not expensive and easy handling method, that uses fertilized hen eggs in order to evaluate irritant potential of formulations and active ingredients in the early stages of products development (Nowak-Sliwinska et al., 2014). This technique is widely used for the evaluation of different pharmaceutical forms such as vaginal emulsions (Palmeira-de-Oliveira et al., 2018), vaccines (Batista-Duharte et al., 2016), topical antiseptic solutions and ointments (Marquardt et al., 2010), antitumoral molecules (Lokman et al., 2012), ocular gels (Irimia et al., 2018) or cosmetic formulations (Zhang et al., 2020). Therefore, HET-CAM offers a valuable

intermediate step that is both cost and time-efficient, providing a great approach prior to pre-clinical evaluation.

In our study, no signs of haemorrhage, vascular lysis or coagulation were observed during the test for both PAMgA 5 and PAMgA 40 hydrogels. Therefore, irritation score (IS) reported was zero for both hydrogels, so PAMgA polymer could be classified as non-irritant. Moreover, negative and positive controls fulfilled the requirements, as were classified as non- irritant and severe irritant respectively. These results are in accordance with previous biocompatibility studies performed by our group, were cytotoxicity of both hydrogels was studied by MTT colorimetric assay and flow cytometry analysis. Moreover, oral toxicity in vivo was tested in mice in two dose ranges, 10 to 500 mg/kg and high doses up to 10 g/kg. No signs of physiological alteration nor symptoms were observed in both studies (Cheddadi et al., 2011; Simancas-Herbada et al., 2020). All these, results suggest that PAMgA hydrogel could be classified as a nontoxic excipient for oral dosage forms.

6.5. *CONCLUSIONS*

PAMgA hydrogels can be classified as a non-irritant excipient for the formulation of matrix tablets for oral administration. Their behaviour in the digestive tract depends on their reticulation grade and the fluid with which they are in contact. On the one hand, the lower the degree of crosslinking, the less swelling but the greater erosion and greater bioadhesion. On the other hand, swelling and bioadhesion are more intense in contact with intestinal fluid than in contact with gastric fluid.

The reticulation grade and the in contact fluid also influence the release of hydrophobic drugs, as budesonide, from PAMgA tablets, being budesonide release in the gastric environment slower than in the intestinal environment. Indeed, 75% of the budesonide dose was released in a sustained manner between 4 and 20 hours when tablets elaborated from PAMgA 40, lactose 20% and SLS 2% were testing simulating changes in fluid composition throughout the digestive tract.

All these characteristics make these budesonide matrix tablets elaborated with this new poly (magnesium acrylate) hydrogel a good formulation for the treatment of inflammatory bowel diseases.

Funding: This work was supported by Complutense Research Fund (Ref. FEI16/83) and by the Complutense University UCM research group "Formulation and bioavailability of new drug products" (Ref. UCM-910939)

Conflicts of interest: The authors declare no conflict of interest.

6.6. *REFERENCES*

Alghamdi, A.A., Alsolami, A., Saeed, W.S., Al-Odayni, A.-B.M., Semlali, A., Aouak, T., 2018. Miscibility of poly(acrylic acid)/poly(methyl vinyl ketone) blend and in vitro application as drug carrier system. Des. Monomers Polym. 21, 145–162. https://doi.org/10.1080/15685551.2018.1521563

Batista-Duharte, A., Jorge Murillo, G., Pérez, U.M., Tur, E.N., Portuondo, D.F., Martínez, B.T., Téllez-Martínez, D., Betancourt, J.E., Pérez, O., 2016. The Hen's Egg Test on Chorioallantoic Membrane: An Alternative Assay for the Assessment of the Irritating Effect of Vaccine Adjuvants. Int. J. Toxicol. 35, 627–633. https://doi.org/10.1177/1091581816672187

Bendgude, T., Iyer, R., Sushi, S., 2010. The effects of lactose, microcrystalline cellulose and dicalcium phosphate on swelling and erosian of compressed HPMC matrix tablets. Iran. J. Pharm. Res. 9, 349–358.

Blanco-Fuente, H., Anguiano-Igea, S., Otero-Espinar, F.J., Blanco-Méndez, J., 1996a. In-vitro bioadhesion of carbopol hydrogels. Int. J. Pharm. 142, 169–174. https://doi.org/10.1016/0378-5173(96)04665-0

Blanco-Fuente, H., Vila-Dorrío, B., Anguiano-Igea, S., Otero-Espinar, F.J., Blanco-Méndez, J., 1996b. Tanned leather: A good model for determining hydrogels bioadhesion. Int. J. Pharm. 138, 103–112. https://doi.org/10.1016/0378-5173(96)04542-5

Campaña-Seoane, M., Peleteiro, A., Laguna, R., Otero-Espinar, F.J., 2014. Bioadhesive emulsions for control release of progesterone resistant to vaginal fluids clearance. Int. J. Pharm. 477, 495–505. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.10.066

Cascone, S., 2017. Modeling and comparison of release profiles: Effect of the dissolution method. Eur. J. Pharm. Sci. 106, 352–361. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.06.021

Cheddadi, M., López-Cabarcos, E., Slowing, K., Barcia, E., Fernández-Carballido, A., 2011. Cytotoxicity and biocompatibility evaluation of a poly(magnesium acrylate) hydrogel synthesized for drug delivery. Int. J. Pharm.

https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.04.042

Chuah, C., Wang, J., Tavakoli, J., Tang, Y., 2018. Novel bacterial cellulose-poly (acrylic acid) hybrid hydrogels with controllable antimicrobial ability as dressings for chronic wounds. Polymers (Basel). https://doi.org/10.3390/polym10121323

Fernández-Ferreiro, A., Fernández Bargiela, N., Varela, M.S., Martínez, M.G., Pardo, M., Piñeiro Ces, A., Méndez, J.B., Barcia, M.G., Lamas, M.J., Otero-Espinar, F., 2014. Cyclodextrin–polysaccharide-based, in situ-gelled system for ocular antifungal delivery. Beilstein J. Org. Chem. 10, 2903–2911. https://doi.org/10.3762/bjoc.10.308

Figueiras, A., Pais, A.A.C.C., Veiga, F.J.B., 2010. A comprehensive development strategy in buccal drug delivery. AAPS PharmSciTech. https://doi.org/10.1208/s12249-010-9546-1208/s12249-010-9546-1

Gareb, B., Dijkstra, G., Kosterink, J.G.W., Frijlink, H.W., 2019. Development of novel zero-order release budesonide tablets for the treatment of ileo-colonic inflammatory bowel disease and comparison with formulations currently used in clinical practice. Int. J. Pharm. 554, 366–375. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.11.019

Gareb, B., Eissens, A.C., Kosterink, J.G.W., Frijlink, H.W., 2016. Development of a zero-order sustained-release tablet containing mesalazine and budesonide intended to treat the distal gastrointestinal tract in inflammatory bowel disease. Eur. J. Pharm. Biopharm. 103, 32–42. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.03.018

Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM), 2010. Recommended Test Method Protocol : Hen ' s Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method. ICCVAM Test Method Eval. Rep. 13, B30–B38. https://doi.org/10.3390/ijms13089959

Irimia, T., Dinu-Pîrvu, C.E., Ghica, M.V., Lupuleasa, D., Muntean, D.L., Udeanu, D.I., Popa, L., 2018. Chitosan-based in situ gels for ocular delivery of therapeutics: A state-of-the-art review. Mar. Drugs 16. https://doi.org/10.3390/md16100373

Klein, S., 2010. The Use of Biorelevant Dissolution Media to Forecast the In Vivo Performance of a Drug. AAPS J. 12, 397–406. https://doi.org/10.1208/s12248-010-9203-3

Knoos, P., Svensson, A. V., Ulvenlund, S., Wahlgren, M., 2015. Release of a poorly soluble drug from hydrophobically modified poly (acrylic acid) in simulated intestinal fluids. PLoS One 10, 1–16. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140709

Kutyła, M.J., Boehm, M.W., Stokes, J.R., Shaw, P.N., Davies, N.M., McGeary, R.P., Tuke, J., Ross, B.P., 2013. Cyclodextrin-crosslinked poly(acrylic acid): Adhesion and controlled release of diflunisal and fluconazole from solid dosage forms. AAPS PharmSciTech. https://doi.org/10.1208/s12249-012-9903-3

Lafayette, W., 1989. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation 57, 169–172.

Li, J., Mooney, D.J., 2016. Designing hydrogels for controlled drug delivery. Nat. Rev. Mater. 1, 16071. https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.71

Lichtenstein, G.R., 2016. Budesonide Multi-matrix for the Treatment of Patients with Ulcerative Colitis. Dig. Dis. Sci. 61, 358–370. https://doi.org/10.1007/s10620-015-3897-0

Lim, L.S., Rosli, N.A., Ahmad, I., Mat Lazim, A., Mohd Amin, M.C.I., 2017. Synthesis and swelling behavior of pH-sensitive semi-IPN superabsorbent hydrogels based on poly(acrylic acid) reinforced with cellulose nanocrystals. Nanomaterials. https://doi.org/10.3390/nano7110399

Lokman, N.A., Elder, A.S.F., Ricciardelli, C., Oehler, M.K., 2012. Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay as an in vivo model to study the effect of newly identified molecules on ovarian cancer invasion and metastasis. Int. J. Mol. Sci. 13, 9959–9970. https://doi.org/10.3390/ijms13089959

Mackiewicz, M., Stojek, Z., Karbarz, M., 2019. Synthesis of cross-linked poly(acrylic acid) nanogels in an aqueous environment using precipitation polymerization: Unusually high volume change. R. Soc. Open Sci. https://doi.org/10.1098/rsos.190981

Marquardt, C., Matuschek, C., Bölke, E., Gerber, P.A., Peiper, M., Seydlitz-Kurzbach, J. V., Buhren, B.A., Van Griensven, M., Budach, W., Hassan, M., Kukova, G., Mota, R., Höfer, D., Orth, K., Fleischmann, W., 2010. Evaluation of the tissue toxicity of antiseptics by the Hen's Egg Test on the Chorioallantoic Membrane (HETCAM). Eur. J. Med. Res.

https://doi.org/10.1186/2047-783x-15-5-204

McKenzie, M., Betts, D., Suh, A., Bui, K., Kim, L.D., Cho, H., 2015. Hydrogel-based drug delivery systems for poorly water-soluble drugs. Molecules. https://doi.org/10.3390/molecules201119705

Mudie, D.M., Samiei, N., Marshall, D.J., Amidon, G.E., Bergström, C.A.S., 2020. Tutorial Selection of In Vivo Predictive Dissolution Media Using Drug Substance and Physiological Properties. AAPS J. 22, 1–13. https://doi.org/10.1208/s12248-020-0417-8

Nagra, U., Adnan, S., Shafqat, S., Shabbir, M., Ali, S., Zafar, A., Saeed Ul Hassan, S., Iqbal, J., 2019. Effect of sustained release polymers on drug release profile of aceclofenac tablets-physicochemical properties, analysis of kinetics and fit factor. Indian J. Pharm. Educ. Res. https://doi.org/10.5530/ijper.53.2s.49

Narayanaswamy, R., Torchilin, V.P., 2019. Hydrogels and their applications in targeted drug delivery. Molecules. https://doi.org/10.3390/molecules24030603

Nowak-Sliwinska, P., Segura, T., Iruela-Arispe, M.L., 2014. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. Angiogenesis 17, 779–804. https://doi.org/10.1007/s10456-014-9440-7

Palmeira-de-Oliveira, R., Monteiro Machado, R., Martinez-de-Oliveira, J., Palmeira-de-Oliveira, A., 2018. Testing vaginal irritation with the Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane assay. ALTEX 35, 495–503. https://doi.org/10.14573/altex.1710091

Pandey, P., Levins, C., Pafiakis, S., Zacour, B., Bindra, D.S., Trinh, J., Buckley, D., Gour, S., Sharif, S., Stamato, H., 2018. Enhancing tablet disintegration characteristics of a highly water-soluble high-drug-loading formulation by granulation process. Pharm. Dev. Technol. 23, 587–595. https://doi.org/10.1080/10837450.2016.1264416

Peppas, N.A., Bures, P., Leobandung, W., Ichikawa, H., 2000. Hydrogels in pharmaceutical formulations. Eur. J. Pharm. Biopharm. 50, 27–46. https://doi.org/10.1016/S0939-6411(00)00090-4

PubChem Compound Summary for CID 5281004, Budesonide [WWW Document], 2020. .

Natl. Cent. Biotechnol. Inf. URL https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Budesonide (accessed 8.22.20).

Simancas-herbada, R., Fern, A., Aparicio-blanco, J., Slowing, K., Rubio-retama, J., Enrique, L., Torres-su, A., 2020. Controlled Release of Highly Hydrophilic Drugs from Novel Poly (Magnesium Acrylate) Matrix Tablets. Pharmaceutics 12, 1–15. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020174

Vasile, C., Pamfil, D., Stoleru, E., Baican, M., 2020. New developments in medical applications of hybrid hydrogels containing natural polymers. Molecules. https://doi.org/10.3390/molecules25071539

Vertzoni, M., Dressman, J., Butler, J., Hempenstall, J., Reppas, C., 2005. Simulation of fasting gastric conditions and its importance for the in vivo dissolution of lipophilic compounds. Eur. J. Pharm. Biopharm. 60, 413–417. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2005.03.002

Wurm, F., Rietzler, B., Pham, T., Bechtold, T., 2020. Multivalent Ions as Reactive Crosslinkers for Biopolymers—A Review. Molecules 25, 1840. https://doi.org/10.3390/molecules25081840

Yan, Y., Wang, P., Li, R., Sun, Y., Zhang, R., Huo, C., Xing, J., Dong, Y., 2019. Synthesis of budesonide conjugates and their anti-inflammatory effects: A preliminary study. Drug Des. Devel. Ther. https://doi.org/10.2147/DDDT.S192348

Yehia, S.A., Elshafeey, A.H., Sayed, I., Shehata, A.H., 2009. Optimization of budesonide compression-coated tablets for colonic delivery. AAPS PharmSciTech. https://doi.org/10.1208/s12249-009-9188-3

Zhang, G., Bao, C., Fu, K., Lin, Y., Li, T., Yang, H., 2020. Synthesis, characterization, self-assembly, and irritation studies of polyglyceryl-10 caprylates. Polymers (Basel). 12. https://doi.org/10.3390/polym12020294

Zoeller, T., Klein, S., 2007. Simplified Biorelevant Media for Poorly Soluble Drugs 17728, 8–13.

7. DISCUSIÓN GENERAL

Durante los últimos años, la investigación en el campo del desarrollo de medicamentos se ha basado en la búsqueda de sistemas que permitan una liberación modificada de los principios activos tras su administración. La utilización de estas nuevas formulaciones busca conseguir una liberación sostenida de los principios activos considerados hidrosolubles, conseguir una liberación en el lugar de acción de acción del activo administrado, conseguir liberaciones constantes durante un tiempo determinado, minimizar los efectos secundarios de los principios activos o reducir el número de administraciones diarias en tratamientos crónicos, mejorando por tanto la adherencia al tratamiento de los pacientes.

Un ejemplo de estas formas farmacéuticas de liberación modificada son las elaboradas a partir de hidrogeles. Los hidrogeles se pueden definir como sistemas compuestos por uno o varios polímeros hidrófilos, naturales o sintéticos, con cadenas entrecruzadas por uniones físicas o químicas formando una red tridimensional. Esta naturaleza hidrófila es debido a que su estructura presenta grupos funcionales como –OH, -COOH, -$CONH_2$, -SO_3H, que en un ambiente acuso se hidratan; por tanto estos hidrogeles se caracterizan por ser capaces de albergar grandes cantidades de moléculas de agua o fluidos biológicos en su interior sin que se disuelva, debido al entrecruzamiento de las cadenas poliméricas, por este motivo mantienen su forma original aumentando de tamaño (Peppas et al., 2000).

Los polímeros derivados del ácido acrílico, de origen sintético, han sido ampliamente usados en la industria farmacéutica para la elaboración de diferentes formas farmacéuticas administradas por diferentes vías. Tanto el ácido acrílico como sus sales, poseen características que les hacen muy interesantes para la liberación modificada de fármacos como son: el hinchamiento, la bioadhesividad a tejidos y su biocompatibilidad (Mackiewicz et al., 2019; Sarkar et al., 2017; Simancas-herbada et al., 2020).

La búsqueda de un nuevo polímero hinchable derivado del ácido acrílico, dio lugar a una serie de investigaciones previas llevadas a cabo por el Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas de la UCM y que han sido punto de partida de la presente Tesis Doctoral. Según el método descrito por Rubio-Retama et al. se desarrolló un nuevo

polímero derivado del ácido acrílico, usando como materiales de partida una solución de hidróxido de magnesio ($Mg(OH)_2$) y ácido acrílico (CH_2=CHCOOH), para la síntesis del monómero de (acrilato de magnesio), al que nosotros hemos denominado AMgA. Esta primera etapa de síntesis, se lleva a cabo por una reacción de neutralización en la que el ácido acrílico reacciona con una solución de hidróxido de magnesio en agua bidestilada. En una etapa posterior se produce la homopolimerización del monómero (AMgA), mediante una reacción de polimerización a través de radicales libres, dando lugar al poli(acrilato de magnesio) al que nosotros denominaremos PAMgA. En esta reacción se pueden emplear cantidades diferentes de persulfato de amonio (PSA) como iniciador y TEMED como catalizador de la reacción.

La capacidad viscoelástica y de hinchamiento de este nuevo hidrogel fue previamente caracterizado en el trabajo publicado por Otegui et al. En este trabajo se evaluó el efecto de la concentración de monómero (AMgA) y PSA usado como iniciador de la reacción de polimerización. Se observó que en todas las concentraciones de monómero que estudiaron, 20 %, 30 % y 40 % (p/p); así como de iniciador 10 mM, 15 mM, 20 mM y 40 mM se llegó al equilibrio de hinchamiento tras aproximadamente 1 o 2 días. Estos autores comprobaron que el grado de hinchamiento es directamente proporcional a la concentración de monómero (AMgA), así como que un aumento en la concentración de PSA produce un aumento en el equilibrio de hinchamiento.

A partir de estos resultados obtenidos por Rubio-Retama et al., y teniendo en cuenta que se trata de un polímero con una síntesis sencilla y buenas propiedades de hinchamiento, el PAMgA se presenta como un buen candidato para ser empleado como excipiente en la elaboración de formas farmacéuticas, por ello, la presente tesis doctoral se ha centrado en el desarrollo de comprimidos de PAMgA de liberación prolongada para su administración por vía oral.

Para la utilización de un nuevo polímero como excipiente de formas farmacéuticas es fundamental su caracterización en diferentes aspectos. Por ello, en el capítulo 3 de la presente memoria, se recoge la síntesis del polímero PAMgA y su caracterización mediante técnicas analíticas. Este trabajo se ha realizado en colaboración con el Departamento de

Química en Ciencias Farmacéuticas de la universidad Complutense de Madrid. Además, en el capítulo se recogen los resultados de la evaluación del potencial irritante del polímero PAMgA, estudios de porosimetría, así como un estudio de los diferentes frentes de disolución de los comprimidos y ensayos de bioadhesion *in vitro* y *ex vivo* realizados en colaboración con el Departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Santiago de Compostela. Finalmente, se evaluó la biocompatibilidad a altas dosis del hidrogel administrado por vía oral, estos estudios fueron realizados con la colaboración del Departamento de Farmacología, Farmacognosia y Botánica de la Universidad Complutense de Madrid.

La síntesis del polímero se llevó a cabo en dos etapas, la elaboración del monómero AMgA y posteriormente la etapa de polimerización, a través de una reacción de radicales libres, dando lugar al hidrogel PAMgA. Este hidrogel se sintetizó en dos grados de reticulación, PAMgA 5 y PAMgA 40, usando concentraciones de 5mM y 40 mM de iniciador PSA, respectivamente. La concentración de iniciador es clave para realizar el entrecruzamiento de las moléculas de monómero AMgA en la reacción de polimerización tal y como menciona Otegui et al. en su trabajo. El entrecruzamiento entre las moléculas de monómero AMgA se produce por interacciones electrostáticas entre el magnesio (Mg^{2+}) y los grupos carboxílicos (COO^-) de las cadenas de ácido acrílico dando lugar a la red polimérica (Wurm et al., 2020b). Luo et al. evaluó el efecto del iniciador PSA en el desarrollo de un nuevo hidrogel derivado de la celulosa bacteriana injertada con ácido acrílico. En este trabajo observaron que la concentración de PSA tiene influencia en la capacidad de absorción de moléculas de agua del hidrogel. Cuando la concentración de iniciador y de radicales es baja, no se pudo formar la red polimérica de forma eficaz, debido a la falta de radicales libres para la polimerización. A medida que aumenta el iniciador, se generan más radicales libres que pueden reaccionar dando lugar a una red polimérica que contribuye a una mayor capacidad de captación de agua. Por el contrario, si esta concentración de PSA es demasiado elevada, puede dar lugar a un acortamiento intenso de las cadenas poliméricas reduciendo así el volumen libre disponible del hidrogel.

Por tanto, las diferentes cantidades de iniciador estudiadas, 5 mM y 40 mM, nos permite obtener dos tipos diferentes de hidrogel con distintos comportamientos físico-

químicos y con diferentes capacidades de hinchamiento. Los dos polímeros sintetizados se diferencian en la longitud de sus cadenas poliméricas: el polímero sintetizado con una concentración de 5mM de PSA (PAMgA 5), tendrá cadenas largas lineales de monómero de acrilato de magnesio entre los puntos de entrecruzamiento, y el polímero sintetizado con una concentración de 40 mM de PSA (PAMgA 40), tendrá una estructura más reticular, con mayor número de uniones entre las cadenas de monómero. Estas interacciones están estrechamente relacionadas con el pH, ya que los enlaces de hidrógeno sólo se forman cuando se protonan los grupos carboxílicos de las cadenas poliméricas. Al añadir carga a los grupos carboxílicos, estos aumentan su solubilidad en el medio, por lo que el polímero se extiende y se hincha, aumentando su viscosidad. Esto favorece la captación de agua entre las cadenas poliméricas, por tanto, el hinchamiento de los hidrogeles es dependiente del pH (Knoos et al., 2015). Este grado de reticulación confiere diferentes características a los hidrogeles, que serán evaluadas a lo largo de la presente tesis doctoral.

El rendimiento de la reacción de síntesis para ambos polímeros, PAMgA 5 y PAMgA 40, fue alto, aunque ligeramente mayor en el caso de PAMgA 40. Esta diferencia podría atribuirse al proceso de destilación; este proceso es necesario para la eliminación de impurezas del polímero como pueden ser: subproductos de la polimerización de ácido acrílico, monómeros AMgA que no han reaccionado o residuos de iniciador (PSA). PAMgA 5 posee una menor reticulación de la estructura del hidrogel (cadenas más largas entre los entrecruzamientos) y por tanto tiene mayor facilidad para desprender los extremos finales de las cadenas de ácido acrílico.

Con respecto al análisis DSC realizado, PAMgA 5 y PAMgA 40 no mostraron diferencias en los termogramas, por lo que podemos sugerir que el grado de reticulación del polímero no es un factor clave en el comportamiento térmico del hidrogel PAMgA (resultados en el capítulo 3). En nuestro estudio, no se detectaron eventos térmicos entre los – 90ºC y los 250 ºC, lo que nos asegura que el estado del polímero se mantiene inalterado durante la elaboración de los comprimidos matriciales por compresión, así como durante la permanencia del comprimido en el tracto gastrointestinal después de la administración oral. Como indica Mc Neill et al. en sus estudios, el comportamiento de la degradación de los poliacritalos de sodio y de potasio se puede explicar en dos reacciones:

reacciones de escisión de la cadena principal y de los grupos laterales acompañadas de la transferencia intermolecular de radicales, por lo que los radicales escindidos de las cadenas principales pueden dar lugar a dímeros, o incluso monómeros. La reacción principal de escisión de estos poliacrilatos da lugar a óxidos del metal del polímero, monóxido de carbono y dióxido de carbono (McNeill and Sadeghi, 1990). Hetper y colaboradores investigaron la temperatura de descomposición de los poliacrilatos metálicos en un rango de temperatura de 25 – 600 ºC. Estos autores indicaron que la temperatura máxima de descomposición de los poliacrilatos de magnesio era de 460 ºC descomponiendo el polímero en óxido de magnesio (Hetper et al., 1981).

Los espectros obtenidos mediante FTIR y RAMAN son superponibles para ambos grados de reticulación (figuras 3.5 y 3.6 representadas en el capítulo 3). En estos espectros se observaron los picos característicos del ácido acrílico, un pico amplio en la región 3550–2500 cm-1 que se atribuye a las vibraciones de estiramiento –OH de los grupos carboxílicos, así como a la interacción molecular por enlaces de hidrogeno con el grupo hidroxilo entre 3500 – 3250 cm-1 (Chuah et al., 2018; Shaik et al., 2016).

Para llevar a cabo algunos de los estudios de caracterización, se elaboraron comprimidos inertes (PAMgA 5 y PAMgA 40) de 200 mg de peso, 9 mm de diámetro y superficie plana. Estos comprimidos mostraron una alta resistencia mecánica, sin tendencia al decapado y buenas propiedades de compresión.

Las imágenes obtenidas por SEM no mostraron diferencias en la estructura interna de los comprimidos elaborados con ambos polímeros, PAMgA 5 y PAMgA 40 (Figura 7.1). Con el fin de entender la estructura interna de los comprimidos elaborados con PAMgA se llevaron a cabo los estudios de porosimetría por intrusión de mercurio. Esta técnica se basa en la intrusión de mercurio dentro de una estructura porosa mediante gradientes de presión (bajas y altas presiones). El mercurio es considerado como el mejor liquido no humectante (ángulo de contacto de 140 º) por lo que no entra por capilaridad en los poros sino mediante aplicación de presión que se puede relacionar directamente con el tamaño de los mismos (Lui, Chun; Lewin Mejia, Daniela; Chiang, 2018).

Los estudios de porosimetría, mostraron diferencias en la porosidad de los comprimidos elaborados con ambos polímeros obteniendo un valor de 5,30 % en el caso de PAMgA 5 y un 20,50 % en los comprimidos elaborados con PAMgA 40. Esta diferencia en porosidad de los comprimidos se pudo observar mediante la representación gráfica en 3D obtenida a partir del software PoreXpert®, en la que se modelan las curvas acumulativas de volumen de intrusión de mercurio a las diferentes presiones aplicadas. El software representa el espacio poroso de la muestra como una serie de celdas idénticas interconectadas. Cada poro se presenta como un cubo, conectados entre sí por pequeños poros cilíndricos denominados accesos de poros (Cutrín-Gómez et al., 2018a; Nogueiras-Nieto et al., 2011).

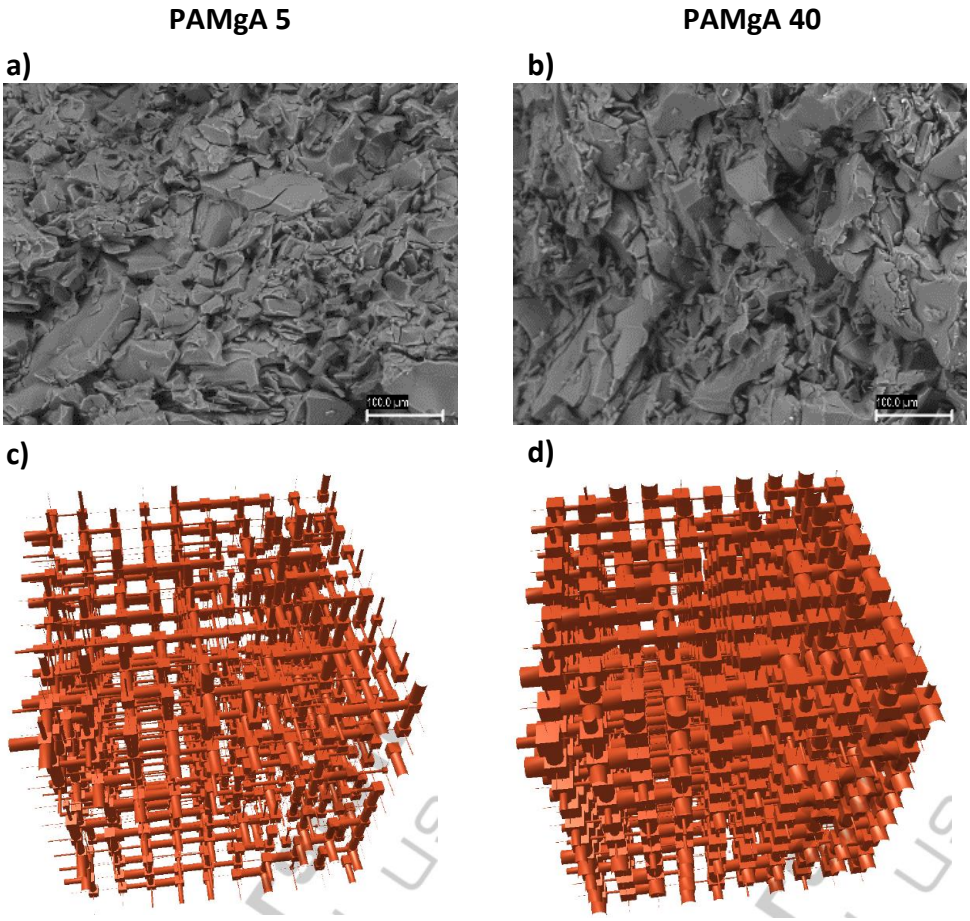


Figura 7.1: Imágenes SEM de un corte transversal de los comprimidos elaborados con PAMgA 5 y PAMgA 40 (a y b respectivamente). Representación gráfica de la estructura porosa de los polímeros c) PAMgA 5 y d) PAMgA 40 mediante el software PoreXpert®.

El grado de correlación, información que ofrece el software, indica que cuando los valores son cercanos a 0, se trata de una estructura aleatoria, mientras que los resultados cercanos a 1 representa una estructura organizada. En nuestro caso los resultados fueron cercanos a 0 (0,147 para PAMgA 5 y 0,230 para PAMgA 40) por lo que podemos asegurar que la distribución de poros de los polímeros son consecuencia de una estructura aleatoria y no homogénea (Cutrín-Gómez et al., 2018b). Por último, la predicción revela el porcentaje de solvente embebido por los polímeros en su estructura porosa. Esta captación de agua se ve influenciada por la estructura de los poros y las interconexiones entre ellos, por lo que los comprimidos elaborados con PAMgA 40 presenta un mayor porcentaje de captación de agua (98,89 %) debido al mayor número de poros y de interconexiones presentes en su estructura, como se muestra en la figura 7.1. Estos resultados en captación de fluidos junto con los resultados de porosidad están en concordancia con los valores obtenidos en permeabilidad, siendo estos mayores en el caso de PAMgA 40 (10,97 mD). La permeabilidad se define como la capacidad que tiene un material al paso de un fluido a través de su estructura, es por ello que el volumen de poro, así como las interconexiones entre los poros que presenta los comprimidos elaborados con PAMgA 40 hacen que sean más permeables a la entrada de fluidos.

Una característica importante para el desarrollo de comprimidos matriciales para administración por vía oral, es su comportamiento con los diferentes medios de disolución. En este sentido, para evaluar el comportamiento de los comprimidos elaborados con el polímero PAMgA, se realizaron estudios morfológicos sobre los frentes de disolución que se forman tras el contacto con estos medios. Se seleccionaron medios biorrelevantes a diferentes pH para asemejar las condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal, dado que hemos sintetizado un nuevo polímero derivado del ácido acrílico y no existen estudios de cesión o adhesión con este polímero. Los tampones acuosos descritos por las farmacopeas se pueden utilizar para reflejar las condiciones de pH en el estómago o el intestino delgado, pero no tienen en cuenta otros aspectos de la composición de los fluidos biológicos como son: la osmolaridad, fuerza iónica, viscosidad o la tensión superficial. Estas características pueden ser relevantes para la liberación de principios activos a partir de la forma farmacéutica administrada (Klein, 2010; Mudie et al., 2020).

El fluido gástrico está compuesto por la saliva y secreciones gástricas. Para el medio FaSSGF, se utiliza ácido clorhídrico, sales biliares y enzimas como la pepsina, todo ello ajustado a un pH 1,2. La concentración de iones hidrogeno afecta el pH, y por tanto la disolución de algunos fármacos ionizables. La pepsina por su parte puede interferir en la estabilidad de proteínas y péptidos. El medio FaSSIF se utilizó para simular las condiciones fisiológicas del intestino delgado próximo. Este medio contiene taurocolato sódico, seleccionado como el compuesto más representativo de las sales biliares. Las sales biliares y fosfolípidos (lecitina) pueden combinarse para dar lugar a micelas mixtas, las cuales pueden mejorar la solubilidad de fármacos poco solubles. Estas micelas por su parte son capaces de disminuir la tensión superficial del medio y así mejorar la humectación de los fármacos poco solubles, facilitando la penetración del medio de disolución a través de los poros de la estructura matricial del comprimido y acelerando la disolución del fármaco (Jantratid et al., 2008; Vertzoni et al., 2005).

En el estudio de los frentes de disolución de los comprimidos en ambos medios biorrelevantes seleccionados, FaSSGF y FaSSIF, descrito en el capítulo 3, se observa que, en fluido a pH acido, los comprimidos muestran claramente los diferentes frentes, mientras que en medio FaSSIF (pH 6,8) esta diferenciación no se puede apreciar (figura 7.2).

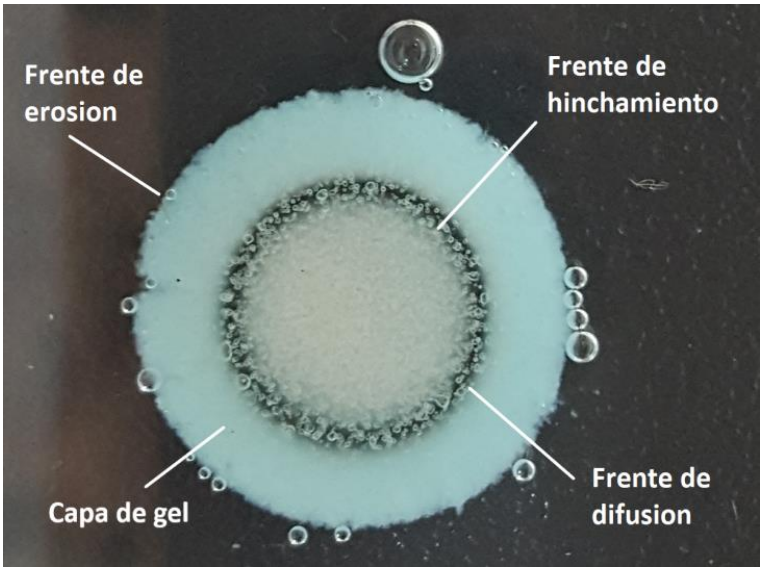


Figura 7.2: Imagen de un comprimido de PAMgA 40 en medio FaSSGF a pH 1.2 tras 24 horas en contacto con el medio de disolución.

Macroscópicamente se define “frente” como la posición en la matriz en la que las condiciones cambian drásticamente (Maderuelo et al., 2011):

- El frente de hinchamiento: (transición de la región vítrea del polímero): este frente se forma entre el núcleo seco del comprimido y la capa de gel que se forma al albergar moléculas de fluido entre sus cadenas. Este frente se puede observar, en los comprimidos elaborados con PAMgA 5 y PAMgA 40, claramente después de 1 h en contacto con el medio de liberación. El frente se va moviendo hacia dentro hasta que no es posible encontrar un núcleo interior, tal y como muestran los resultados obtenidos, llegando a un valor de -1,048 mm en los comprimidos elaborados con PAMgA 5 y un -0,673 en los elaborados con PAMgA 40.

- El frente de difusión: se encuentra entre la zona hinchada del hidrogel y el frente de erosión. Este frente separa la zona donde el principio activo se encuentra en estado sólido, de la zona en la que el activo ya se ha disuelto en la capa de gel. El frente se va moviendo hacia el interior del polímero a medida que este se va hidratando; es casi inapreciable en comprimidos con fármacos muy solubles, ya que cuando este entra en contacto con el medio de cesión se disuelve. En el caso de fármacos poco solubles, el frente de difusión puede moverse hacia el exterior, debido a que las partículas insolubles de activo pueden trasladarse como consecuencia del hinchamiento del hidrogel y, de este modo, ser visible (Colombo et al., 2000, 1999). El movimiento de este frente en los ensayos realizados, es muy similar y constante en ambos polímeros, siendo ligeramente superior en los comprimidos elaborados con PAMgA 5 (1,70 mm).

- El frente de erosión: aparece entre la capa de gel y el medio de disolución. Este frente desaparece a lo largo del proceso de erosión de la matriz polimérica. El frente de erosión es claramente visible y, a medida que aumenta el volumen de agua en el comprimido, se va difuminando y moviéndose hacia el exterior del mismo. El movimiento del frente de erosión en PAMgA 5 fue mucho más pronunciado llegando a un valor de 7,83 mm con respecto a los 5,53 mm de los comprimidos de PAMgA

40. Esto puede ser debido a que es más sencillo el desprendimiento de las cadenas de polímero cuando el comprimido esta hinchado, produciendo la erosión del mismo.

- La capa de gel: esta capa se origina cuando las matrices poliméricas entran en contacto con el medio acuoso, y se produce una relajación de las cadenas poliméricas.

Otras de las características de los hidrogeles estudiadas es la bioadhesion que presentan ciertas macromoléculas, sintéticas o biológicas. La bioadhesión es la capacidad de adherirse a los tejidos del organismo. Gracias a la naturaleza viscosa de la capa de gel, que se forma cuando el polímero entra en contacto con el medio, es posible que el comprimido pueda adherirse a un tejido biológico, principalmente a las mucosas. Este tipo de unión a la mucosa que recubre los tejidos biológicos se denomina mucoadhesión. La interacción entre los materiales mucoadhesivos y la membrana mucosa se realiza en dos etapas: a) etapa de contacto: donde se produce un contacto íntimo (humectación) entre el hidrogel y la mucosa y b) etapa de consolidación: en la que se producen varias interacciones fisicoquímicas, para consolidar y fortalecer la unión adhesiva, dando lugar a una unión duradera (Smart, 2005).

La capacidad mucoadhesiva de los excipientes de formas farmacéuticas tiene un gran interés en el desarrollo de comprimidos, ya que permite diseñar formulaciones que buscan diferentes objetivos: conseguir una liberación y/o absorción del fármaco en el lugar de acción para de este modo aumentar la biodisponibilidad de algunos principios activos o aumentar el tiempo de contacto en mucosas para formular sistemas de liberación prolongada entre otros.

Una de las características que presentan los hidrogeles compuestos por ácido poliacrílico es que poseen la capacidad de adherirse a tejidos biológicos. El fenómeno de la bioadhesión o mucoadhesión se produce por la interacción de las cadenas poliméricas con las glicoproteínas de la mucosa, permitiendo un contacto íntimo entre el hidrogel y el tejido, pudiendo así aumentar la absorción de fármacos o aumentar los intervalos de dosificación,

lo que supone un beneficio sobre las formas de administración oral tradicionales (Calixto et al., 2015; Hiorth et al., 2014; Kutyła et al., 2013).

Por ello, se realizaron ensayos de bioadhesion tomando como sustrato piel curtida de cabra, siguiendo el método desarrollado por Blanco-Fuente et al. y mejorado por Campaña-Seoane et al. Se utilizó un texturómetro que permite la evaluación del tiempo de retención de los comprimidos con el sustrato, mediante el análisis de parámetros como el trabajo de adhesión o la fuerza de desprendimiento. El trabajo máximo de adhesión en la piel curtida se observó en medio FaSSGF, con comprimidos elaborados con PAMgA 5 (1,04 ± 0,10 mJ) usando como sustrato la piel curtida. El uso del valor del trabajo de bioadhesion sugiere una mejor respuesta para el cálculo de la fuerza de desprendimiento, ya que muestra la energía necesaria para el proceso de separación de las superficies adhesivas (comprimido y sustrato). En todos los ensayos, se pudo observar un mayor valor de trabajo de los comprimidos elaborados con PAMgA 5 con respecto a los elaborados con PAMgA 40. Esto es debido a un mayor estiramiento de las cadenas poliméricas de PAMgA 5, ya que, a medida que se aumenta la reticulación del polímero este tiende a disminuir la bioadhesividad, debido a la movilidad de las cadenas poliméricas y a los cambios en su densidad. Cuando el hidrogel entra en contacto con el sustrato, las cadenas poliméricas difunden creando enlaces, por lo que el trabajo necesario para desprender el comprimido aumenta. Por otro lado, la flexibilidad en las cadenas del polímero da lugar a una mayor y más profunda penetración del polímero con el sustrato por lo que se crea una unión más fuerte (Blanco-Fuente et al., 1996a).

Por otro lado, los resultados en el trabajo de adhesión en los ensayos llevados a cabo con exceso de medio en piel curtida fueron significativamente menores que los obtenidos con limitación del medio obtenido el valor máximo con los comprimidos elaborados con PAMgA 5 en FaSSGF (0,50 ± 0,05 mJ). Estos resultados, usando piel curtida como sustrato en las dos condiciones experimentales, sugieren que el polímero en una superficie de baja hidratación (contacto directo con el sustrato – 25 µL), no se hincha y muestra una respuesta mayor (trabajo de bioadhesion) que en la superficie hidratada (piel curtida con exceso de medio). Por otro lado, un exceso de medio también influye en la adhesión del polímero por lo que se puede ver reducido su trabajo de bioadhesion (da Silva et al., 2018). En medio

FaSSIF, las cadenas poliméricas se encuentran ionizadas con grupos COO-, lo que da lugar a una mayor captación de moléculas del medio en su estructura, esto tiene como consecuencia un mayor hinchamiento del comprimido, por lo que el trabajo de adhesión requerido para desprender el comprimido es menor que a pH acido.

El epitelio que rodea el tracto gastrointestinal es húmedo, dinámico y resbaladizo, limitando esta capacidad de adherencia de los hidrogeles a su estructura. Los hidrogeles derivados del ácido poliacrílico son conocidos por formar enlaces de hidrógeno con la mucosa, estas uniones deben estar en un rango de magnitud que permita la adherencia de los comprimidos a la mucosa gastrointestinal, sin dañar el revestimiento al desprenderse (Campaña-Seoane et al., 2014). Para comparar las pruebas realizadas in vitro y ex vivo, se utilizaron las mismas condiciones de análisis: velocidad de la sonda 1 mm/s; fuerza 50 N y tiempo de contacto 60 segundos. Utilizando los mismos parámetros, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los análisis realizados en piel curtida con exceso de medio y los ensayos ex vivo con mucosa gástrica porcina (figura 7.3), por lo que nos sugiere que el método desarrollado por Blanco-Fuente et al. usando piel curtida como sustrato modelo da lugar a valores de bioadhesion similares a los obtenidos en ensayos in vivo.

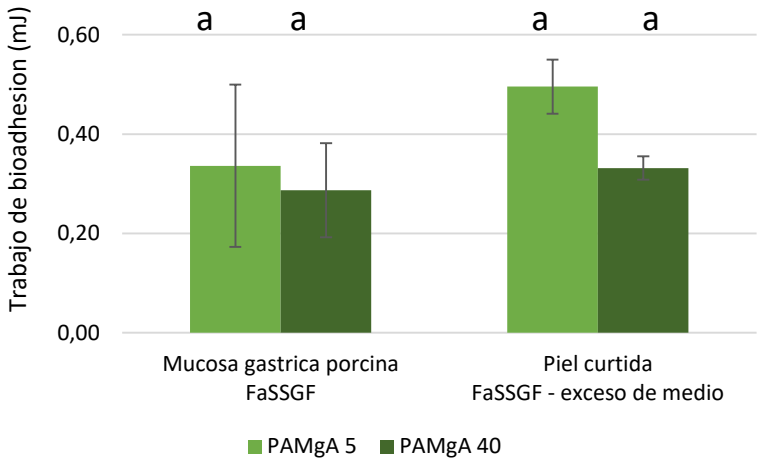


Figura 7.3: Trabajo de bioadhesion obtenido en los ensayos *ex vivo* usando mucosa gástrica porcina y piel curtida con exceso de medio FaSSGF (pH 1,2). Las letras (a) representan la ausencia de diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los ambos sustratos.

Los resultados obtenidos de los ensayos ex vivo realizados en mucosa gástrica porcina y duodeno proximal porcino, sugieren una adhesión a la mucosa intestinal de los comprimidos elaborados con PAMgA administrados por vía oral. Por ello podemos indicar que ambos polímeros son mucoadhesivos y capaces de aumentar el tiempo de transito gastrointestinal, siendo mayor la bioadhesión de PAMgA 5, especialmente a nivel gástrico y duodenal proximal.

Adicionalmente se realizaron ensayos de mucoadhesión en mucosa vaginal bovina (resultados en el capítulo 3), ya que puede considerarse una vía interesante para la administración de este polímero. Un factor importante para la administración vaginal es que, una vez se aplica la formulación, esta entra en contacto con una serie de fluidos originados en la vagina (exudados vaginales), así como de zonas más altas como el moco cervical o secreciones del endometrio que poseen diferentes características. Aunque los resultados obtenidos son muy prometedores, sugiriendo una posible nueva vía de administración del polímero PAMgA, esto deberá ser estudiado más en profundidad en futuros ensayos.

Una de las características más importantes que deben presentar los excipientes de uso farmacéutico es ser inocuo para la vía de administración que se emplee. En el caso de los excipientes mucoadhesivos, resulta especialmente interesante conocer su capacidad irritante. Para conocer el potencial irritante del polímero PAMgA se usó el test de la membrana corioalantoidea (HET-CAM), descrito en el capítulo 3. Se trata de un método de manejo sensible, económico y sencillo que utiliza huevos fertilizados de gallina, con el fin de evaluar el potencial irritante de formulaciones e ingredientes activos, en las primeras etapas del desarrollo de productos (Nowak-Sliwinska et al., 2014). Esta técnica es ampliamente utilizada para la evaluación de diferentes formas farmacéuticas como emulsiones vaginales (Palmeira-de-Oliveira et al., 2018), vacunas (Batista-Duharte et al., 2016), soluciones antisépticas tópicas y pomadas (Marquardt et al., 2010), geles oculares (Irimia et al., 2018) o formulaciones cosméticas (Zhang et al., 2020). Por lo tanto, la técnica

de HET-CAM ofrece un paso intermedio a los ensayos in vivo para la caracterización de excipientes y activos, proporcionando un buen enfoque en los ensayos preclínicos.

En nuestro estudio, no se observaron signos de hemorragia, lisis vascular o coagulación con ninguno de los grados de reticulación testados, PAMgA 5 y PAMgA 40. De este modo, la puntuación del índice de irritación (IS) obtenida fue cero para ambos hidrogeles, por lo que es posible clasificar al polímero PAMgA como no irritante.

Estos resultados están en línea con los estudios previos que fueron realizados por nuestro grupo de investigación. En este estudio se evaluó la citotoxicidad del polímero PAMgA, en cultivos celulares de fibroblastos. Se empleó la técnica de MTT, para los estudios de citotoxicidad del polímero incorporado en polvo al cultivo (contacto directo) y, MTT y citometría de flujo, para los ensayos de citotoxicidad en los que el polímero se incorporó como hidrogel en PBS (contacto indirecto). Ambos polímeros mostraron buena compatibilidad celular, aunque los resultados fueron ligeramente peores con el polímero sintetizado con 5 mM de PSA (PAMgA 5 o PAMgA LC), obteniendo un descenso del 20 - 25% en el número de células viables (fibroblastos), tras 48 horas de incubación. Este descenso en el número de células pudo ser debido a las diferencias en la viscosidad de ambos polímeros. Los resultados de los ensayos indirectos de MTT y la citometría de flujo mostraron baja citotoxicidad de ambos polímeros, PAMgA 5 (L-C-PAMgA) y PAMgA 40 (S-C-PAMgA). (Cheddadi et al., 2011)

Adicionalmente, en el mismo trabajo del grupo de investigación, se llevaron a cabo estudios de biocompatibilidad *in vivo* del polímero PAMgA 5 (LC) y PAMgA 40 (SC) administrados por diferentes vías: vía subcutánea, vía intraperitoneal y vía oral a bajas concentraciones. Para evaluar la compatibilidad del PAMgA, tras la administración subcutánea de los hidrogeles, (5 y 20 mg/Kg), se realizó un ensayo de inflamación empleando el modelo de ratón de edema subplantar inducido con carragenina. En el estudio, se pudo observar una fuerte reacción de inflamación (fase aguda) que empieza a disminuir a los 6 días, pero continuó durante todo el tiempo que duro el ensayo (1 mes), tras la administración de ambos polímeros. El proceso de inflamación, parece ser debido a a las reacciones que se desencadenan para prevenir el daño tisular, encapsular y destruir el material causante de la inflamación y proceder a la regeneración tisular. Además, durante

la fase de inflamación crónica, se produce la proliferación de fibroblastos y macrófagos, por lo que, si el estímulo no es retirado, puede derivar en granuloma con inflamación intensa y acumulación de macrófagos activos y linfocitos. (Fehrenbacher et. al, 2012). Se observó que el polímero sintetizado con 5 mM de PSA presenta mayor respuesta inflamatoria crónica; esta mayor respuesta puede ser debida a su mayor bioadhesion a los tejidos y a la imposibilidad de su eliminación. Por lo que la administración subcutánea de los polímeros L-C-PAMgA (PAMgA 5) y S-C-PAMgA (PAMgA 40) presenta muy baja biocompatibilidad por vía subcutánea.

Tras la administración del polímero PAMgA por vía intraperitoneal, se observó una respuesta grave y dosis dependiente, dando lugar a un 20% de muerte en los animales que recibieron una dosis de 20 mg/Kg y de un 60% al administrar una dosis de 80 mg/Kg. Se pudieron observar hemorragias generalizadas en hígado, tal y como describe Cheddadi et al. en su publicación, estos resultados pueden ser atribuidos a desajustes electrolíticos causada por acumulación del polímero, así como un malfuncionamiento cardiaco y neuromuscular que pueden causar la muerte.

Por último, Cheddadi et al. llevaron a cabo estudios de toxicidad tras la administración oral de dosis bajas del polímero (10, 100 y 500 mg/Kg). Ambos polímeros testados, PAMgA 5 (L-C-PAMgA) y PAMgA 40 (S-C-PAMgA), fueron bien tolerados por los animales. No se producen cambios significativos en el peso de los animales, a lo largo del ensayo y, no aparecen síntomas de inquietud, chirridos, falta de movilidad o trastornos gastrointestinales. Además, no se encontraron cambios fisiológicos en la inspección de los órganos (hígado, intestino, estomago, bazo, riñones y pulmón) tras la eutanasia de los animales. Por tanto, se puede indicar que el PAMgA no presenta toxicidad por vía oral a estas dosis.

Partiendo de los buenos resultados de biocompatibilidad tras la administración del polímero PAMgA por vía oral a dosis bajas (10 a 500 mg/Kg), se evaluó la toxicidad in vivo en un rango de concentraciones elevadas, entre 1 y 10 g/Kg de polímero, con el fin de obtener una respuesta toxica aguda. En este caso, se administró el polímero al estado sólido y conjuntamente con la alimentación. En ninguna de las dosis administradas se observaron

signos de toxicidad, no se detectaron cambios en el peso corporal, ni en el consumo de alimentos y no se notificaron síntomas (inquietud, chirridos, falta de movilidad o vómitos) en los animales. Únicamente se pudo observar diarrea en algunos animales pertenecientes al grupo de la dosis más alta (10 g/Kg). Sin embargo, la diarrea podría atribuirse a un efecto osmótico del polímero, presente en grandes cantidades en las heces, en lugar de a una irritación química del intestino causada por el polímero, ya que los resultados de HET-CAM categorizan el polímero PAMgA como no irritante. El análisis morfológico de los órganos (estomago, intestino, hígado, bazo, pulmones y riñones), después de la eutanasia del animal, no mostró ninguna alteración visible, se observó especialmente el estómago y el intestino que mostraron una mucosa intacta. Sarkar et al. evaluaron la toxicidad de un polímero mucoadhesivo derivado de poli(ácido acrílico) (PAAc-g-GG) (Sarkar et al., 2017). En sus investigaciones detectaron que cuando la DL50 es superior a 2 g/kg, la sustancia se puede clasificar como no tóxica. En nuestro estudio, la dosis máxima administrada fue de 10 g/kg del polímero, claramente superior a la administrada por Sarkar et al., y ninguno de los animales murió durante el estudio.

Todos estos resultados sugieren que el polímero PAMgA es una sustancia no toxica adecuada para su administración por vía oral. Además, ha mostrado no ser citotóxico en cultivos celulares de fibroblastos; no ser irritante sobre las mucosas gástrica e intestinal; y no toxico tras su administración en dosis elevadas, por lo que podemos indicar que presenta una buena biocompatibilidad para esta vía de administración.

Por otro lado, la capacidad de hinchamiento que presentan los hidrogeles PAMgA, junto con sus propiedades bioadhesivas hacen de estos polímeros unos buenos candidatos para ser empleados como excipientes en la elaboración de formas farmacéuticas de liberación modificada para administración oral.

El uso del polímero PAMgA como excipiente de comprimidos matriciales de liberación modificada, se detalla en los capítulos 5 y 6 de la presente Tesis Doctoral. Para ello se seleccionaron dos principios activos que se diferencian en su solubilidad:

- Hidrocloruro de Metformina - como ingrediente activo hidrofilíco con alta solubilidad en medios acuosos: solubilidad en agua es de 200 mg/mL a una temperatura de 25ºC.
- Budesonida - como principio activo lipofílico de baja solubilidad en medios acuosos: su solubilidad a pH fisiológico es de 20 µg/mL.

Previamente, para cuantificar los principios activos cedidos en los estudios de disolución de los comprimidos matriciales desarrollados, se han puesto a punto los procedimientos analíticos necesarios en los medios biorrelevantes previamente seleccionados, para ambos principios activos (resultados descritos en el capítulo 4 de la presente tesis doctoral).

El método desarrollado para la metformina clorhidrato fue por espectrofotometría UV. El análisis de la falta de ajuste realizado indica que el modelo seleccionado para el análisis de datos es adecuado para ambos medios biorrelevantes estudiados, FaSSGF y FaSSIF, con un límite de confianza del 95%, por lo que podemos asegurar que la relación que existe entre las dos variables, absorbancia y la concentración de metformina, es lineal y proporcional en un intervalo de concentraciones de 10 - 50 µg metformina/mL en medio biorrelevante a pH 1,2 (FaSSGF) y en un intervalo de 2 – 12 µg metformina/mL en medio biorrelevante a pH 6,8 (FaSSIF). El método por espectrofotometría resultó ser exacto en ambos medios. Finalmente se comprobó que no existe ninguna interferencia entre los medios de disolución y el analito.

Por otro lado, la budesonida presenta una elevada liposolubilidad, con valores de Log P (budesonida) = 1,94 y de solubilidad en agua ≈20 µg/mL recogidos en la bibliografía (Bandi et al., 2004; “PubChem Compound Summary for CID 5281004, Budesonide,” 2020), por lo que fue necesario incluir un tensioactivo en los medios de cesión, para poder mantener condiciones sink durante los ensayos de disolución in vitro. Inicialmente se hicieron estudios de solubilidad con Tween 80 como tensioactivo, pero el uso de este tensioactivo se descartó, ya que presentaba picos de absorción a la misma longitud de onda que la budesonida (λ 246 nm), por lo que el activo no era cuantificable en presencia de este tensioactivo. Finalmente, se empleó lauril sulfato sódico (LSS) como solubilizante, eligiendo

la concentración necesaria en base a un estudio de solubilidad llevado a cabo a 37 ºC en ambos medios biorrelevantes (Tabla 4.7).

Para cuantificar la budesonida en los diferentes medios biorrelevantes seleccionados, FaSSGF y FaSSIF, se ha puesto a punto un método analítico por espectrofotometría UV. El análisis de la falta de ajuste realizado, con los resultados por espectrofotometría UV, indica que el modelo seleccionado para el análisis de datos es adecuado para ambos medios biorrelevantes estudiados, FaSSGF y FaSSIF, con un límite de confianza del 95%, por lo que podemos asegurar que la relación que existe entre las dos variables, absorbancia y la concentración de budesonida, es lineal y proporcional en un intervalo de concentraciones de 5 - 30 µg budesonida/mL en ambos medios a pH 1,2 (FaSSGF) y a pH 6,8 (FaSSIF). El método por espectrofotometría resultó ser exacto en ambos medios. Finalmente se comprobó que no existe ninguna interferencia entre los medios biorrelevantes y el analito. Sin embargo, con este método analítico por espectrofotometría UV, no fue posible la lectura de las muestras de cesión in vitro de los comprimidos de budesonida en los medios de disolución, dado que el rango de concentraciones validado por espectrofotometría UV era de 5 – 30 µg/mL y la dosis terapéutica de budesonida son 9 mg/día (cantidad máxima en el vaso de cesión 9 µg/mL).

Por ello fue necesario poner a punto un método analítico por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), para cuantificar la budesonida en un rango de concentraciones menor, que permita evaluar la liberación del fármaco en las fases iniciales del ensayo. Con este método, también se comprobó que la concentración seleccionada de LSS para adicionar a los medios de cesión por espectrofotometría UV era la correcta para este rango de concentraciones (Tabla 4.8).

En todos los ensayos de cesión de comprimidos de budesonida realizados, la adición de lauril sulfato sódico al 0,5 % fue suficiente para solubilizar el principio activo y mantener las condiciones sink (20 % del coeficiente de solubilidad), utilizando un volumen de medio de cesión que diera lugar a concentraciones por encima del límite de cuantificación del método analítico. La disolución completa de la budesonida se consiguió a los 30 minutos en FaSSGF y a los 45 minutos en medio FaSSIF.

El límite de cuantificación de la budesonida fue de 0,1407 µg/mL en medio FaSSGF y de 0,2877 µg/mL en FaSSIF. El análisis de la falta de ajuste realizado para la cuantificación de la budesonida por HPLC indica que el modelo seleccionado para la cuantificación es adecuado para ambos medios biorrelevantes estudiados, FaSSGF y FaSSIF, con un límite de confianza del 95%, por lo que podemos asegurar que la relación que existe entre las dos variables, área bajo la curva y la concentración de budesonida, es lineal y proporcional en un intervalo de concentraciones de 0,5 - 11 µg/mL, en ambos medios biorrelevantes a pH 1,2 (FaSSGF) y a pH 6,8 (FaSSIF). El método por HPLC también resultó ser exacto en ambos medios. Por último, el método desarrollado por HPLC resultó ser selectivo para el activo, ya que no se observaron interferencias con los picos cromatógrafos de los medios biorrelevantes.

En el capítulo 5 de la presente memoria se lleva a cabo la elaboración de comprimidos matriciales con los polímeros PAMgA 5 y PAMgA 40 usando como principio activo metformina. La metformina es un hipoglucemiante oral, muy soluble, que presenta una baja potencia y una semivida plasmática corta de aproximadamente 2 h. En consecuencia, se utiliza en terapéutica a dosis elevadas e intervalos de dosificación cortos. Las dosis habituales varían entre 500 y 1000 mg y deben administrarse de 2 a 3 veces al día. Por este motivo, este fármaco ampliamente utilizado en terapéutica, es un buen candidato para la elaboración de comprimidos matriciales de liberación prolongada.

La metformina hidrocloruro es una molécula pequeña (peso molecular de 165,62 g/mol de los cuales 129,16 g/mol corresponden a metformina base) que se clasifica como fármaco altamente soluble en agua y de disolución muy rápida, con toda la dosis disuelta en menos de 15 min a pH 1,2; pH 4,5 y 6,8. Estas características hacen especialmente difícil lograr la liberación prolongada de este medicamento a partir de comprimidos elaborados con matrices hidrófilas (hidrogeles).

Se prepararon comprimidos matriciales con ambos polímeros sintetizados, PAMgA 5 y PAMgA 40, que contenían una dosis de 500 mg de metformina HCl. Debido al alto porcentaje de metformina dentro de la formulación (consecuencia de su alta dosis

terapéutica), los comprimidos obtenidos por compresión directa de la mezcla fármaco-polímero (F1 y F2) presentan una baja resistencia mecánica y tendencia a la obstrucción. Por tanto, previamente se granuló la metformina con NaCMC como aglutinante, para obtener dos formulaciones de comprimidos (F3 y F4), lo que facilitó la compresión de la mezcla con el polímero y mejoró la resistencia mecánica de los mismos.

Se utilizaron medios biorrelevantes en los ensayos de liberación de fármacos in vitro, para simular mejor las condiciones fisiológicas. La liberación prolongada de metformina se consiguió con las cuatro formulaciones preparadas, con el 85% de la dosis liberada entre las 6 y las 10 h, dependiendo de la formulación y del medio utilizado (Figura 5.3, capitulo 5).

La liberación de la metformina se encuentra influenciada por el pH de los medios de cesión seleccionados, siendo ligeramente más rápido en FaSSGF que en FaSSIF. En el medio FaSSIF, la presencia de sales biliares (taurocolato de sodio) y fosfolípidos (lecitina) favorece la humectación de algunos fármacos y excipientes, facilitando la penetración del medio de disolución a través de los poros de la estructura de la matriz. Este efecto podría acelerar la disolución del fármaco, especialmente en el caso de fármacos poco solubles en agua. Sin embargo, en el caso de un fármaco altamente soluble en agua, como es el caso de la metformina, este efecto es insignificante, y la diferente velocidad de liberación del fármaco podría atribuirse al diferente comportamiento del polímero en ambos medios de liberación. Las matrices de hidrogel en contacto con medios acuosos absorben gradualmente agua en su estructura y se hinchan, formando una capa de gel de viscosidad cada vez mayor por la que el fármaco se difunde. En la interfaz entre la capa de gel y el medio circundante, las cadenas de polímero se desenredan gradualmente de la interfaz por erosión, mejorando así la liberación del fármaco.

Para confirmar el mecanismo de liberación de la metformina a partir de los comprimidos se llevaron a cabo ensayos de hinchamiento y erosión de los comprimidos elaborados con PAMgA 5 y PAMgA 40 con la metformina granulada (F3 y F4), en ambos medios de disolución (Figura 5.4, capitulo 5). Estos estudios de hinchamiento y erosión se realizaron en 250 ml de los dos medios biorrelevantes, FaSSGF (pH 1.2) y FaSSIF (pH 6.8). En los polímeros derivados del ácido acrílico, estos procesos de hinchamiento y erosión

dependen del pH del medio, ya que la capa de gel formada a pH ácidos es menos viscosa que a pH > 5, facilitando de este modo la erosión del comprimido (R. Varges et al., 2019).

Como se muestra en la figura 5.4 (capitulo 5), en el caso de PAMgA, la erosión del comprimido es ligeramente más rápida a pH 1,2 que a pH 6,8, mientras que en medio FaSSIF el hinchamiento de los polímeros es más intenso. Esto es debido a que los grupos COOH en medio FaSSIF se encuentran ionizados, por lo que se generan fuerzas de electrostáticas de repulsión entre las cadenas de polímero que favorecen la captación de moléculas de agua, a medida que se expande el hidrogel (Lim et al., 2017).

Tal y como se ha mencionado anteriormente la cesión del principio activo a partir de los comprimidos está íntimamente relacionada con la capacidad de hinchamiento y erosión del polímero en el medio. El fármaco por un lado es liberado por erosión de las cadenas finales del polímero a medida que se hincha y por otro lado es difundido a través de la capa de gel que se forma cuando el hidrogel entra en contacto con el medio de cesión. Por ello la liberación a partir de los comprimidos en medio FaSSIF a pH 6,8 es más lenta ya que la capa de gel que se forma es más gruesa y viscosa por lo que la metformina tarda más en difundir a través de ella. Para confirmar esta hipótesis, los datos de liberación se ajustaron a la ecuación de Korsmeyer-Peppas. Existen varios mecanismos posibles implicados en la liberación de fármacos de la matriz polimérica: a) difusión de fármacos a través de la capa de gel de la matriz, b) la erosión del polímero y c) una combinación de ambos mecanismos: difusión del fármaco y erosión del hidrogel (Cascone, 2017). Los valores del exponente de difusión (n) de las formulaciones F3 y F4 indican que el mecanismo de liberación de la metformina a partir de los comprimidos elaborados con PAMgA 5 y PAMgA 40 fue principalmente por la difusión de la metformina a través de la capa de gel (difusión de Fick). Estas formulaciones contienen un porcentaje de NaCMC, para la granulación de la metformina HCl, lo que contribuye a estabilizar la capa de gel aumentando la robustez y la resistencia de la capa de gel que se forma al hidratarse el comprimido (He et al., 2014).

Se comparó la liberación de los comprimidos con respecto al grado de reticulación del polímero, PAMgA 5 o PAMgA 40, con los factores de similitud y de diferencia, sin

observarse diferencias significativas en ninguno de los dos medios estudiados. Al comparar el porcentaje de hinchamiento de ambos polímeros, se observó que PAMgA 40 mostraba una mayor capacidad de captación de moléculas de medio en su estructura. Estos resultados están en relación con los obtenidos en el ensayo de porosimetría de los comprimidos (figura 7.1) donde se observa un mayor número de poros capaces de albergar estas moléculas de medio.

Rubio-Retama y col. postularon que la presencia de moléculas reticulantes en el polímero PAMgA introducía defectos estructurales que podrían modificar las propiedades macroscópicas del polímero y, por tanto, su aplicación. Sin embargo, cuando se comparó la liberación del fármaco a partir de comprimidos matriciales preparados con PAMgA de diferente grado de reticulación (F1 vs F2 y F3 vs F4), no se detectaron diferencias significativas en FaSSGF ni, más claramente, en FaSSIF. Al comparar el comportamiento de hinchamiento, solo se detectaron diferencias significativas entre F3 y F4 en todos los tiempos ensayados en el experimento realizado en FaSSGF, mostrando una mayor capacidad de hinchamiento los comprimidos F4. Sin embargo, en FaSSIF la mayor capacidad de hinchamiento de los comprimidos F4 solo se observó después de 10 h en contacto con el medio de liberación. El aumento de la relación de hinchamiento observado para los comprimidos F4, preparados con PAMgA 40, puede deberse al aumento de grupos hidroxilo hidrófilos que permiten la absorción de agua en el hidrogel, de tal manera que este efecto del grado de reticulación del polímero sobre su capacidad de hinchamiento, resulta más evidente en pH acido donde la capacidad de hinchamiento es menor. Estas diferencias en el comportamiento de hinchamiento, relacionadas con el grado de reticulación de las matrices, no afectaron a la velocidad de liberación de metformina, probablemente debido a su alta solubilidad en agua.

En este sentido, en la Farmacopea de los Estados Unidos, se describen diez test de disolución para los comprimidos de liberación prolongada de clorhidrato de metformina. En todos estos ensayos se utiliza medio de disolución a pH 6,8. La formulación 3 cumple con los criterios establecidos por la USP para comprimidos de 500 mg de metformina (test 10, test 11 y test 14) (USP-NF, 2019b), con porcentajes disueltos entre un 25 - 45% después de

1 h; entre un 50 - 70% después de 3 h y no menos del 85% después de 10 h en 4 de las formulaciones. (Figura 7.4).

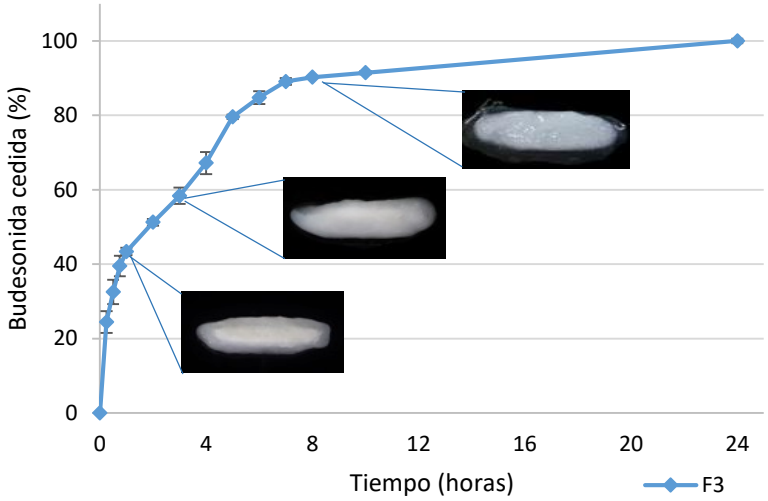


Figura 7.4: Perfil de disolución obtenido con la formulación F3 (PAMgA 5 más metformina granulado) en medio biorrelevante FaSSIF. Fotografías del estudio morfológico a diferentes tiempos (1 cm escala)

En la Figura 7.4 se puede observar el perfil de disolución de la metformina a partir de la formulación F3. Cuando los comprimidos se humedecieron con el medio de disolución, comienzan a hincharse y formar la capa de gel. El agua penetra en las cadenas de polímero desde el exterior de la matriz hasta que llega a la zona interior. Debido a la relajación de las cadenas de polímero que conduce a la formación de la capa de gel, los comprimidos aumentaron de tamaño. Cuanta más agua se absorbe, más gruesa es la capa de gel. El proceso de erosión es una consecuencia del desenredo de las cadenas de polímero en la superficie externa de los comprimidos hinchables y da lugar a una reducción del tamaño del comprimido. La velocidad de liberación del fármaco de las matrices de hidrogel se rige principalmente por la velocidad y el grado de hinchamiento del polímero, la disolución del fármaco en el agua absorbida, la difusión del fármaco a través de la red de polímero hinchado y, finalmente, la velocidad de erosión/disolución de las cadenas de polímero hinchadas. Todos estos procesos conducen a la formación de los tres frentes en una estructura matricial: el frente de hinchamiento, el frente de difusión y el frente de erosión.

En el capítulo 6 de la presente memoria se recoge el trabajo realizado con comprimidos matriciales de budesonida elaborados con el hidrogel PAMgA. La budesonida, es un fármaco poco soluble utilizado en enfermedades inflamatorias que se producen en las últimas porciones del tracto gastrointestinal. Se trata de un costicosteroide de segunda generación, clasificado como prácticamente insoluble en agua, con un peso molecular de 430,5 g / mol ("PubChem Compound Summary for CID 5281004, Budesonide," 2020). Este fármaco tiene una biodisponibilidad sistémica baja después de la administración oral, no porque no se absorba, sino debido a su elevado efecto de primer paso hepático (Lichtenstein, 2016). Esta menor biodisponibilidad sistémica conduce a menos efectos secundarios cuando se administra por vía oral buscando un efecto local, frente a otros corticoesteroides. Su acción antiinflamatoria a nivel local, para el tratamiento de la colitis ulcerosa, se consigue con concentraciones eficaces a nivel de colon, y el caso de la enfermedad de Crohn, lo más frecuente es que el proceso inflamatorio afecte a íleon y colon, aunque también pueden verse afectado yeyuno e incluso duodeno. Por ello, el objetivo a la hora de diseñar los comprimidos matriciales de budesonida es que el fármaco apenas se libere en estómago y primeras porciones de duodeno, con el fin de evitar su absorción, y que por el contrario se libere de forma prolongada en duodeno distal, yeyuno, íleon y colon. Para el desarrollo de estos comprimidos se utilizaron los dos hidrogeles de PAMgA, PAMgA 5 y PAMgA 40, que difieren en su grado de reticulación, debido a la interacción de los iones Mg2 + y los grupos COO- de las cadenas poliméricas (Wurm et al., 2020a).

Se elaboraron comprimidos matriciales de PAMgA 5 y PAMgA 40 que contenían una dosis de 9 mg de budesonida. Los comprimidos se han obtenido por compresión directa y han mostrado una buena resistencia mecánica, en todas las formulaciones elaboradas. Uno de los principales problemas que presentan los fármacos muy liposolubles, es que tienden a quedarse retenidos en la matriz polimérica sin que se consiga su liberación. Para conseguir la liberación total de la budesonida a partir de los comprimidos, se incorporó a la formulación otros excipientes como la lactosa y el lauril sulfato sódico, este último en dos proporciones distintas. La presencia de lactosa da lugar a la formación de poros en los comprimidos matriciales que permite la penetración del medio de cesión que va solubilizando el excipiente (Bendgude et al., 2010), y la incorporación de un tensioactivo

como el lauril sulfato sódico favorece, como ya se ha comentado, la disolución de budesonida en el medio de cesión. De esta forma, junto a las dos formulaciones de comprimidos sólo con polímero (F1 con PAMgA 5 y F2 con PAMgA 40), se obtuvieron otras 2 formulaciones en las que parte del polímero se sustituyó por un 20% de lactosa (F3 y F4), otras dos en las que además se incorporó LSS al 1% (F5 y F6) y otras dos en las que el LSS se incorporó al 2% (F7 yF8). La adición de estos excipientes, disminuyó ligeramente la resistencia a la fractura de los comprimidos, pero siguió siendo suficientemente elevada para su utilización.

Para realizar los estudios de disolución in vitro de los comprimidos, se han utilizado los medios biorrelevantes ya descritos y utilizados también en el desarrollo de los comprimidos de metformina. En el caso de la budesonida, la utilización de estos medios es especialmente importante para correlacionar los resultados in vitro con los que se podrían obtener in vivo ya que la presencia de sales biliares, como el taurocolato de sodio, y fosfolípidos puede mejorar sensiblemente la solubilidad de fármacos poco solubles en agua, debido a la formación de micelas (Klein, 2010; Mudie et al., 2020).

Con las seis formulaciones de comprimidos de budesonida elaboradas, se logró una liberación prolongada del fármaco a partir de los comprimidos matriciales preparados con los hidrogeles de PAMgA. En ambos medios se detectó un periodo de latencia de alrededor de 1 hora. A partir de este tiempo la liberación del fármaco se vio influenciada por el pH del medio, siendo más rápida en FaSSIF que en FaSSGF (figura 6.1. capítulo 6). En todos los casos, la liberación en fluido gástrico (FaSSGF) fue inferior al 20% durante las 9 primeras horas. Sin embargo, en fluido intestinal a pH 6,8, la liberación de budesonida fue más rápida. En ambos medios se puso de manifiesto el efecto acelerador de la liberación que tuvo la incorporación de lactosa y de LSS a la formulación, de manera que con lactosa al 20% y un 2% de LSS (formulaciones F7 y F8), se consiguió liberar toda la dosis de budesonida durante las 24 horas de duración del ensayo.

Para determinar el mecanismo responsable de la liberación del fármaco de los comprimidos matriciales, los datos de disolución se ajustaron a la ecuación de Korsmeyer-Peppas. Este modelo nos permite analizar la liberación de fármacos a partir de formas

farmacéuticas poliméricas, cuando el mecanismo de liberación no se conoce bien o cuando hay más de un mecanismo involucrado (Figueiras et al., 2010). En todas las formulaciones elaboradas el exponente de liberación (n) fue superior a 1, lo que indica que la liberación del fármaco sigue el transporte súper caso-II (Cascone, 2017).

Este transporte súper caso-II indica una cinética de liberación constante del fármaco independiente del tiempo, ya que el gradiente entre el fármaco disperso en el hidrogel y el medio de disolución permite la difusión del mismo desde una zona de mayor concentración (núcleo interno del comprimido), a una región de menor concentración (medio de disolución). Este proceso también se conoce como transporte anómalo ya que combina dos mecanismos simultáneos de liberación del fármaco: a) difusión del fármaco en el polímero hinchado y b) hinchamiento de la matriz debido a la penetración del medio de disolución (Narayanaswamy and Torchilin, 2019).

La budesonida se ha incorporado directamente en comprimidos matriciales y queda atrapa dentro de la red polimérica de los mismos. Como ya se ha comentado, cuando el comprimido entra en contacto con el medio de liberación, comienza a absorber agua y, por lo tanto, comienza a hincharse formando una capa de gel. En el medio FaSSIF (pH 6,8), los grupos –COOH de las cadenas del polímero están ionizados, lo que provoca el hinchamiento del polímero (Nagra et al., 2019). Como indican Nagra et al. esta formación de gel actúa como barrera y prolonga la liberación del fármaco. Aunque en muchas matrices hidrófilas la capa de hidrogel limita en exceso la liberación de fármacos poco hidrosolubles, en otros casos se puede alcanzar una liberación prolongada de toda la dosis durante el tiempo de permanencia de la formulación en el tubo digestivo (Yan et al., 2019). Por ejemplo, en los estudios realizados con Carbopol® 934P (polímero aniónico), Nagra et al. observaron que el polímero presenta buenas propiedades para la formación de matrices, mejorando la liberación de algunos fármacos poco solubles (aceclofenaco), tanto en soluciones amortiguadores de pH neutras como básicas.

El entorno del tacto GI es muy variable y complejo, y está influenciado por varios factores como el pH, la composición y el volumen de fluido. En los seres humanos, el pH del estómago es de 1 a 2 y se eleva hasta 6,8 en el intestino delgado (Gareb et al., 2019). Los

test secuenciales para los estudios de liberación de fármacos in vitro simulan el tránsito por todo el tracto gastrointestinal: estómago, intestino delgado proximal y medio (duodeno y yeyuno), lo que permite una mejor predicción del perfil de liberación in vivo. Por lo tanto, las formulaciones seleccionadas F7 y F8, que mostraron el mejor perfil de liberación en FaSSIF, y baja liberación en medio ácido FaSSGF, se seleccionaron para llevar a cabo los ensayos de liberaciones secuenciales (figura 6.2, capitulo 6). La liberación completa del fármaco se logró en ambas formulaciones después de 24 horas, tras la exposición secuencial a los diferentes medios de pH simulando el tránsito gastrointestinal in vivo: pH 1,2 (2 h), pH 5 (1 h) y pH 6,8 (21 h). En medio gástrico la liberación fue muy baja, probablemente debido al periodo de latencia detectado ya en los estudios anteriores, y entre las 4 y 20 horas del ensayo se liberó de forma sostenida alrededor del 75% de la dosis con ambas formulaciones.

Como se ha indicado previamente con los medios biorrelevantes FaSSGF y FaSSIF, los resultados de disolución secuencial se ajustaron a la ecuación de Korsmeyer-Peppas, donde el exponente de liberación de ambas formulaciones fue superior a 1 (n> 1), lo que indica que la liberación del fármaco sigue al transporte del súper caso II. Por lo tanto, la liberación está controlada predominantemente por el hinchamiento/disolución de la matriz, consiguiendo una liberación lenta que se ajusta a una cinética de orden cero (Yehia et al., 2009).

La captación de agua, hinchamiento, disolución y difusión del fármaco y erosión de la matriz son los procesos involucrados en la liberación de budesonida a partir de los comprimidos matriciales de hidrogel. Los estudios de hinchamiento y erosión se llevaron a cabo con los dos medios biorrelevantes, FaSSGF (pH 1,2) y FaSSIF (pH 6,8), comparándose los resultados obtenidos con las formulaciones F7 y F8 con los obtenidos con los comprimidos inertes (F1 y F2).

De forma general, la captación de agua por parte de las formulaciones con budesonida fue ligeramente inferior a la que se obtuvo con los comprimidos inertes, debido a que, en aquellas, parte del hidrogel fue sustituido por un excipiente hidrosoluble, como la lactosa. En efecto, en el caso de las formulaciones de budesonida F7 (PAMgA 5) y F8

(PAMgA 40) (figura 6.4, capitulo 6), la presencia de excipientes como lactosa y LSS contribuyeron a una menor absorción de agua de los comprimidos. Como indica Bendgude et al. (2010), la lactosa es un compuesto hidrófilo que se disuelve rápidamente en los medios de disolución, formando canales en los comprimidos matriciales que aumentan la porosidad.

En cuanto a la influencia del medio y del grado de reticulación del polímero en el hinchamiento de la matriz, se obtuvieron resultados similares a los obtenidos con los comprimidos inertes: el hinchamiento fue más intenso en medio intestinal que en medio gástrico; y también más intenso en los comprimidos elaborados con PAMgA 40 (F8) que en los elaborados con PAMgA5 (F7), diferencia especialmente marcada en medio simulado intestinal. Estas diferencias en el hinchamiento del polímero en función del medio explican las diferencias encontradas en cuanto a los perfiles de liberación de budesonida: un bajo grado de hinchamiento lleva asociado una muy baja liberación del fármaco.

Respecto a la erosión, ésta es más intensa en los comprimidos con budesonida frene a los comprimidos inertes debido, como cabía esperar, a la incorporación de lactosa y de LSS a la formulación. Así, mientras que en el caso de los comprimidos inertes no se alcanzan valores de erosión superiores al 20% hasta las 12h del ensayo (y en el caso de los comprimidos elaborados con PAMgA 40 en medio intestinal hasta las 20h); con las formulaciones F7 y F8 se obtienen valores de erosión en medio gástrico superiores al 20% ya desde las 4 horas, y en medio intestinal desde las 12h, acelerándose significativamente la erosión a partir de ese momento. En cuanto al efecto del grado de reticulación del polímero, se repite el patrón detectado con los comprimidos inertes: la erosión, como cabía esperar, es más intensa a menor grado de reticulación, diferencias que son más marcadas en medio intestinal, llegando a ser del 80% en el caso de la formulación F7 a las 16h en ese medio.

Serán ambos mecanismos: hinchamiento y erosión, los que contribuyen a la liberación del fármaco a través de las matrices de PAMgA.

La capacidad de erosión e hinchamiento de los comprimidos de PAMgA se relaciona con la velocidad de liberación de budesonida, siendo más lenta a pH 1,2 que en medio alcalino. En FaSSIF, con respecto al tamaño de malla del polímero, se observaron dos comportamientos diferentes. Por un lado, PAMgA 5 mostró mayores valores de erosión tanto en las formulaciones inertes como en las finales, por otro lado, PAMgA 40 mostró un mayor porcentaje de absorción de agua en este medio. Estas diferencias en el comportamiento de los hidrogeles de PAMgA no se observan a pH ácido, ya que los resultados en la erosión y la absorción de agua podrían considerarse similares para las formulaciones de comprimidos inertes y las finales. El fármaco necesitaba atravesar la capa de gel para liberarse de las formulaciones elaboradas con el polímero PAMgA 40, siendo esta capa de gel más espesa y viscosa en FaSSIF. Además, la liberación del fármaco en las formulaciones de PAMgA 5 depende de la erosión en ese mismo medio. Aunque el diferente comportamiento de la matriz del comprimido, según el medio de disolución, da lugar a diferencias en los perfiles de liberación, lo cierto es que los perfiles de liberación de budesonida de las formulaciones F7 y F8 no mostraron diferencias significativas. No se observaron diferencias en la absorción de agua ni en la capacidad de hinchamiento de los hidrogeles de PAMgA en el medio FaSSGF.

Por último, se estudió la bioadhesion de las formulaciones F7 y F8, utilizando cuero curtido de cabra como modelo. El trabajo de bioadhesión obtenido para las formulaciones F7 y F8 es menor que el obtenido para los comprimidos inertes, sin otros excipientes ni principio activo. Esta disminución en el valor se atribuye a que el polímero, en los comprimidos de budesonida, se encuentra en menor proporción en la formula y a la adición de lactosa como excipiente que da lugar a la a la formación de poros en los comprimidos cuando se encuentra en contacto con un medio. Cuando hay una mayor concentración de polímero en los comprimidos existen más cadenas poliméricas capaces de formar enlaces de hidrogeno con el sustrato y por tanto mejorar la bioadhesion (Li and Mooney, 2016). Cuando se comparan la formulación F7 con la F8, se puede observar unos valores más altos de bioadhesión a pH gástrico que resultan significativos, en el modelo de cuero curtido, para la formulación F7. Estos resultados concuerdan con los obtenidos para los comprimidos inertes, donde se observa una mayor bioadhesion con el polímero PAMgA 5 a nivel gástrico. La absorción de agua de los comprimidos en medio FaSSIF es muy rápida, por lo que su

adhesión al sustrato es menor que la observada a pH ácido (FaSSGF). Este mismo comportamiento se ha observado en los ensayos *ex vivo* utilizando mucosa gástrica porcina y medio FaSSGF a pH 1.2 y duodeno proximal porcino y medio biorrelevante FeSSIF a pH 5.0, donde se produce una disminución en la bioadhesión y no se observan diferencias significativas entre ninguna de las formulaciones (F1; F2; F3 y F4).

Para la administración oral, la adhesión al epitelio prolonga la retención de los comprimidos. El epitelio intestinal es húmedo, dinámico y resbaladizo, lo que limita la capacidad de adherencia de los hidrogeles. Se sabe que los hidrogeles de poli (ácido acrílico) forman enlaces de hidrógeno con la mucosa, esta fuerza de adhesión debe estar en un rango de magnitud que sostenga los comprimidos a través del tracto gastrointestinal sin dañar el revestimiento de la mucosa (Campaña-Seoane et al., 2014). Los resultados obtenidos tanto en la mucosa gástrica porcina como en el duodeno proximal sugieren que los hidrogeles de PAMgA pueden adherirse a la mucosa intestinal, en especial en el caso de los comprimidos elaborados con PAMgA 5 (figuras 6.6 y 6.7), esto se debe a los cambios en la densidad y movilidad de las cadenas del polímero (Blanco-Fuente et al., 1996a). El hidrogel PAMgA 5 presenta más flexibilidad y elasticidad que PAMgA 40, por lo que cuando el comprimido entra en contacto con el medio y el sustrato, las cadenas se difunden formando enlaces de hidrógeno, y se necesita un mayor trabajo de separación.

En un sistema de liberación controlada, un aumento en el tiempo de residencia de los comprimidos en el estómago y primeras partes del intestino puede ser muy interesante para diseñar formulaciones con liberaciones más prolongadas. Sin embargo, en el caso de la budesonida es mejor una baja bioadhesión a nivel de estómago, con el objetivo de reducir la absorción del fármaco en los primeros tramos del intestino delgado, ya que se busca una acción local. En este sentido la formulación 8, con PAMgA 40, presenta una menor bioadhesion en estómago y un perfil de cesión adecuado, consiguiendo la liberación completa del fármaco en 24 horas (Figura 7.5).

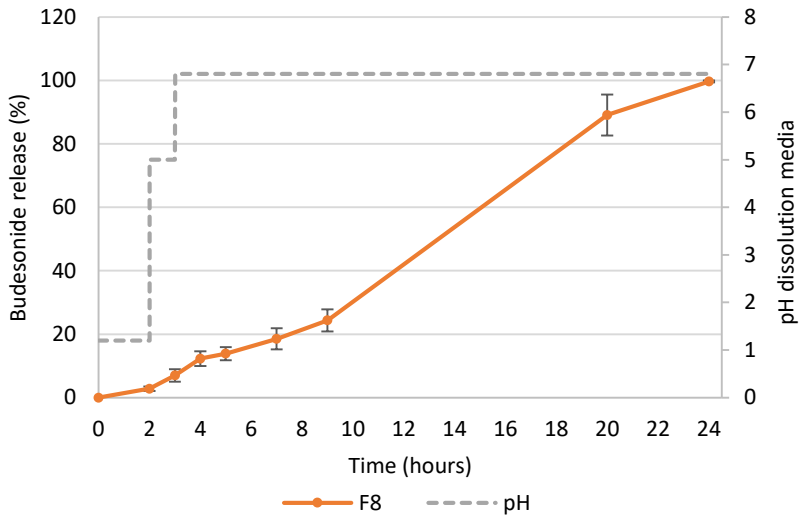


Figura 7.5. Porcentaje de budesonida disuelta a partir de la formulación 8 en medio de liberación secuencial,

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta tesis, el polímero PAMgA se puede clasificar como un excipiente no toxico y biocompatible para la formulación de comprimidos matriciales de administración por vía oral. Además, este nuevo hidrogel derivado del ácido acrílico posee interesantes propiedades bioadhesivas, de diferente intensidad según su grado de reticulación, de manera que el PAMgA 5 muestra resultados prometedores para la adhesión a la región proximal del intestino delgado. Se consiguió controlar la liberación de un fármaco muy hidrosoluble como es la metformina a partir de comprimidos elaborados con el hidrogel, consiguiendo una liberación sostenida durante al menos 10 horas. Por otro lado, los comprimidos elaborados con budesonida, fármaco seleccionado por su liposolubilidad en medio acuosos, permitieron una baja liberación en estómago y duodeno, y más rápida y constante durante 21 horas en medio a pH 6.8. Estos resultados permiten postular al polímero PAMgA como un prometedor excipiente para la elaboración de comprimidos matriciales de liberación prolongada de administración oral.

8. CONCLUSIONES

1. Se ha caracterizado un nuevo polímero derivado del ácido acrílico, sintetizado con dos grados de reticulación, PAMgA 5 y PAMgA 40, no detectándose ninguna diferencia estructural entre ambos, siendo los espectros de FTIR y RAMAN superponibles.

1. Los comprimidos del polímero PAMgA en contacto con el medio ácido presentan el aspecto típico de comprimidos matriciales elaborados con hidrogeles, diferenciándose el frente de erosión, el frente de difusión y el frente de hinchamiento. Los comprimidos elaborados con PAMgA 40 presentan una mayor porosidad y un mayor tamaño de poro que los obtenidos con PAMgA 5. Esta mayor porosidad, junto con su menor erosión, probablemente condicionan la mayor capacidad de hinchamiento de PAMgA 40, frente a PAMgA 5, que en contacto con los medios gastrointestinales sufre principalmente un proceso de erosión consecuencia de su menor grado de reticulación. Para ambos polímeros, el hinchamiento es dependiente de pH, siendo más intenso en medio intestinal (pH 6,8).

2. Los ensayos de bioadhesion sugieren que PAMgA presenta propiedades mucoadhesivas, lo que podría aumentar el tiempo de permanencia de los comprimidos en el tracto gastrointestinal. Esta mucoadhesión es más intensa en medio ácido, y especialmente en el caso de PAMgA 5.

3. En los ensayos de biocompatibilidad, tras la administración oral del polímero no se observaron síntomas de toxicidad, ni pérdida de peso, con una ingesta máxima diaria de hasta 10 g/Kg independientemente del grado de reticulación del polímero. Adicionalmente, el ensayo HET-CAM permitió clasificar el polímero PAMgA como no irritante. Por lo tanto, el polímero PAMgA se puede considerar un excipiente no tóxico para formas de administración por vía oral.

4. Este nuevo hidrogel controla eficazmente la liberación de moléculas pequeñas y altamente hidrófilas, como metformina, cuando se formula en comprimidos matriciales de administración oral. El polímero controló de manera eficaz la liberación del activo hasta 10 horas, obteniendo una formulación de comprimidos (con la metformina previamente granulada con carboximetilcelulosa sódica al 5%) que cumple con las

especificaciones de la USP. La liberación de la metformina a partir de los comprimidos matriciales elaborados con PAMgA se produce principalmente por difusión a través de la matriz hinchada (difusión de Fick).

5. Este nuevo hidrogel también resultó eficaz para desarrollar comprimidos de budesonida, molécula altamente liposoluble, para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal. Se consiguió una liberación prolongada del fármaco en el medio gástrico más lenta que en el medio intestinal, con el 75% de la dosis de budesonida liberada de manera sostenida entre 4 y 20 horas cuando se ensayaron comprimidos elaborados a partir de PAMgA 40, lactosa 20% y lauril sulfato sódico 2% simulando cambios en la composición de los fluidos en todo el tracto digestivo. La liberación de la budesonida a partir de los comprimidos se produce por difusión a través de la matriz hinchada, así como por la erosión de las cadenas exteriores del polímero (súper caso-II).

6. Por ello, el nuevo hidrogel de poli acrilato de magnesio (PAMgA) es polímero de fácil síntesis y con alto rendimiento, que presenta una elevada biocompatibilidad por via oral. Con este polímero se pueden obtener, por compresión directa, comprimidos matriciales con buenas propiedades mecánicas, con la posibilidad de modular su capacidad de hinchamiento, erosión y bioadhesión en función de su grado de reticulación. Este nuevo hidrogel de poliacrilato de magnesio resulta un buen excipiente para comprimidos matriciales de liberación prolongada tanto en el caso de fármacos altamente hidrosolubles como de baja hidrosolubilidad.

BIBLIOGRAFÍA

Ahmed, E.M., 2015. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. J. Adv. Res. 6, 105–121. https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006

Akhtar, M.F., Hanif, M., Ranjha, N.M., 2016. Methods of synthesis of hydrogels … A review. Saudi Pharm. J. https://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.03.022

Alghamdi, A.A., Alsolami, A., Saeed, W.S., Al-Odayni, A.-B.M., Semlali, A., Aouak, T., 2018. Miscibility of poly(acrylic acid)/poly(methyl vinyl ketone) blend and in vitro application as drug carrier system. Des. Monomers Polym. 21, 145–162. https://doi.org/10.1080/15685551.2018.1521563

Bandi, N., Wei, W., Roberts, C.B., Kotra, L.P., Kompella, U.B., 2004. Preparation of budesonide– and indomethacin–hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPBCD) complexes using a single-step, organic-solvent-free supercritical fluid process. Eur. J. Pharm. Sci. 23, 159–168. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2004.06.007

Batista-Duharte, A., Jorge Murillo, G., Pérez, U.M., Tur, E.N., Portuondo, D.F., Martínez, B.T., Téllez-Martínez, D., Betancourt, J.E., Pérez, O., 2016. The Hen's Egg Test on Chorioallantoic Membrane: An Alternative Assay for the Assessment of the Irritating Effect of Vaccine Adjuvants. Int. J. Toxicol. 35, 627–633. https://doi.org/10.1177/1091581816672187

Bendgude, T., Iyer, R., Sushi, S., 2010. The effects of lactose, microcrystalline cellulose and dicalcium phosphate on swelling and erosian of compressed HPMC matrix tablets. Iran. J. Pharm. Res. 9, 349–358.

Blanco-Fuente, H., Anguiano-Igea, S., Otero-Espinar, F.J., Blanco-Méndez, J., 1996a. In-vitro bioadhesion of carbopol hydrogels. Int. J. Pharm. 142, 169–174. https://doi.org/10.1016/0378-5173(96)04665-0

Blanco-Fuente, H., Vila-Dorrío, B., Anguiano-Igea, S., Otero-Espinar, F.J., Blanco-Méndez, J., 1996b. Tanned leather: A good model for determining hydrogels bioadhesion. Int. J. Pharm. 138, 103–112. https://doi.org/10.1016/0378-5173(96)04542-5

Caccavo, D., Cascone, S., Lamberti, G., Barba, A.A., Larsson, A., 2016. Swellable Hydrogel-based Systems for Controlled Drug Delivery. Smart Drug Deliv. Syst. https://doi.org/10.5772/61792

Calixto, G., Yoshii, A.C., Rocha, H., Stringhetti, B., Cury, F., Chorilli, M., Calixto, G., Yoshii, A.C., Rocha, H., Stringhetti, B., 2015. Polyacrylic acid polymers hydrogels intended to topical drug delivery : preparation and characterization Polyacrylic acid polymers

hydrogels intended to topical drug delivery : preparation and characterization. Pharm. Dev. Technol. 7450. https://doi.org/10.3109/10837450.2014.882941

Caló, E., Khutoryanskiy, V. V., 2015. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. Eur. Polym. J. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024

Campaña-Seoane, M., Peleteiro, A., Laguna, R., Otero-Espinar, F.J., 2014. Bioadhesive emulsions for control release of progesterone resistant to vaginal fluids clearance. Int. J. Pharm. 477, 495–505. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.10.066

Cascone, S., 2017. Modeling and comparison of release profiles: Effect of the dissolution method. Eur. J. Pharm. Sci. 106, 352–361. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.06.021

Cheddadi, M., López-Cabarcos, E., Slowing, K., Barcia, E., Fernández-Carballido, A., 2011. Cytotoxicity and biocompatibility evaluation of a poly(magnesium acrylate) hydrogel synthesized for drug delivery. Int. J. Pharm. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.04.042

Chuah, C., Wang, J., Tavakoli, J., Tang, Y., 2018. Novel bacterial cellulose-poly (acrylic acid) hybrid hydrogels with controllable antimicrobial ability as dressings for chronic wounds. Polymers (Basel). https://doi.org/10.3390/polym10121323

Chyzy, A., Tomczykowa, M., Plonska-Brzezinska, M.E., 2020. Hydrogels as potential nano-, micro- and macro-scale systems for controlled drug delivery. Materials (Basel). 13, 188. https://doi.org/10.3390/ma13010188

Colombo, P., Bettini, R., Peppas, N.A., 1999. Observation of swelling process and diffusion front position during swelling in hydroxypropyl methyl cellulose (HPMC) matrices containing a soluble drug. J. Control. Release. https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00104-2

Colombo, P., Bettini, R., Santi, P., Peppas, N.A., 2000. Swellable matrices for controlled drug delivery: Gel-layer behaviour, mechanisms and optimal performance. Pharm. Sci. Technol. Today. https://doi.org/10.1016/S1461-5347(00)00269-8

Concheiro, A., Alvarez-Lorenzo, C., 2013. Chemically cross-linked and grafted cyclodextrin hydrogels: From nanostructures to drug-eluting medical devices. Adv. Drug Deliv. Rev. https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.04.015

Coviello, T., Matricardi, P., Marianecci, C., Alhaique, F., 2007. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. J. Control. Release.

https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.01.004

Cutrín-Gómez, E., Anguiano-Igea, S., Delgado-Charro, M.B., Gómez-Amoza, J.L., Otero-Espinar, F.J., 2018a. Effect of penetration enhancers on drug nail permeability from cyclodextrin/poloxamer-soluble polypseudorotaxane-based nail lacquers. Pharmaceutics. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040273

Cutrín-Gómez, E., Anguiano-Igea, S., Delgado-Charro, M.B., Gómez-Amoza, J.L., Otero-Espinar, F.J., 2018b. Effect on nail structure and transungual permeability of the ethanol and poloxamer ratio from cyclodextrin-soluble polypseudorotaxanes based nail lacquer. Pharmaceutics. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030156

da Silva, J.B., Ferreira, S.B. de S., Reis, A.V., Cook, M.T., Bruschi, M.L., 2018. Assessing mucoadhesion in polymer gels: The effect of method type and instrument variables. Polymers (Basel). https://doi.org/10.3390/polym10030254

DrugBank, 2020. Metformin DB00331 [WWW Document]. URL https://go.drugbank.com/drugs/DB00331 (accessed 9.24.20).

Fehrenbacher et. al, J., 2012. Models of Inflammation: Carrageenan- or Complete Freund's Adjuvant-Induced Edema and Hypersensitivity in the Rat. Curr Protoc Pharmacol. https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0504s56

Fernández-Barbero, A., Suárez, I.J., Sierra-Martín, B., Fernández-Nieves, A., de las Nieves, F.J., Marquez, M., Rubio-Retama, J., López-Cabarcos, E., 2009. Gels and microgels for nanotechnological applications. Adv. Colloid Interface Sci. 147–148, 88–108. https://doi.org/10.1016/j.cis.2008.12.004

Fernández-Ferreiro, A., Fernández Bargiela, N., Varela, M.S., Martínez, M.G., Pardo, M., Piñeiro Ces, A., Méndez, J.B., Barcia, M.G., Lamas, M.J., Otero-Espinar, F., 2014. Cyclodextrin–polysaccharide-based, in situ-gelled system for ocular antifungal delivery. Beilstein J. Org. Chem. 10, 2903–2911. https://doi.org/10.3762/bjoc.10.308

Figueiras, A., Pais, A.A.C.C., Veiga, F.J.B., 2010. A comprehensive development strategy in buccal drug delivery. AAPS PharmSciTech. https://doi.org/10.1208/s12249-010-9546-1208/s12249-010-9546-1

Gao, X., Cao, Y., Song, X., Zhang, Z., Zhuang, X., He, C., Chen, X., 2014. Biodegradable, pH-Responsive Carboxymethyl Cellulose/Poly(Acrylic Acid) Hydrogels for Oral Insulin Delivery. Macromol. Biosci. 14, 565–575. https://doi.org/10.1002/mabi.201300384

Gareb, B., Dijkstra, G., Kosterink, J.G.W., Frijlink, H.W., 2020. Development of novel zero-

order release budesonide tablets for the treatment of ileo-colonic inflammatory bowel disease and comparison with formulations currently used in clinical practice. Pharm. Weekbl.

Gareb, B., Dijkstra, G., Kosterink, J.G.W., Frijlink, H.W., 2019. Development of novel zero-order release budesonide tablets for the treatment of ileo-colonic inflammatory bowel disease and comparison with formulations currently used in clinical practice. Int. J. Pharm. 554, 366–375. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.11.019

Gareb, B., Eissens, A.C., Kosterink, J.G.W., Frijlink, H.W., 2016. Development of a zero-order sustained-release tablet containing mesalazine and budesonide intended to treat the distal gastrointestinal tract in inflammatory bowel disease. Eur. J. Pharm. Biopharm. 103, 32–42. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.03.018

Graham, G.G., Punt, J., Arora, M., Day, R.O., Doogue, M.P., Duong, J.K., Furlong, T.J., Greenfield, J.R., Greenup, L.C., Kirkpatrick, C.M., Ray, J.E., Timmins, P., Williams, K.M., 2011. Clinical pharmacokinetics of metformin. Clin. Pharmacokinet. 50, 81–98. https://doi.org/10.2165/11534750-000000000-00000

Gu, D., O'Connor, A.J., G.H. Qiao, G., Ladewig, K., 2017. Hydrogels with smart systems for delivery of hydrophobic drugs. Expert Opin. Drug Deliv. https://doi.org/10.1080/17425247.2017.1245290

He, W., Huang, S., Zhou, C., Cao, L., Yao, J., Zhou, J., Wang, G., Yin, L., 2014. Bilayer Matrix Tablets for Prolonged Actions of Metformin Hydrochloride and Repaglinide. AAPS PharmSciTech 16, 344–353. https://doi.org/10.1208/s12249-014-0229-1

Hetper, J.; Balcerowiak, W. ; Berés, J., 1981. Thermal decomposition of metal polyacrilates. J. Therm. Anal. 20, 345–350.

Hiorth, M., Nilsen, S., Tho, I., 2014. Bioadhesive Mini-Tablets for Vaginal Drug Delivery. Pharmaceutics 6, 494–511. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics6030494

Hoare, T.R., Kohane, D.S., 2008. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. Polymer (Guildf). https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.01.027

Hostalek, U., Gwilt, M., Hildemann, S., 2015. Therapeutic Use of Metformin in Prediabetes and Diabetes Prevention. Drugs 75, 1071–1094. https://doi.org/10.1007/s40265-015-0416-8

Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM), 2010. Recommended Test Method Protocol : Hen ' s Egg Test – Chorioallantoic

Membrane (HET-CAM) Test Method. ICCVAM Test Method Eval. Rep. 13, B30–B38. https://doi.org/10.3390/ijms13089959

Irimia, T., Dinu-Pîrvu, C.E., Ghica, M.V., Lupuleasa, D., Muntean, D.L., Udeanu, D.I., Popa, L., 2018. Chitosan-based in situ gels for ocular delivery of therapeutics: A state-of-the-art review. Mar. Drugs 16. https://doi.org/10.3390/md16100373

Jain, A., Jain, S.K., 2008. In vitro and cell uptake studies for targeting of ligand anchored nanoparticles for colon tumors. Eur. J. Pharm. Sci. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2008.08.008

Jalalvandi, E., Hanton, L.R., Moratti, S.C., 2017. Schiff-base based hydrogels as degradable platforms for hydrophobic drug delivery. Eur. Polym. J. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.03.003

Jantratid, E., Janssen, N., Reppas, C., Dressman, J.B., 2008. Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: An update. Pharm. Res. 25, 1663–1676. https://doi.org/10.1007/s11095-008-9569-4

Klein, S., 2010. The Use of Biorelevant Dissolution Media to Forecast the In Vivo Performance of a Drug. AAPS J. 12, 397–406. https://doi.org/10.1208/s12248-010-9203-3

Knoos, P., Svensson, A. V., Ulvenlund, S., Wahlgren, M., 2015. Release of a poorly soluble drug from hydrophobically modified poly (acrylic acid) in simulated intestinal fluids. PLoS One 10, 1–16. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140709

Kutyła, M.J., Boehm, M.W., Stokes, J.R., Shaw, P.N., Davies, N.M., McGeary, R.P., Tuke, J., Ross, B.P., 2013. Cyclodextrin-crosslinked poly(acrylic acid): Adhesion and controlled release of diflunisal and fluconazole from solid dosage forms. AAPS PharmSciTech. https://doi.org/10.1208/s12249-012-9903-3

Lafayette, W., 1989. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation 57, 169–172.

Lanzalaco, S., Turon, P., Weis, C., Alemán, C., Armelin, E., 2019. The mechanism of adhesion and graft polymerization of a PNIPAAm thermoresponsive hydrogel to polypropylene meshes. Soft Matter 15, 3432–3442. https://doi.org/10.1039/C9SM00412B

Larrañeta, E., Barturen, L., Ervine, M., Donnelly, R.F., 2018. Hydrogels based on poly(methyl vinyl ether-co-maleic acid) and Tween 85 for sustained delivery of hydrophobic drugs. Int. J. Pharm. 538, 147–158. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.01.025

Li, J., Mooney, D.J., 2016. Designing hydrogels for controlled drug delivery. Nat. Rev. Mater. 1, 16071. https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.71

Lichtenstein, G.R., 2016. Budesonide Multi-matrix for the Treatment of Patients with Ulcerative Colitis. Dig. Dis. Sci. 61, 358–370. https://doi.org/10.1007/s10620-015-3897-0

Liechty, W.B., Kryscio, D.R., Slaughter, B. V., Peppas, N.A., 2010. Polymers for Drug Delivery Systems. Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng. 1, 149–173. https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-073009-100847

Lim, L.S., Rosli, N.A., Ahmad, I., Mat Lazim, A., Mohd Amin, M.C.I., 2017. Synthesis and swelling behavior of pH-sensitive semi-IPN superabsorbent hydrogels based on poly(acrylic acid) reinforced with cellulose nanocrystals. Nanomaterials. https://doi.org/10.3390/nano7110399

Lokman, N.A., Elder, A.S.F., Ricciardelli, C., Oehler, M.K., 2012. Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay as an in vivo model to study the effect of newly identified molecules on ovarian cancer invasion and metastasis. Int. J. Mol. Sci. 13, 9959–9970. https://doi.org/10.3390/ijms13089959

López-Sanromán, A., Clofent, J., Garcia-Planella, E., Menchén, L., Nos, P., Rodríguez-Lago, I., Domènech, E., 2018. Revisando el papel terapéutico de la budesonida en la enfermedad de Crohn. Gastroenterol. Hepatol. 41, 458–471. https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2018.05.013

Lui, Chun; Lewin Mejia, Daniela; Chiang, B., 2018. Hybrid Collagen Alginate Hydrogel as a Platform for 3D Tumor Spheroid Invasion. Acta Biomater. 15, 213–225. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.06.003

Luo, M.T., Li, H.L., Huang, C., Zhang, H.R., Xiong, L., Chen, X.F., Chen, X. De, 2018. Cellulose-based absorbent production from bacterial cellulose and acrylic acid: Synthesis and performance. Polymers (Basel). https://doi.org/10.3390/polym10070702

Mackiewicz, M., Stojek, Z., Karbarz, M., 2019. Synthesis of cross-linked poly(acrylic acid) nanogels in an aqueous environment using precipitation polymerization: Unusually high volume change. R. Soc. Open Sci. https://doi.org/10.1098/rsos.190981

Maderuelo, C., Zarzuelo, A., Lanao, J.M., 2011. Critical factors in the release of drugs from sustained release hydrophilic matrices. J. Control. Release 154, 2–19. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.04.002

Marquardt, C., Matuschek, C., Bölke, E., Gerber, P.A., Peiper, M., Seydlitz-Kurzbach, J. V., Buhren, B.A., Van Griensven, M., Budach, W., Hassan, M., Kukova, G., Mota, R., Höfer, D., Orth, K., Fleischmann, W., 2010. Evaluation of the tissue toxicity of antiseptics by the Hen's Egg Test on the Chorioallantoic Membrane (HETCAM). Eur. J. Med. Res. https://doi.org/10.1186/2047-783x-15-5-204

Mastropietro, D.J., Omidian, H., Park, K., 2012. Drug delivery applications for superporous hydrogels. Expert Opin. Drug Deliv. https://doi.org/10.1517/17425247.2012.641950

McCreight, L.J., Bailey, C.J., Pearson, E.R., 2016. Metformin and the gastrointestinal tract. Diabetologia 59, 426–435. https://doi.org/10.1007/s00125-015-3844-9

McKenzie, M., Betts, D., Suh, A., Bui, K., Kim, L.D., Cho, H., 2015. Hydrogel-based drug delivery systems for poorly water-soluble drugs. Molecules. https://doi.org/10.3390/molecules201119705

McNeill, I.C., Sadeghi, S.M.T., 1990. Thermal stability and degradation mechanisms of poly(acrylic acid) and its salts: Part 2-Sodium and potassium salts. Polym. Degrad. Stab. 30, 213–230. https://doi.org/10.1016/0141-3910(90)90077-K

Mudie, D.M., Samiei, N., Marshall, D.J., Amidon, G.E., Bergström, C.A.S., 2020. Tutorial Selection of In Vivo Predictive Dissolution Media Using Drug Substance and Physiological Properties. AAPS J. 22, 1–13. https://doi.org/10.1208/s12248-020-0417-8

Nagra, U., Adnan, S., Shafqat, S., Shabbir, M., Ali, S., Zafar, A., Saeed Ul Hassan, S., Iqbal, J., 2019. Effect of sustained release polymers on drug release profile of aceclofenac tablets-physicochemical properties, analysis of kinetics and fit factor. Indian J. Pharm. Educ. Res. https://doi.org/10.5530/ijper.53.2s.49

Narayanaswamy, R., Torchilin, V.P., 2019. Hydrogels and their applications in targeted drug delivery. Molecules. https://doi.org/10.3390/molecules24030603

Nogueiras-Nieto, L., Gómez-Amoza, J.L., Delgado-Charro, M.B., Otero-Espinar, F.J., 2011. Hydration and N-acetyl-l-cysteine alter the microstructure of human nail and bovine hoof: Implications for drug delivery. J. Control. Release. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.08.021

Nowak-Sliwinska, P., Segura, T., Iruela-Arispe, M.L., 2014. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. Angiogenesis 17, 779–804. https://doi.org/10.1007/s10456-014-9440-7

Otegui, J., Fernández, E., Rubio-Retama, J., López-Cabarcos, E., Mijangos, C., López, D., 2009. Swelling and viscoelastic properties of new magnesium acrylate hydrogels. Polym. Eng. Sci. https://doi.org/10.1002/pen.21293

Owen, D.H., Katz, D.F., 1999. A vaginal fluid simulant. Contraception 59, 91–95. https://doi.org/10.1016/S0010-7824(99)00010-4

Palmeira-de-Oliveira, R., Monteiro Machado, R., Martinez-de-Oliveira, J., Palmeira-de-Oliveira, A., 2018. Testing vaginal irritation with the Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane assay. ALTEX 35, 495–503. https://doi.org/10.14573/altex.1710091

Palmese, L.L., Thapa, R.K., Sullivan, M.O., Kiick, K.L., 2019. Hybrid hydrogels for biomedical applications. Curr. Opin. Chem. Eng. 24, 143–157. https://doi.org/10.1016/j.coche.2019.02.010

Pandey, P., Levins, C., Pafiakis, S., Zacour, B., Bindra, D.S., Trinh, J., Buckley, D., Gour, S., Sharif, S., Stamato, H., 2018. Enhancing tablet disintegration characteristics of a highly water-soluble high-drug-loading formulation by granulation process. Pharm. Dev. Technol. 23, 587–595. https://doi.org/10.1080/10837450.2016.1264416

Parhi, R., 2017. Cross-linked hydrogel for pharmaceutical applications: A review. Adv. Pharm. Bull. https://doi.org/10.15171/apb.2017.064

Peppas, N.A., Bures, P., Leobandung, W., Ichikawa, H., 2000. Hydrogels in pharmaceutical formulations. Eur. J. Pharm. Biopharm. 50, 27–46. https://doi.org/10.1016/S0939-6411(00)00090-4

Peppas, N.A., Hilt, J.Z., Khademhosseini, A., Langer, R., 2006. Hydrogels in biology and medicine: From molecular principles to bionanotechnology. Adv. Mater. https://doi.org/10.1002/adma.200501612

PubChem Compound Summary for CID 14219, Metformin hydrochloride [WWW Document], 2020. . Natl. Cent. Biotechnol. Inf. URL https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Metformin-hydrochloride (accessed 8.26.20).

PubChem Compound Summary for CID 5281004, Budesonide [WWW Document], 2020. . Natl. Cent. Biotechnol. Inf. URL https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Budesonide (accessed 8.22.20).

R. Varges, P., M. Costa, C., S. Fonseca, B., F. Naccache, M., De Souza Mendes, P., 2019. Rheological Characterization of Carbopol® Dispersions in Water and in Water/Glycerol

Solutions. Fluids 4, 3. https://doi.org/10.3390/fluids4010003

Rattier, B., Hoffman, A., Schoen, F., Lemons, J., 1997. Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. J. Clin. Eng. https://doi.org/10.1097/00004669-199701000-00009

Real Farmacopea Española, 2015a. Formas Farmacéuticas: comprimidos [WWW Document]. Agencia Española Medicam. y Prod. Sanit. (Ministerio Sanid. y Consum. URL https://www.aemps.gob.es (accessed 8.10.20).

Real Farmacopea Española, 2015b. Ensayo de disolución de las formas farmacéuticas sólidas [WWW Document]. Agencia Española Medicam. y Prod. Sanit. (Ministerio Sanid. y Consum. URL https://www.aemps.gob.es (accessed 8.10.20).

Rizwan, M., Yahya, R., Hassan, A., Yar, M., Azzahari, A.D., Selvanathan, V., Sonsudin, F., Abouloula, C.N., 2017. pH sensitive hydrogels in drug delivery: Brief history, properties, swelling, and release mechanism, material selection and applications. Polymers (Basel). https://doi.org/10.3390/polym9040137

Rubio-Retama, J., Tamimi, F.M., Heinrich, M., López-Cabarcos, E., 2007. Synthesis and Characterization of Poly(magnesium acrylate) Microgels. Langmuir 23, 8538–8543. https://doi.org/10.1021/la700696h

Sarkar, D., Nandi, G., Changder, A., Hudati, P., Sarkar, S., Ghosh, L.K., 2017. Sustained release gastroretentive tablet of metformin hydrochloride based on poly (acrylic acid)-grafted-gellan. Int. J. Biol. Macromol. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.022

Shaik, M.R., Kuniyil, M., Khan, M., Ahmad, N., Al-Warthan, A., Siddiqui, M.R.H., Adil, S.F., McPhee, D.J., 2016. Modified polyacrylic acid-zinc composites: Synthesis, characterization and biological activity. Molecules. https://doi.org/10.3390/molecules21030292

Sharpe, L.A., Daily, A.M., Horava, S.D., Peppas, N.A., 2014. Therapeutic applications of hydrogels in oral drug delivery. Expert Opin. Drug Deliv. 11, 901–915. https://doi.org/10.1517/17425247.2014.902047

Simancas-herbada, R., Fern, A., Aparicio-blanco, J., Slowing, K., Rubio-retama, J., Enrique, L., Torres-su, A., 2020. Controlled Release of Highly Hydrophilic Drugs from Novel Poly (Magnesium Acrylate) Matrix Tablets. Pharmaceutics 12, 1–15. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020174

Singh, R., Mahto, V., 2017. Synthesis, characterization and evaluation of polyacrylamide

graft starch/clay nanocomposite hydrogel system for enhanced oil recovery. Pet. Sci. https://doi.org/10.1007/s12182-017-0185-y

Smart, J.D., 2005. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. Adv. Drug Deliv. Rev. 57, 1556–1568. https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.07.001

USP-NF, 2019a. Metformin Hydrochloride Tablets [WWW Document]. URL https://online.uspnf.com/uspnf/document/GUID-BE09CDF5-9F23-41EC-9856-7C88487236E2_1_en-US?highlight=metformin (accessed 9.20.20).

USP-NF, 2019b. Metformin Hydrochloride Extended-Release Tablets [WWW Document]. URL https://online.uspnf.com/uspnf/document/GUID-A5634506-1654-4ACA-8AD0-C17BD758ECCE_4_en-US?highlight=metformine (accessed 9.20.20).

Vasile, C., Pamfil, D., Stoleru, E., Baican, M., 2020. New developments in medical applications of hybrid hydrogels containing natural polymers. Molecules. https://doi.org/10.3390/molecules25071539

Vermonden, T., Censi, R., Hennink, W.E., 2012. Hydrogels for Protein Delivery. Chem. Rev. 112, 2853–2888. https://doi.org/10.1021/cr200157d

Vertzoni, M., Dressman, J., Butler, J., Hempenstall, J., Reppas, C., 2005. Simulation of fasting gastric conditions and its importance for the in vivo dissolution of lipophilic compounds. Eur. J. Pharm. Biopharm. 60, 413–417. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2005.03.002

Wurm, F., Rietzler, B., Pham, T., Bechtold, T., 2020a. Multivalent ions as reactive crosslinkers for biopolymers—A review. Molecules. https://doi.org/10.3390/molecules25081840

Wurm, F., Rietzler, B., Pham, T., Bechtold, T., 2020b. Multivalent Ions as Reactive Crosslinkers for Biopolymers—A Review. Molecules 25, 1840. https://doi.org/10.3390/molecules25081840

Yan, Y., Wang, P., Li, R., Sun, Y., Zhang, R., Huo, C., Xing, J., Dong, Y., 2019. Synthesis of budesonide conjugates and their anti-inflammatory effects: A preliminary study. Drug Des. Devel. Ther. https://doi.org/10.2147/DDDT.S192348

Yehia, S.A., Elshafeey, A.H., Sayed, I., Shehata, A.H., 2009. Optimization of budesonide compression-coated tablets for colonic delivery. AAPS PharmSciTech. https://doi.org/10.1208/s12249-009-9188-3

Yerevanian, A., Soukas, A.A., 2019. Metformin: Mechanisms in Human Obesity and Weight Loss. Curr. Obes. Rep. https://doi.org/10.1007/s13679-019-00335-3

Zhang, G., Bao, C., Fu, K., Lin, Y., Li, T., Yang, H., 2020. Synthesis, characterization, self-assembly, and irritation studies of polyglyceryl-10 caprylates. Polymers (Basel). 12. https://doi.org/10.3390/polym12020294

Zheng, J., Woo, S.L., Hu, X., Botchlett, R., Chen, L., Huo, Y., Wu, C., 2015. Metformin and metabolic diseases: a focus on hepatic aspects. Front. Med. https://doi.org/10.1007/s11684-015-0384-0

Zhou, J., Massey, S., Story, D., Li, L., 2018. Metformin: An Old Drug with New Applications. Int. J. Mol. Sci. 19, 2863. https://doi.org/10.3390/ijms19102863

Zoeller, T., Klein, S., 2007. Simplified Biorelevant Media for Poorly Soluble Drugs 17728, 8–13.