

**ESTUDIO CINÉTICO DE LA LIBERACIÓN MODIFICADA DE VENLAFAXINA
HCl *in vitro* DESDE HIDROGELES DE QUITOSANO, UTILIZANDO GENIPINA
COMO AGENTE RETICULANTE**

EDWIN ENRIQUE GUZMAN MENDOZA

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
MAESTRÍA EN FORMULACIÓN DE PRODUCTOS QUÍMICOS Y DERIVADOS
SANTIAGO DE CALI
2017**

**ESTUDIO CINÉTICO DE LA LIBERACIÓN MODIFICADA DE VENLAFAXINA
HCL *in vitro* DESDE HIDROGELES DE QUITOSANO, UTILIZANDO GENIPINA
COMO AGENTE RETICULANTE**

EDWIN ENRIQUE GUZMAN MENDOZA

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TITULO DE
MAGISTER EN FORMULACIÓN DE PRODUCTOS QUÍMICOS Y
DERIVADOS**

TUTORA: NORA ELENA VALDERRUTEN POSSO, PhD

SANTIAGO DE CALI

2017

**FIRMAS AVAL DEL CUMPLIMIENTO DE LOS OBJETIVOS DEL PROYECTO
DE GRADO II**

Firma Aval del Asesor:

Nora Elena Valderruten Posso. PhD

Firma del Estudiante:

Edwin Enrique Guzmán Mendoza

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto de grado no habria sido posible llevarlo a cabo sin la ayuda de Dios quien me dio la salud y la vida. A mi Padre que yo se que esta conmigo todos los dias.

Me gustaria agradecer a mi esposa, por su apoyo en los momentos dificeles en los que queria desfayecer y por su amor incondicional.

A la Doctora Nora Elena Valderruten por su apoyo y conocimiento que me brindo durante todo el año que duro el proyecto.

A mi madre y familia por su gran apoyo para poder finalizar este proyecto.

Y a todas las personas que estuvieron cuando las pude necesitar, les agradezco mucho.

Edwin Enrique Guzmán Mendoza.

CONTENIDO

1. RESUMEN DEL PROYECTO	1
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO	2
2.1. Planteamiento del problema y justificación de la investigación	2
2.2. Marco Teórico	4
2.2.1. Generalidades del Principio activo venlafaxina HCL.....	10
2.2.2. Temperatura de Transición vítrea Tg	11
2.2.3. Cinéticas de hinchamiento de los hidrogeles	11
2.2.4. Modelo Cinético semi-empirico desarrollado por Korsmeyer- Peppas	12
2.3. Objetivos	14
2.3.1. Objetivo general	14
2.3.2. Objetivos específicos	14
2.4. Metodología propuesta	15
2.4.1. Materiales	15
2.4.2. Equipos	15
2.4.2.1. Síntesis de los hidrogeles de quitosano reticulados con genipina	15
2.4.2.2. Caracterización estructural de quitosano, genipina y de los hidrogeles reticulados con genipina	18
2.4.2.3. Propiedades térmicas de los hidrogeles de quitosano reticulados con genipina	18
2.4.2.4. Cinéticas de hinchamiento de los hidrogeles de quitosano reticulados con genipina a diferentes pH 4.5 y 7.6.....	18
2.4.2.5. Liberación <i>in vitro</i> de Venlafaxina HCl desde los hidrogeles	19
2.5. Resultados y discusión	20

2.5.1. Síntesis de los hidrogeles de quitosano reticulados con genipina.....	20
2.5.2. Caracterización estructural de quitosano, genipina y de los hidrogeles reticulados con Genipina	21
2.5.3. Propiedades térmicas de los hidrogeles de quitosano reticulados con genipina	26
2.5.4. Cinéticas de hinchamiento de los hidrogeles de quitosano reticulados con genipina a pH 4.5 y 7.6	30
2.5.5. Cinética de liberación <i>in vitro</i> de Venlafaxina HCl desde los hidrogeles.....	40
2.6. Conclusiones	44
2.7. Recomendaciones	46
2.8. Referencias Bibliográficas	47

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cantidad de quitosano y genipina utilizados para la preparacion de los hidrogeles **16**

Tabla 2. Valores del grado de hinchamiento en equilibrio, (W_{∞}), contenido de agua en equilibrio, (H_{∞}) y la constante cinética de hinchamiento, (K), a pH 4.5 y 7.6 de los polímeros sintetizados **38**

Tabla 3. Constantes de liberación (K), exponentes de liberación (n) y coeficientes de determinación (R^2), encontrados en los estudios cinéticos de liberación de Venlafaxina HCl para Quitosano-genipina 0.1%, 0.2% y 0.3% **42**

LISTA DE GRAFICAS

Gráfica 1. Representación del porcentaje de hinchamiento,(W%) en función del tiempo y a 25°C para quitosano-genipina 0.1% a dos diferentes condiciones de pH.....	30
Gráfica 2. Representación del porcentaje de contenido de agua (H%) en función del tiempo y a 25°C para quitosano-genipina 0.1% a dos diferentes condiciones de pH.....	31
Gráfica 3. Representación del porcentaje de hinchamiento,(W%) en función del tiempo y a 25°C para quitosano-genipina 0.2% a dos diferentes condiciones de pH.....	32
Gráfica 4. Representación del porcentaje de contenido de agua (H%) en función del tiempo y a 25°C para quitosano-genipina 0.2% a dos diferentes condiciones de pH.....	32
Gráfica 5. Representación del porcentaje de hinchamiento,(W%) en función del tiempo y a 25°C para quitosano-genipina 0.3% a dos diferentes condiciones de pH.....	33
Gráfica 6. Representación del porcentaje de contenido de agua (H%) en función del tiempo y a 25°C para quitosano-genipina 0.3% a dos diferentes condiciones de pH.....	33
Gráfica 7. Representación del porcentaje de hinchamiento,(W%) en función del tiempo a 25°C y a pH 4,5 para quitosano-genipina 0.1%,0,2% y 0,3% .	34
Gráfica 8. Representación del porcentaje de contenido de agua (H%) en función del tiempo a 25°C y a pH 4,5 para quitosano-genipina 0.1%, 0,2% y 0,3%	35
Gráfica 9. Representación del porcentaje de hinchamiento,(W%) en función del tiempo a 25°C y a pH 7,6 para quitosano-genipina 0.1%,0,2% y 0,3%	36
Gráfica 10. Representación del contenido de agua (H%) en función del tiempo a 25°C y a pH 7,6 para quitosano-genipina 0.1%,0.2% y 0.3%	36
Gráfica 11. Representación del hinchamiento a pH 4.5 para quitosano-genipina 0.1%,0.2% y 0.3% de acuerdo con una cinetica de segundo orden	37
Gráfica 12. Representación del hinchamiento a pH 7.6 para quitosano-genipina 0.1%,0.2% y 0.3% de acuerdo con una cinetica de segundo orden	38
Gráfica 13. Recta de Calibrado obtenida para Venlafaxina HCl.....	40
Gráfica 14. Curva de liberacion de Venlafaxina HCl, desde los hidrogeles de quitosano-genipina 0.1%,0.2% y 0.3%	41
Gráfica 15. Representación del modelo cinético semi-empírico desarrollado por Korsmeyer-Peppas hidrogeles de Quitosano-genipina 0.1%,0.2% y 0.3%.	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de Quitosano	5
Figura 2. Estructura química de la Genipina	6
Figura 3. Mecanismo de reaccion de la reticulación de Quitosano con Genipina en medio ácido	7
Figura 4. Mecanismo de reaccion de la reticulación de Quitosano con Genipina en medio básico.....	8
Figura 5. Quitosano reticulado con Genipina.....	9
Figura 6. Estructura química de la Venlafaxina	10
Figura 7. Fotografía de las pastillas de los Hidrogeles de quitosano reticulados con genipina	20
Figura 8. Espectro FT-IR de Quitosano	21
Figura 9. Espectro FT-IR de Genipina	22
Figura 10. Espectro FT-IR de quitosano-genipina 0.1%.....	23
Figura 11. Espectro FT-IR de quitosano-genipina 0.2%.....	24
Figura 12. Espectro FT-IR de quitosano-genipina 0.3%.....	24
Figura 13. Termograma de DSC para Quitosano-genipina 0.1%, Primer calentamiento	26
Figura 14. Termograma de DSC para Quitosano-genipina 0.2%, Primer calentamiento ...	26
Figura 15. Termograma de DSC para Quitosano-genipina 0.3%, Primer calentamiento ...	27
Figura 16. Termograma de DSC para Quitosano-genipina 0.1%, Segundo calentamiento	28
Figura 17. Termograma de DSC para Quitosano-genipina 0.2%, Segundo calentamiento	28
Figura 18. Termograma de DSC para Quitosano-genipina 0.3%, Segundo calentamiento..	29

1. RESUMEN DEL PROYECTO

La finalidad de éste proyecto fue elaborar un material polimérico que pueda ser un candidato potencial para constituirse como matriz de liberación controlada de fármacos y que responda de forma diferencial frente a cambios en el entorno como el pH.

Para ello, se sintetizaron tres hidrogeles de quitosano con distinto porcentaje de agente reticulante, Genipina, 0.1%, 0.2% y 0.3% (masa de genipina/volumen total de solución). Se caracterizaron las estructuras químicas de los materiales obtenidos mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR). Los espectros de los xerogeles demostraron la presencia de los grupos funcionales esperados para los materiales: amina terciaria (R_3-N) y amida ($-CONH$), demostrando el entrecruzamiento entre el quitosano y la genipina.

Los materiales demostraron ser sensibles al pH, incrementando el grado de hinchamiento a medida que la cantidad de quitosano también lo hizo. Por otro lado, el grado de hinchamiento en los diferentes materiales disminuyó a medida que aumentó la cantidad de genipina, debido a que la densidad de entrecruzamiento de la red incrementó, reduciendo los espacios intermoleculares y limitando la capacidad de absorber las moléculas de agua.

Las temperaturas de transición vítrea de los hidrogeles determinadas por calorimetría diferencial de barrido (DSC), se encontraron alrededor de 170 °C, cuyo valor es mayor a sus componentes por separado. Esto concuerda con lo reportado en otras investigaciones, ya que usualmente la Tg de un material suele incrementarse cuando se combina física o químicamente con otro.

Las cinéticas de liberación de Venlafaxina HCl desde los diferentes polímeros sintetizados, se ajustaron a un modelo cinético semi-empírico desarrollado por Korsmeyer-Peppas, y mostró que el proceso de liberación para los tres polímeros es de tipo anómalo o no-fickiano.

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

2.1 Planteamiento del problema y justificación de la investigación

El diseño y aplicación de sistemas de liberación modificada de un determinado fármaco es actualmente uno de los aspectos de mayor relevancia en el desarrollo de nuevas formas de medicación. La utilización de materiales poliméricos como soportes de fármacos para regular y dosificar su liberación es una perspectiva que ha adquirido gran interés a nivel mundial. (5)

Actualmente se emplean diferentes métodos para mejorar la acción del fármaco, siendo uno de los más importantes y estudiados la liberación controlada mediante el empleo de matrices poliméricas, como los hidrogeles de quitosano. (7). El objetivo principal de la liberación controlada es simple, conseguir la cantidad correcta del agente activo, en el momento adecuado y en el lugar preciso. Este método de liberación se usa habitualmente para prolongar el tiempo que la dosis terapéutica está presente de forma efectiva utilizando una única dosis, y para eliminar o minimizar las concentraciones que exceden los requerimientos terapéuticos. (24) En el caso ideal, el objetivo es conducir a la existencia de una concentración uniforme de fármaco y a lograr la ausencia de efectos secundarios, es por esto, que los materiales poliméricos permiten liberar de forma controlada fármacos de bajo peso molecular y permiten una gran variedad de rutas de administración (oral, parenteral, transversal, nasal, ocular, etc.). (26) Algunas ventajas de este tipo de sistemas son: evitar la biodegradación del fármaco durante su distribución y posibilitar el acceso del principio activo al sitio de acción. (28)

El quitosano es conocido por ser un polímero o material polimérico, biodegradable, la no toxicidad de sus productos de degradación, bioadhesivo y bacteriostático, ha llamado la atención en campos diferentes incluyendo el farmacéutico, cosmético, médico, agrícola y de alimentos, con múltiples aplicaciones entre las que se mencionan vendajes para heridas e ingeniería de tejidos (12). Por otro lado, la genipina se utiliza ampliamente como agente reticulante del quitosano en la fijación de tejidos, la industria de alimentos y la

administración de fármacos de liberación modificada, debido a que es menos tóxico y tiene mayor biocompatibilidad que otros agentes de reticulación especialmente el glutaraldehído .(25)

La Venlafaxina, es un principio activo que tiene una constante de vida media de 5 horas, lo que condiciona la administración dos o tres veces al día con el fin de mantener los niveles adecuados en sangre (10). El desarrollo de sistemas de liberación controlada para la administración de este fármaco, favorecerá no solo el mantenimiento de concentraciones plasmáticas adecuadas y el logro del efecto terapéutico deseado con los mínimos efectos secundarios, sino además, la adherencia del paciente al tratamiento instaurado.

La finalidad de este proyecto fue proveer conocimiento sobre la síntesis del hidrogel, la cinética de hinchamiento a diferentes condiciones de pH y la cinética de liberación de la venlafaxina, utilizando los hidrogeles de quitosano como matriz de liberación controlada. También se pretendió evidenciar la influencia que tiene la concentración del agente reticulante del polímero, en este caso genipina, en las cinéticas de hinchamiento y de liberación del fármaco en estudio.

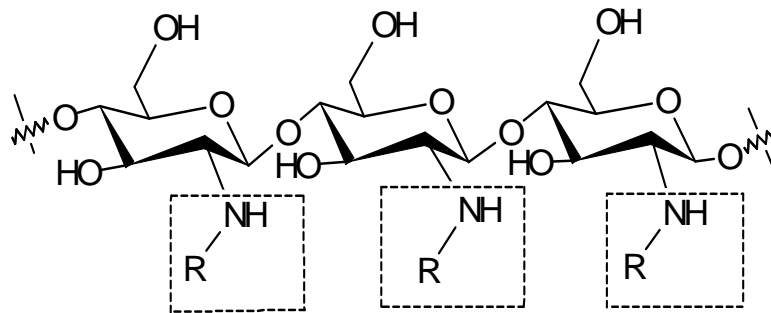
2.2 MARCO TEÓRICO

Muchos de los métodos disponibles en la literatura para obtener derivados estructurales de quitosano, consisten en promover la reticulación de las cadenas poliméricas de este biopolímero, una estrategia que da al quitosano propiedades atractivas tales como, mayor resistencia a la disolución en medio ácido, menor carácter hidrófilo, generación de estructuras poliméricas densas o porosas y la reducción de la reactividad química del hidrogel preparado.(22) Frente a estas nuevas propiedades, muchas aplicaciones pueden vincularse al quitosano: fabricación de resinas para la extracción en fase sólida de iones metálicos, colorantes y contaminantes orgánicos, desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos y biosensor basado en inmovilización de enzimas o células vivas en películas reticuladas de quitosano. (23)

El quitosano es un heteropolisacárido obtenido a partir de la N-desacetilación de la quitina, uno de los biopolímeros más abundante después de la celulosa. Se extrae principalmente de conchas y exoesqueletos de los crustáceos. (1)

Químicamente es un copolímero del tipo amino-polisacárido compuesto por *D*-glucosamina y *N*-acetil-*D*-glucosamina [poli(N-acetil-*D*-glucosamina)]. (26).

El quitosano actúa como una base débil, con un pKa de los grupos aminos protonados en las unidades de Glucosamina que oscilan entre 6,3 y 7,2. Está influenciado por el grado de desacetilación y la densidad de la carga. Así, el valor pKa tiende a disminuir al aumentar el grado de desacetilación y en consecuencia, algunos procesos de reticulación tienden a cambiar ligeramente el valor de la constante de acidez. (1). Ver Figura 1



Quitina: $R = \text{COCH}_3$

Quitosano: $R = \text{H}$ (*GlcN*) o COCH_3 (*GlcNAc*)

Figura 1. Estructura química de Quitosano

El quitosano es el biopolímero natural, con mayor carácter catiónico, ya que la mayoría de polisacáridos animales o vegetales tienen carácter neutro (celulosa, dextrano, almidón) o aniónico (alginato, carragenano, xantano). Además, algunas de las funciones particulares de quitosano están directamente relacionadas con su carácter de electrolito, incluyendo algunos procedimientos de reticulación de sus cadenas. (1)

La reticulación de las cadenas poliméricas de quitosano, un proceso también llamado entrecruzamiento, es un tipo de modificación química que tiene como objetivo combinar sus cadenas poliméricas, o incluso, combinar las cadenas de otros polímeros generando redes poliméricas híbridas. Este procedimiento se lleva a cabo a través de la reacción entre los sitios reactivos específicos presentes en las unidades estructurales de quitosano y algunos reactivos de reticulación. (34)

Las reacciones de reticulación están destinadas principalmente a modificar ciertas propiedades del polímero, tales como estabilidad química y térmica, rigidez estructural, permeabilidad, eficiencia en quelación y capacidad de inmovilización de proteínas.(4) El proceso de reticulación está influenciado por algunas propiedades fisicoquímicas del quitosano utilizado, por lo tanto, el grado de desacetilación, masa relativa, alta temperatura de reacción y tiempo, generalmente favorecen las reacciones y por lo tanto promueve un

mayor grado de reticulación.(35) La reticulacion tambien está influenciada por el tipo y la concentración del agente de reticulación empleado puesto que el aumento del grado de reticulación, reduce la porosidad del material, la permeabilidad al agua y la difusión de posibles sustancias atrapadas en la red de polímero formado. (37)

Hay algunas finalidades que justifican la realización de este tipo de modificación química del quitosano, entre las cuales se pueden mencionar las siguientes: la fabricación de adsorbentes y resinas de pre-concentración requiere biopolímeros resistentes a condiciones fuertemente ácidas, por lo tanto, la reticulación química es capaz de impartir esta propiedad a los polímeros. El desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos exige matrices permeables al agua, capaces de atrapar, transportar y liberar sustancias de manera eficiente, siendo los materiales reticulados apropiados para suplir estas necesidades. Sin embargo, el uso de estos derivados para aplicaciones farmacéuticas (sistemas de liberación controlada) y biomédicas (ingeniería de tejidos y cultivos celulares) se ve limitado por el uso de agentes de reticulación. (39)

En la búsqueda de una solución a este problema, algunos investigadores centraron sus estudios en el descubrimiento de agentes de entrecruzamiento menos citotóxicos y más biocompatibles. Así es como la genipína, un producto natural aislado de *Genipa americana* y *Gardenia jasminoides*, se introdujo como un entrecruzante químico eficaz del quitosano. El nombre químico de la genipina es: (1*R*,2*R*,6*S*)-2-Hidroxi-9-(hidroximetil)-3-oxabicyclo[4.3.0]nona- 4,8-dieno-5-carboxilato de metilo (27). Ver Figura 2

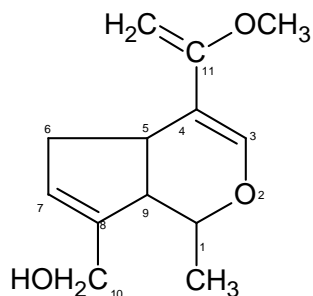


Figura 2. Estructura química de la Genipina

El mecanismo de reticulación de las cadenas poliméricas de quitosano por genipina está influenciado por el pH del medio. Por lo tanto, se pueden producir dos procedimientos de reticulación químicos: uno en ácido o neutro y el otro en medio alcalino. Ver Figura 3 , Figura 4 y Figura 5

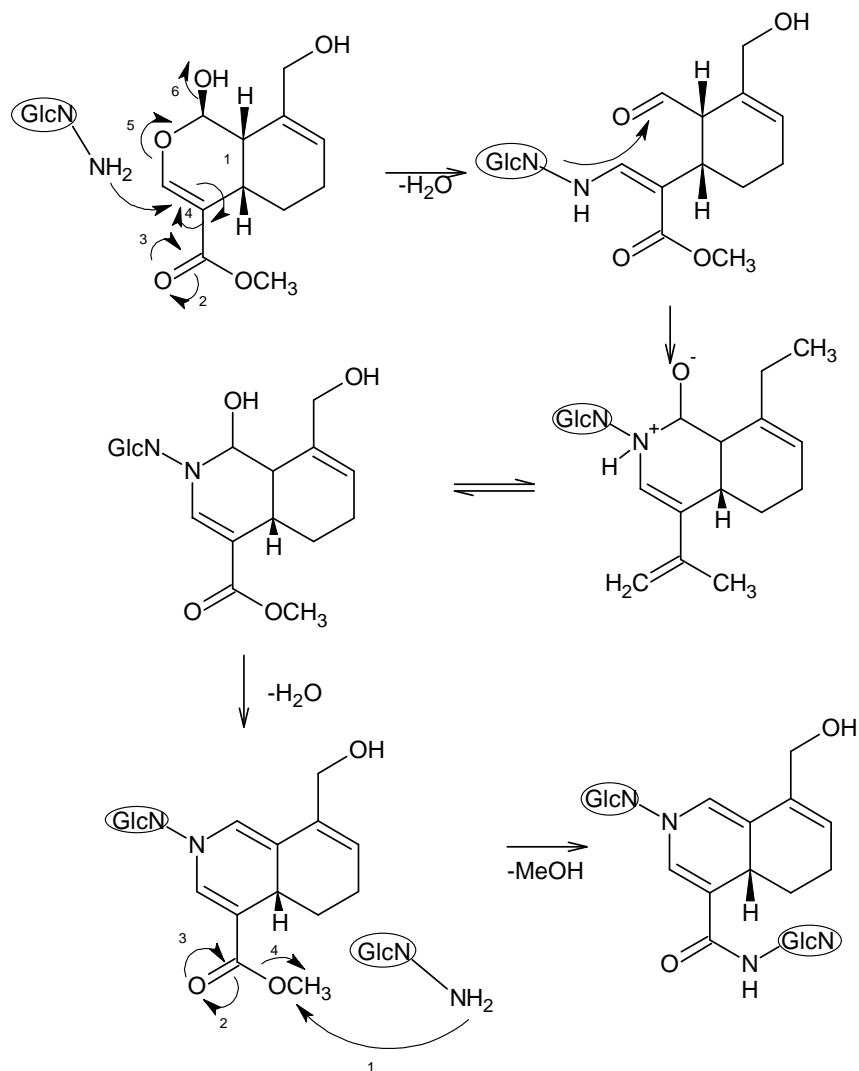


Figura 3. Mecanismo de reacción de la reticulación de Quitosano con Genipina en medio ácido.

El mecanismo de reacción en medio ácido sugiere inicialmente un ataque nucleófilo, del grupo amino del quitosano al carbono olefínico (C-3) de la genipina con la consiguiente apertura del anillo di-hidropiránico y la generación de una función aldehído en la molécula de entrecruzante. El grupo aldehído luego reacciona con la amina secundaria recién

formada para generar un nuevo anillo heterocíclico. En el paso final de la reticulación se produce una sustitución nucleófila por parte de la amina primaria del biopolímero al éster, formando una amida y eliminando metanol. (1)

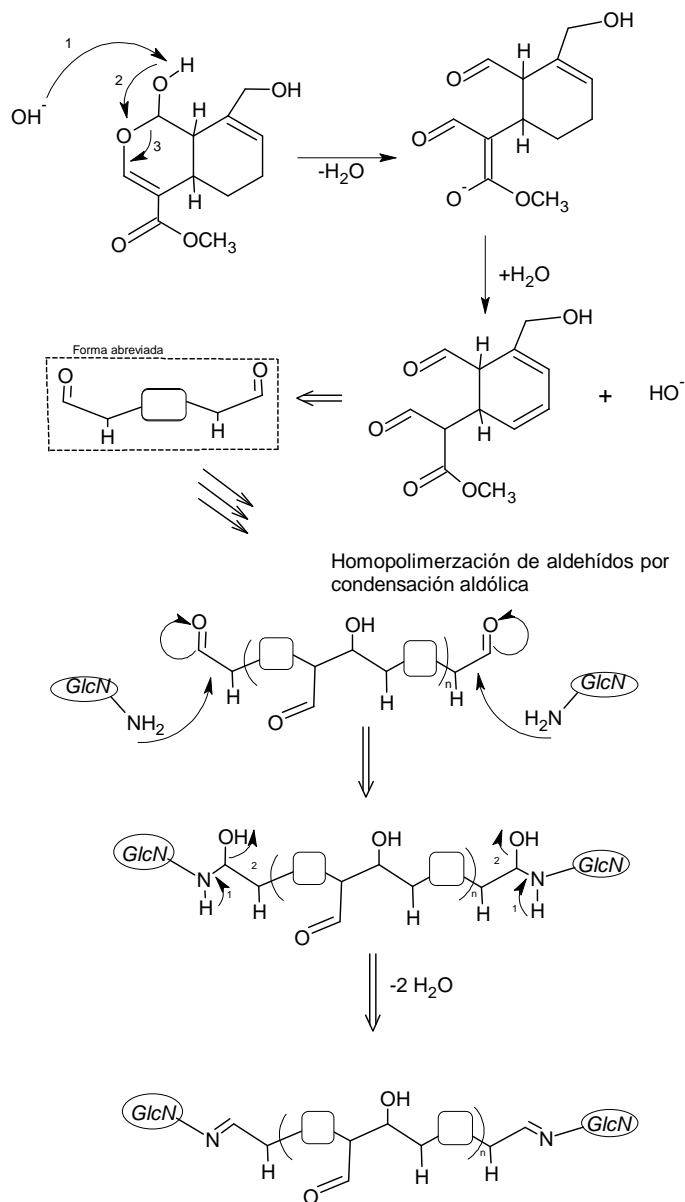


Figura 4. Mecanismo de reacción de la reticulación de Quitosano con Genipina en medio básico

La reticulación de quitosano con genipina en solución acuosa alcalina es precedida por una reacción de homopolimerización del agente reticulante por medio de una adición aldólica. En el paso final los grupos aldehidos terminales de la genipinas polimerizadas participan en una reacción de Schiff con las aminas de las cadenas de quitosano para promover la reticulación.(42)

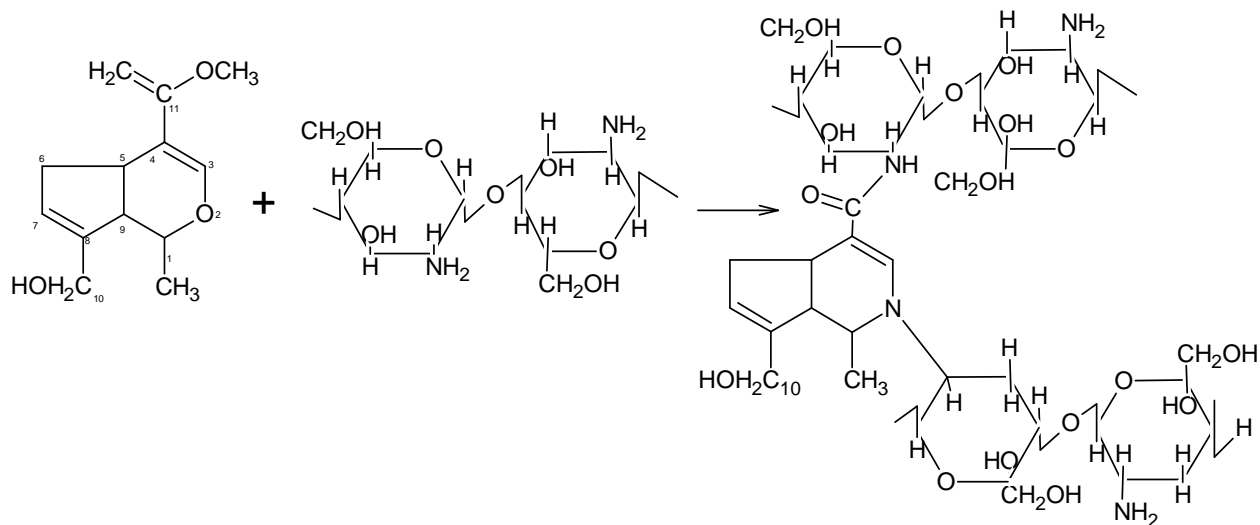


Figura 5. Quitosano reticulado con Genipina

Los hidrogeles de quitosano tienen un enorme potencial para el uso en formas de dosificación farmacéuticas debido a sus propiedades de polielectrolito, a los grupos funcionales reactivos, a la capacidad de formación de gel, a la alta capacidad de adsorción, la biodegradabilidad y la biocompatibilidad con los tejidos vivos. (46)

Estas propiedades proporcionan idoneidad y extensas aplicaciones farmacéuticas tales como la preparación de sistemas de liberación de fármacos, péptidos, factores de crecimiento, medicamentos anti-inflamatorios y antibióticos destinados a ser administrados en vías no parenterales (oral, tópica, intranasal, vaginal, rectal y ocular). Aplicaciones interesantes del quitosano han recibido una atención considerable, ya que han desarrollado sistemas más versátiles y novedosos; además, el reciente desarrollo de la nanotecnología y

el incremento en los diversos procesos de funcionalización del quitosano han, mejorando su funcionalidad como transportador de fármacos. (40)

2.2.1. Generalidades del Principio Activo Venlafaxina HCl

La Venlafaxina es un antidepresivo de la clase inhibidor de la recaptación de serotonina y noradrenalina, tiene licencia para el tratamiento del trastorno depresivo mayor (MDD), el trastorno de ansiedad generalizada y las indicaciones de comorbilidad en ciertos trastornos de ansiedad con depresión. La eficacia de este fármaco en una aplicación específica, requiere la utilización de unas concentraciones adecuadas del mismo en unas dosis diarias lo menos frecuentes posibles. (9) Ver Figura 6

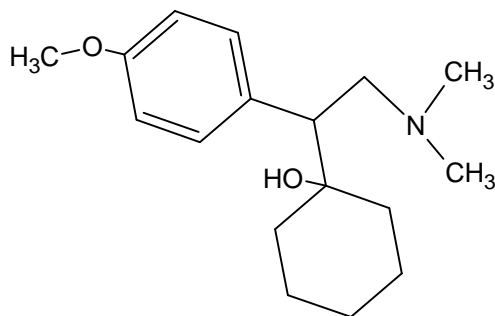


Figura 6. Estructura química de la Venlafaxina

Químicamente la Venlafaxina es un 2-fenil -2(-1-hidroxicicloalquilo) derivado de la etilamina que no está químicamente relacionado con los tricíclicos, los tetracíclicos u otros antidepresivos disponibles. Consta de una estructura mixta en racimo con las designaciones químicas de (R/S) -1-2 {dimetilamino)-1-(4metoxifenil)} ciclohexanol clorhidrato o (±)-1-(α-((dimetilamino) metil)-p-metoxibenzil} ciclohexanolclorhidrato. Tiene la fórmula empírica de C₁₇H₂₇NO₂.HCl y un peso molecular de 313.87. La Venlafaxina clorhidrato es un sólido cristalino blancuzco que apenas es soluble en agua. (9)

2.2.2. Temperatura de Transición vítrea Tg.

Existen tres tipos de polímeros basados en el grado de cristalinidad: amorfos, cristalinos y semicristalinos. Los polímeros amorfos se caracterizan porque en estado sólido sus cadenas se encuentran dispuestas totalmente de forma aleatoria. En los polímeros completamente cristalinos todas las cadenas han sido incorporadas en regiones tridimensionales perfectas, llamadas cristales. Sin embargo, en la práctica este tipo de polímeros no se encuentran. Finalmente, los polímeros semicristalinos son aquellos que contienen ciertas proporciones de regiones ordenadas y desordenadas de sus cadenas (26).

Con base en el grado de cristalinidad de los polímeros se pueden observar diversas propiedades térmicas entre ellas la temperatura de transición vítrea (Tg). (25)

La temperatura de transición vítrea (Tg) es la temperatura en la cual la región amorfa toma las propiedades características del vidrio (estado vítreo). Por debajo de esta temperatura el polímero aumenta su densidad, dureza y rigidez. Se comporta como un sólido rígido y se vuelve quebradizo. Esta es una propiedad que se observa en polímeros amorfos y semicristalinos. (28)

2.2.3. Cinéticas de hinchamiento de los hidrogeles.

Para llevar a cabo el estudio de las cinéticas de hinchamiento de los materiales poliméricos, suelen utilizarse diversas formas de expresión del hinchamiento dependiendo del interés que se tenga en la investigación. A continuación se explican dos de las más usadas.

El porcentaje de hinchamiento, W%, que a diferentes tiempos está definido por:

$$W\% = \frac{m-m_0}{m} \times 100 \quad (1)$$

Donde m y m₀ corresponden al peso del hidrogel y del xerogel, respectivamente.

La otra forma de representar la cantidad de agua retenida dentro del hidrogel es a través del porcentaje de agua en el gel, H%, que está definido por la siguiente expresión:

$$H\% = \frac{m-m_0}{m_0} \times 100 \quad (2)$$

Por otro lado, para evaluar la cinética de estudios de tiempos muy largos, el espesor de la pastilla del hidrogel no permanece constante, por esto el comportamiento de hinchamiento de los polímeros sintetizados se ajusta a una cinética de segundo en orden, en donde el recíproco del hinchamiento (t/W_t) está relacionado con el tiempo de tratamiento de acuerdo a la siguiente ecuación lineal o modelo de Scott (21):

$$\frac{t}{W_t} = A + Bt \quad (3)$$

Donde W_t es el hinchamiento a un tiempo t , al graficar t/W_t versus t , del intercepto de la línea recta se puede calcular la constante de hinchamiento K y el hinchamiento en el equilibrio W_∞ , ya que (21):

$$A = \frac{1}{k W_\infty^2} \quad B = \frac{1}{W_\infty}$$

Con este modelo se calculan los valores de W_∞ y H_∞ , para cada polímero en las diferentes condiciones de pH.

2.2.4. Modelo Cinético semi- empírico desarrollado por Korsmeyer- Peppas .

Kormeyer derivó una relación simple que describe la liberación de un fármaco desde un sistema polimérico. Para encontrar el mecanismo de liberación del fármaco, los datos de liberación hasta el 60%, se deben ajustar al modelo, Korsmeyer-Peppas (23).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (4)$$

Donde M_t/M_∞ es la fracción de fármaco liberado al medio a un tiempo, M_t y M_∞ son las concentraciones de fármaco liberado en el tiempo t y en el infinito, respectivamente. K es una constante característica del sistema de liberación y n es el exponente de liberación que depende de la geometría del sistema y el mecanismo físico de la liberación. Diferentes autores consideran que esta ecuación se puede ver como una generalización de dos mecanismos aparentemente independientes de transporte de componentes activos: una difusión de Fick y un transporte caso II. Para sistemas de hidrogel donde $n = 0.5$ se considera que el proceso es Fickiano o controlado por difusión, cuando $n = 1$ se considera un caso II, el cual se caracteriza por ser un proceso controlado principalmente por hinchamiento, cuando $0.5 < n < 1$ se considera un proceso anómalo o no Fickiano y cuando $n > 1$ se considera un súper caso II. (23)

Al aplicarle logaritmo natural a la ecuación (4), se convierte en la siguiente ecuación lineal (5):

$$\text{Ln} \left(\frac{M_t}{M_\infty} \right) = \text{Ln} (k) + (n)\text{Ln}(t) \quad (5)$$

La ecuación (5), se utiliza para evaluar los exponentes de liberación n y las constantes de liberación K .

2.3 OBJETIVOS

2.3.1. Objetivo general

Obtener hidrogeles de quitosano entrecruzados con genipina y estudiar su aplicabilidad en la liberación controlada del fármaco antidepresivo (Venlafaxina HCl).

2.3.2. Objetivos específicos

1. Sintetizar hidrogeles de quitosano, con diferentes proporciones de reticulante (Genipina).
2. Caracterizar la estructura de los materiales poliméricos obtenidos mediante espectroscopia FTIR.
3. Determinar las propiedades térmicas de los materiales poliméricos mediante la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC).
4. Evaluar las cinéticas de hinchamiento a diferentes condiciones de pH y de liberación de venlafaxina HCl a partir de los hidrogeles obtenidos.
5. Evaluar las cinéticas de liberación de venlafaxina HCl *in vitro* a partir de los hidrogeles obtenidos.

2.4 METODOLOGÍA PROPUESTA

2.4.1. Materiales

Quitosano de bajo peso molecular (QN; Aldrich, 85% de desacetilación), Genipina (extraída en el trabajo de grado, “Extracción, caracterización y valoración de genipina a partir del fruto de la Genipina Americana”, con un rendimiento del 45%), Ácido acético glacial (pureza 99% Merck), Venlafaxina estándar secundario (Hyper Chem, pureza 99,5%), Metanol (grado HPLC Merck), Fosfato monobásico de potasio (99.9 % Merck), Cloruro de sodio (99.8% Merck), Cloruro de potasio (99.9% Merck), Fosfato dibásico de sodio (99.8% Merck) y Agua tipo II.

2.4.2. Equipos.

Balanza analítica METTLER TOLEDO, Cabina de extracción Frontier Maca ESCO, Pipa de Nitrógeno, Sonicador Cole-parmer 8892, Horno Binder, FT-IR Nicolet 6700, Baño termostático Centrocí (industrias), equipo DSC TA- Instruments modelo Q2000, UV-VIS Shimadzu y Disolutor Hanson.

2.4.2.1 Síntesis de los hidrogeles de quitosano con genipina

La síntesis de los hidrogeles se llevó a cabo a tres concentraciones diferentes de agente entrecruzante (Genipina): 0.1%, 0.2% y 0.3% (p/v). El efecto de estas concentraciones del agente entrecruzante fue investigado. (2)

La solución de quitosano al 3.0 % p/v, fue preparada disolviendo 6,0 g de quitosano en 200 mL de una solución al 2.5 % v/v de ácido acético. Como consecuencia de la hidrólisis del grupo N-acetilo de la quitina, el quitosano presenta una mayor basicidad y es soluble en soluciones ácidas diluidas (acéticas, fórmicas, clorhídricas, entre otros), esto también es debido, a que el pKa del grupo amino protonado del quitosano es de 6,5 y con ello la protonación en medio ácido que le confiere un carácter altamente reactivo. (4)

Por último, se tomaron tres porciones de 40 mL de la solución de quitosano y a cada una se le añadió la cantidad de Genipina correspondiente (predisuelta en 1mL de metanol), para obtener los 3 diferentes grados de entrecruzamiento. Cada reactivo se añadió después de homogenizar la mezcla. (4)

La cantidad de cada reactivo empleado para la síntesis de los hidrogeles se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Cantidad de quitosano y genipina utilizados para la preparación de los hidrogeles.

<i>Material</i>	<i>Quitosano(mg/40mL)</i>	<i>Genipina (mg/40mL)</i>
<i>Quitosano-genipina 0.1%</i>	1200	40.0
<i>Quitosano-genipina 0.2%</i>	1200	80.0
<i>Quitosano-genipina 0.3%</i>	1200	120

Con el fin de eliminar la mayor cantidad posible de burbujas de las diferentes mezclas, estas se llevaron a ultrasonido por aproximadamente 5 minutos. Cuando se observó que las soluciones se iban tornando azules, debido al entrecruzamiento del quitosano con la genipina, se vertieron sobre cajas petri plásticas y se introdujeron al horno a 45°C por 48 horas, de acuerdo a. (26) Estos materiales se cortaron con un sacabocados de 1 cm de diámetro y se sometieron a un proceso de secado en el horno a 30°C durante 72 horas aproximadamente, finalmente, se almacenaron para sus posteriores análisis. (4)

Es importante aclarar que en este trabajo se sintetizaron hidrogeles con el principio activo (Venlafaxina HCl) para los ensayos de liberación, y sin principio activo para los ensayos de hinchamiento a pH 4.5 y 7.6, caracterización estructural por FT-IR y propiedades térmicas.

Se estimó la cantidad de principio activo que cada pastilla o cilindro de hidrogel debería contener. Para ello se tuvo en cuenta la mínima cantidad de principio activo de las presentaciones comerciales actualmente (Venlafaxina tabletas x 18,75mg), es así como se

definió una cantidad de 15mg aproximadamente. Seguidamente se procedio a derterminar el volumen del cilindro resultante del corte con el sacabocados, con el fin de asegurar la concentración necesaria en el volumen total de este.

$$V = h \times \pi r^2 \quad (6)$$

$$V = \pi(0.6 \text{ cm})^2 \times 0.3 \text{ cm} = 0.34 \text{ cm}^3 = 0.34 \text{ mL}$$

Conociendo el volumen del hidrogel y asumiendo que se tiene una cantidad de 15 mg de Venlafaxina HCl por pastilla, se calculo la cantidad de principio activo por mililitro.

$$\text{Concentración de Venlafaxina HCl} = \frac{15\text{mg}}{0.34\text{mL}} = 44.118\text{mg} / \text{mL}$$

Teniendo definida la concentración de Venlafaxina HCl por cada pastilla de hidrogel, se procedió a calcular la cantidad total de principio activo necesaria para asegurar esta misma concentración en un volumen de 200mL.

$$\text{Cantidad total de fármaco requerido para preparar 200mL de solución a } 44.118\text{mg/mL} = 44.118 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times 200 \text{ mL de solución} = 8823.6 \text{ mg de Venlafaxina HCl.}$$

La solución de quitosano con principio activo se preparó de la siguiente manera: a un beaker de 250 mL de agua se le adicionaron 8.8236 g de Venlafaxina HCl y 150 mL de solución al 2.5 % v/v de ácido acético, está mezcla se sometió a agitación magnética hasta que se disolvió totalmente el principio activo, luego se adicionaron 6.0 g de quitosano y se completó a 200 mL con la misma solución de ácido acético al 2.5 % v/v para su disolución.

Por último, se tomaron nuevamente tres porciones de 40 mL de la solución de quitosano – Venlafaxina HCl y a cada una se añadió la cantidad de Genipina correspondiente (predisuelta en 1mL de metanol), necesaria para obtener tres grados de entrecruzamiento diferentes. Cada reactivo se añadió después de homogenizar la mezcla. (4)

Las diferentes mezclas (Quitosano, Venlafaxina HCl y Genipina) se sometieron al mismo procedimiento utilizado para preparar los hidrogeles sin principio activo.

2.4.2.2. Caracterización estructural de quitosano, genipina y de los hidrogeles reticulados con genipina.

Los análisis de FT-IR se realizaron en un espectrofotómetro marca Thermo Fisher Scientific, modelo Nicolet 6700, mediante el método de pastilla de KBr. Por lo tanto, se requirió pulverizar cada uno de estos y se hizo utilizando un mortero convencional posteriormente, se tomaron los espectros de los materiales de partida y de los hidrogeles por separado, para observar las señales, características de grupos funcionales de este tipo de polímero antes y después de sufrir entrecruzamiento. (4)

2.4.2.3 Propiedades térmicas de los hidrogeles de quitosano reticulados con genipina.

Se estudiaron las propiedades térmicas de los materiales sintetizados mediante la técnica de DSC, empleando un DSC TA Instruments modelo Q2000, mediante la ayuda del software TA Universal Analysis Instruments. (4) Entre ellas la temperatura de transición vítrea. Las muestras fueron analizadas bajo atmósfera de nitrógeno y se realizaron tres barridos: el primero, un calentamiento de 10 a 200°C; el segundo, un enfriamiento de 200 a 10°C; y el tercero, un calentamiento de 10 a 200°C, a una velocidad de calentamiento de 5 °C/min. (4). Se ampliará esta información en la discusión de resultados.

2.4.2.4. Cinéticas de hinchamiento de los hidrogeles de quitosano reticulados con genipina a pH 4.5 y 7.6

Los estudios de hinchamiento a pH 4.5 y 7.6, se llevaron a cabo introduciendo las pastillas secas de los materiales (xerogeles), previamente pesados, en un baño termostático con agua destilada a una temperatura de 25°C. Se introdujo una pastilla en cada vaso que contenía una solución Buffer con un pH determinado de 4.5 y 7.6.

El control sobre el proceso de hinchamiento de los polímeros entrecruzados con genipina, se hizo siguiendo el incremento de peso de las pastillas en función del tiempo por lo tanto, las pastillas se extrajeron del baño, se secaron ligeramente con papel filtro y se pesaron en una balanza Mettler ($\pm 1 \times 10^{-4}$ g), los tiempos de pesado fueron: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40,

50, 60, 70, 80, 100, 120, 140,160,180, 200, 220, 240, 260, 300, 320, 360, 380, 420, 440 y 480 minutos. Los experimentos se realizaron por triplicado para cada uno de los materiales, lo que significó el seguimiento de 18 pastillas en total (3 materiales por 3 réplicas por 2 valores de pH)

2.4.2.5. Liberación *in vitro* de venlafaxina HCl desde los hidrogeles.

La liberación *in vitro* de Venlafaxina HCl se llevó a cabo para los tres tipos de hidrogeles, los cuales difieren en la concentración de agente reticulante (genipina) 0.1%, 0.2% y 0.3%.

La liberación de Venlafaxina HCl se realizó mediante el uso de Buffer Fosfato Salino (PBS) pH 7.5, como medio de liberación y muestreos en intervalos de tiempo predeterminados. Un volumen de 500 mL del medio se colocó en un matraz de fondo redondo de 1 L, en un equipo disolutor marca Hanson, con canastillas a 100 rpm. La temperatura del medio de liberación se mantuvo a 37°C.

Los tiempos de muestreo fueron: 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 120, 180, 240, 300, 360 y 420 minutos.

Una muestra del hidrogel de quitosano se depositó en el medio de liberación. A cada periodo de tiempo mencionado anteriormente, se retiraron 5 ml del medio y se analizaron en un UV/vis marca Shimadzu, a una longitud de onda 274 nm. Con el fin de mantener el volumen original se realizó reposición de medio para mantener las mismas condiciones de volumen.

La cantidad de Venlafaxina HCl liberada en cada tiempo *t*, se determinó a partir de una curva de calibración que se construyó empleando diluciones de principio activo, de concentraciones conocidas (0.006 mg/mL-0,06 mg/mL). La gráfica 13, presenta la curva de calibración obtenida para la Venlafaxina HCl, en tanto que la ecuación de la recta de calibrado es:

$$\text{Absorbancia} = 0.0014 \cdot \text{concentración}(\%) + 0.008 \quad (7)$$

Cada uno de estos estudios se realizó por triplicado.

2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.5.1. Síntesis de los hidrogeles de quitosano Reticulados con genipina.

Se obtuvieron tres hidrogeles con distintas concentraciones de agente reticulante (0,1%, 0,2% y 0,3%), de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 2.4.2.1 Estos hidrogeles tenían una coloración azul oscuro, casi negra debido a la reacción de entrecruzamiento, y una consistencia todavía blanda ya que todavía no se habían puesto a secar a 30°C por 72 horas, como muestra la Figura 7.



Figura 7. Fotografía de las pastillas de los hidrogeles de quitosano reticulados con genipina.

Los hidrogeles pasaron por un proceso de secado, disminuyendo de tamaño por la pérdida de agua por lo que obtuvieron, una consistencia muy dura y áspera conservando su color azul oscuro casi negro. De esta forma se obtuvieron los xerogeles que fueron utilizados en los diferentes estudios de este proyecto.

2.5.2. Caracterización estructural de quitosano, genipina y de los hidrogeles reticulados con genipina.

Las Figuras 8, 9, 10, 11 y 12 muestran los espectros FT-IR, con las señales más relevantes atribuidas para: Quitosano, Genipina, Quitosano- genipina (0.1%, 0.2% y 0.3%) respectivamente. Se pueden observar las bandas características de los grupos funcionales de cada uno de los compuestos.

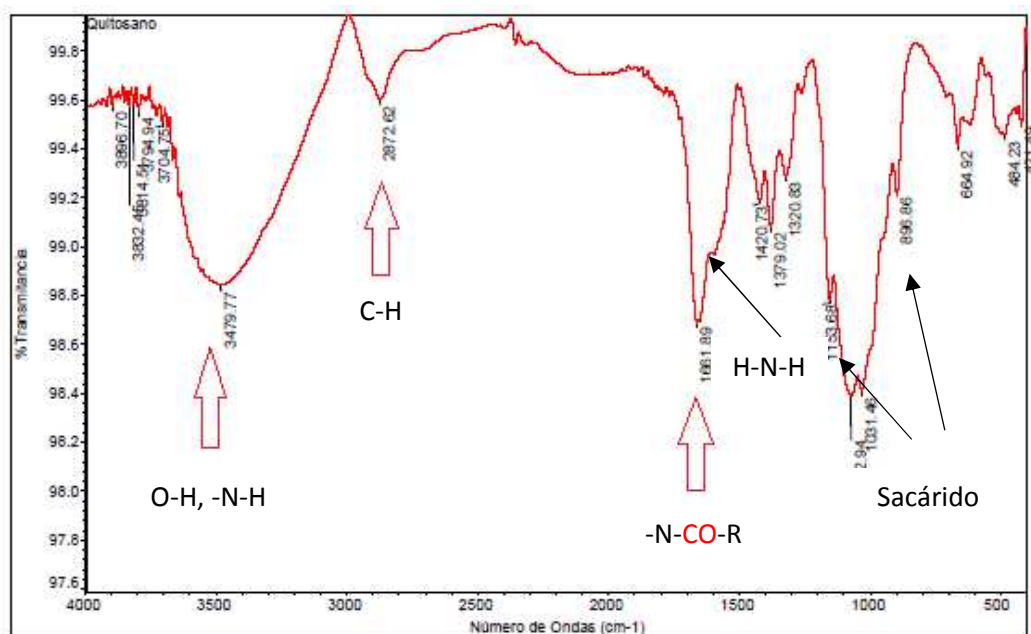


Figura 8. Espectro FT-IR de Quitosano

En la Figura 8 se puede apreciar el espectro FT-IR de quitosano, una señal alrededor de 3500 cm^{-1} intensa y ancha, es atribuida al estiramiento de los enlaces de los grupos funcionales OH y NH_2 . La banda que se encuentra localizada a 2872 cm^{-1} se atribuye al estiramiento de los enlaces C-H de C sp^3 . Se puede observar una banda que aparece a 1661 cm^{-1} (banda amida II), la cual corresponde al grupo carbonilo de la amida de aquellas unidades monoméricas de glucosamina que aún se encuentran acetiladas y a 1547 cm^{-1} que

corresponde a estiramientos del grupo funcional NH_2 . Entre 896 y 1153 cm^{-1} aparecen las bandas correspondientes a la estructura del polisacárido.

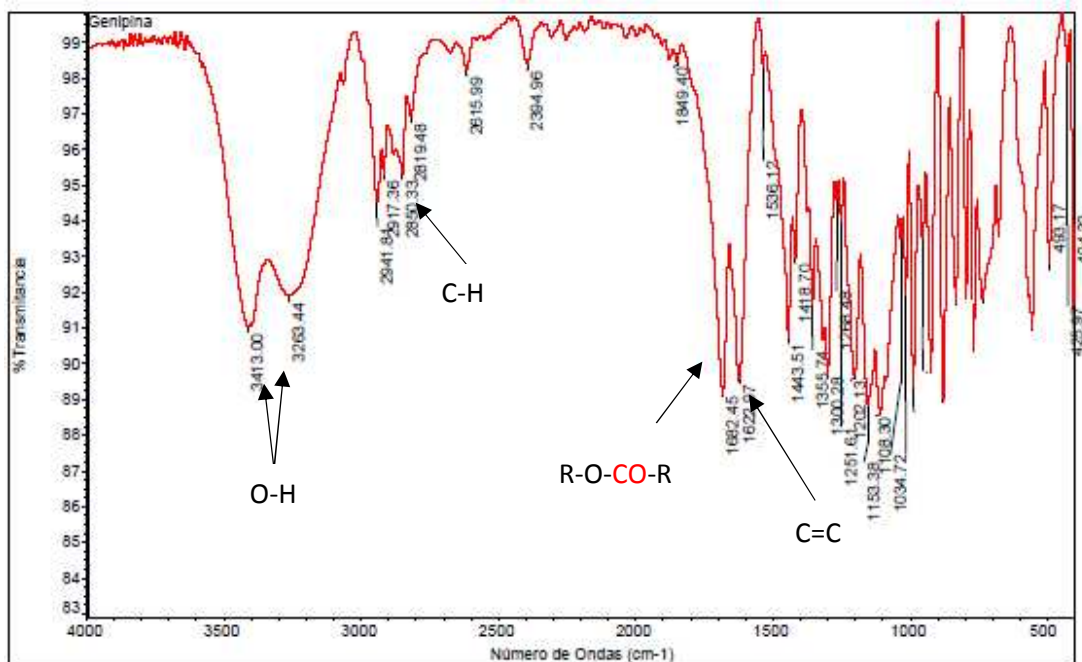


Figura 9. Espectro FT-IR de Genipina

En la Figura 9 se muestra el espectro IR de la genipina. La señal que se encuentra a 3413 cm^{-1} es una vibración de tensión O-H libre y a 3263 cm^{-1} es una vibración de tensión O-H asociado por puentes de hidrogeno. A 2850 cm^{-1} se encuentra una vibración tensión asimétrica C-H para alquenos, a 1661 cm^{-1} se observa la vibración de tensión C=O de éster, y a 1622 cm^{-1} la vibración de tensión C=C.

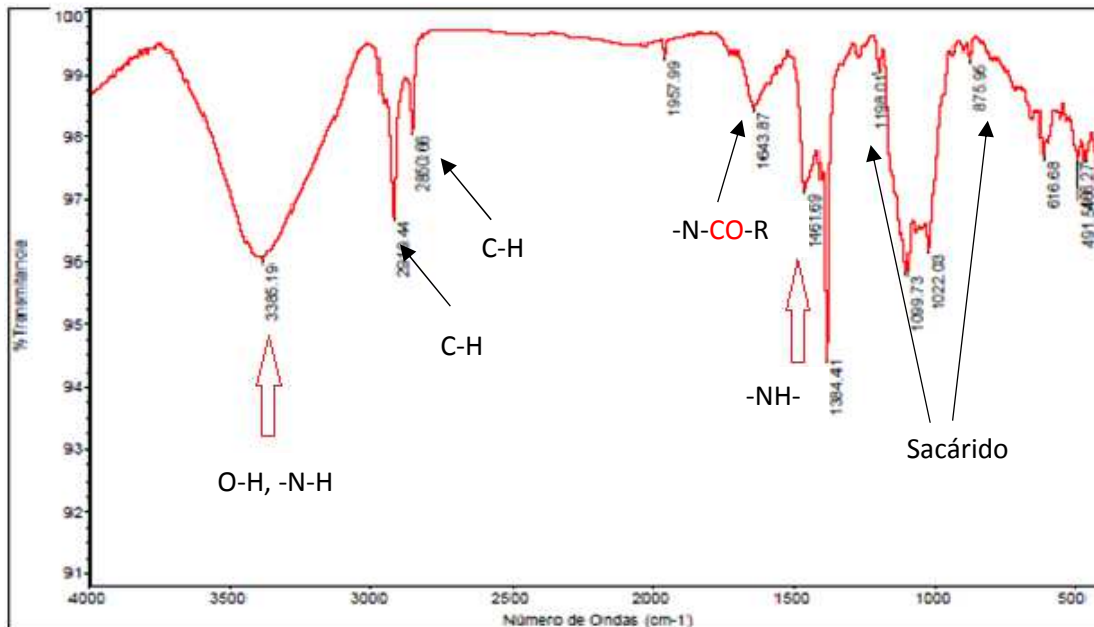


Figura 10. Espectro FT-IR de quitosano-genipina 0.1%.

En la Figura 10 se muestra el espectro FT-IR de quitosano entrecruzado con genipina 0.1% en donde se puede apreciar que la banda a 3413 cm⁻¹ correspondientes a los grupos funcionales OH y NH₂ del quitosano, es más estrecha y menos intensa que la observada en la Figura 8. Esto se debe a que la reacción de entrecruzamiento del quitosano con la genipina, implica la formación de grupos amino terciarios y grupos amidas como se observa en la Figura 3.

El entrecruzamiento del quitosano con la genipina, se confirma por la banda a 1643 cm⁻¹, la cual corresponde al carbonilo de la amida formada, también el desplazamiento de la banda N-H, de 1547 cm⁻¹ a 1461 cm⁻¹, atribuido a la sustitución nucleofílica que este grupo amino del quitosano realiza sobre el átomo de carbono olefinico C-3 de la genipina, seguida por la apertura del anillo de dihidropiranososa y la formación de la amina heterocíclica. (22) Finalmente, se observan las señales típicas de los polisacáridos, las cuales están entre 900 y 1150 cm⁻¹, que son producidas específicamente por los enlaces glucosídicos del quitosano.

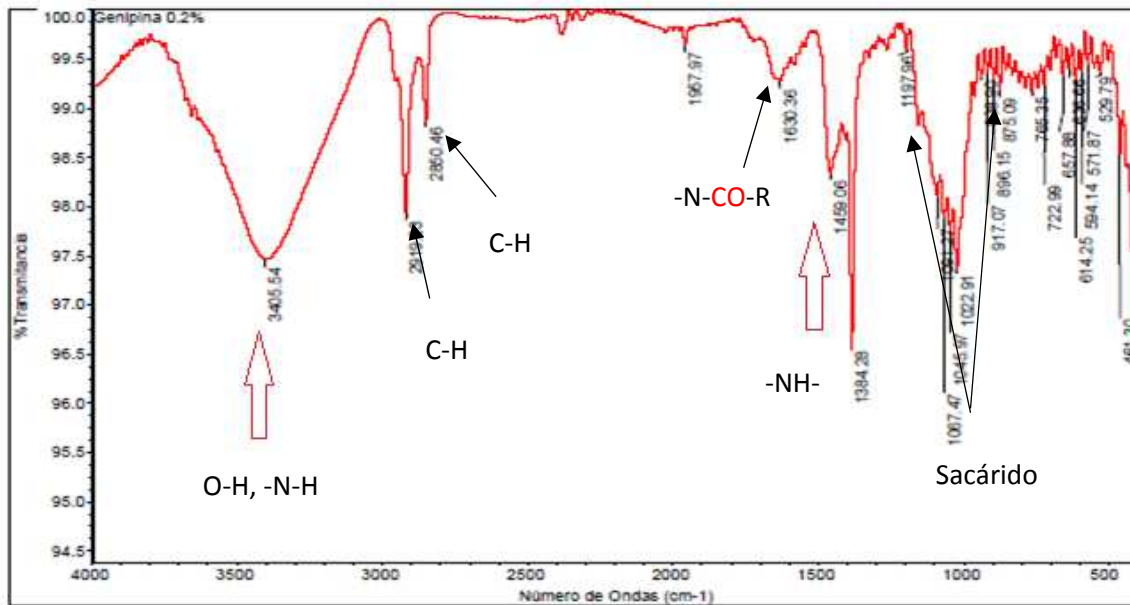


Figura 11. Espectro FT-IR de quitosano-genipina 0.2%.

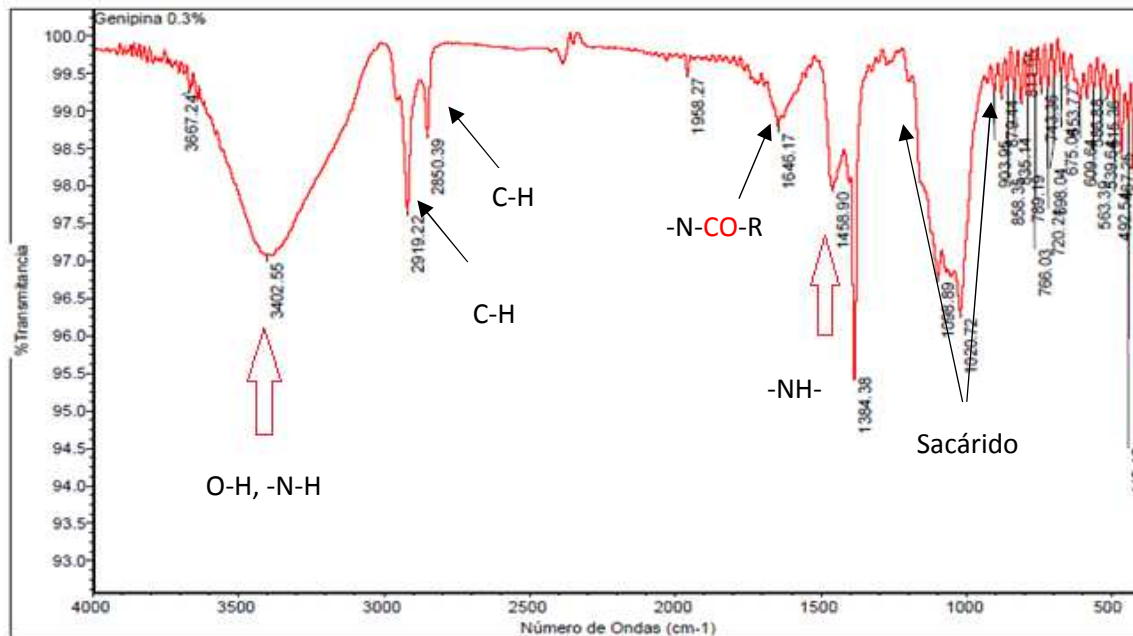


Figura No 12. Espectro FT-IR de quitosano-genipina 0.3%.

Las Figuras 11 y 12, muestran los espectros de FTIR de quitosano entrecruzado con genipina 0.2%, y 0.3%, en ellas se observan las bandas características discutidas para la Figura 9.

Los espectros IR analizados permiten concluir que los materiales poliméricos se han obtenido satisfactoriamente.

2.5.3. Propiedades térmicas de los hidrogeles de quitosano reticulados con genipina.

Los resultados correspondientes al estudio térmico de los hidrogeles de quitosano- genipina se muestran a continuación:

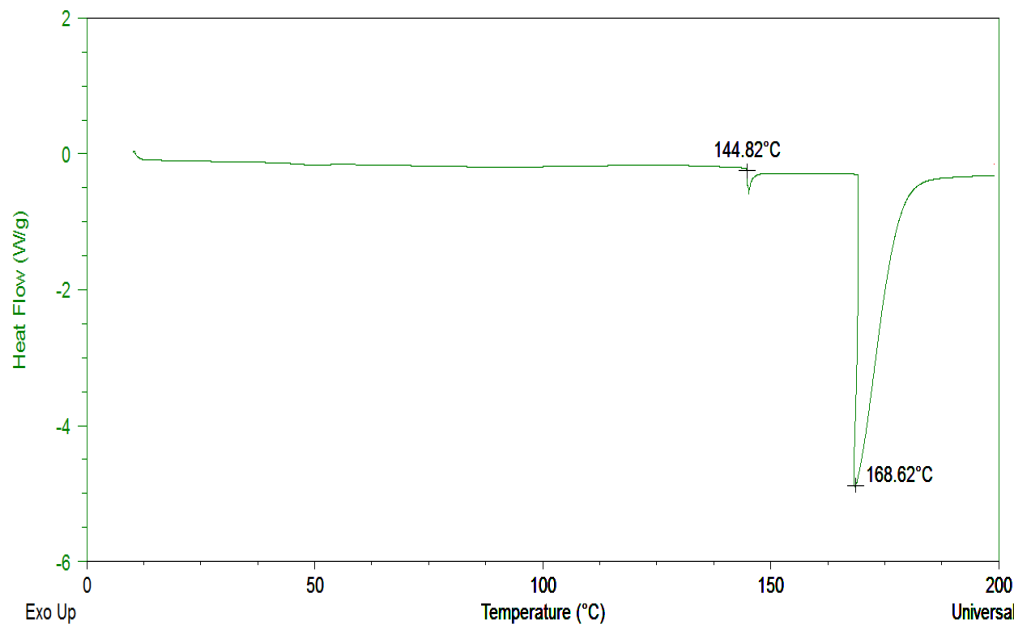


Figura 13. Termograma de DSC para Quitosano-genipina 0.1%, primer calentamiento

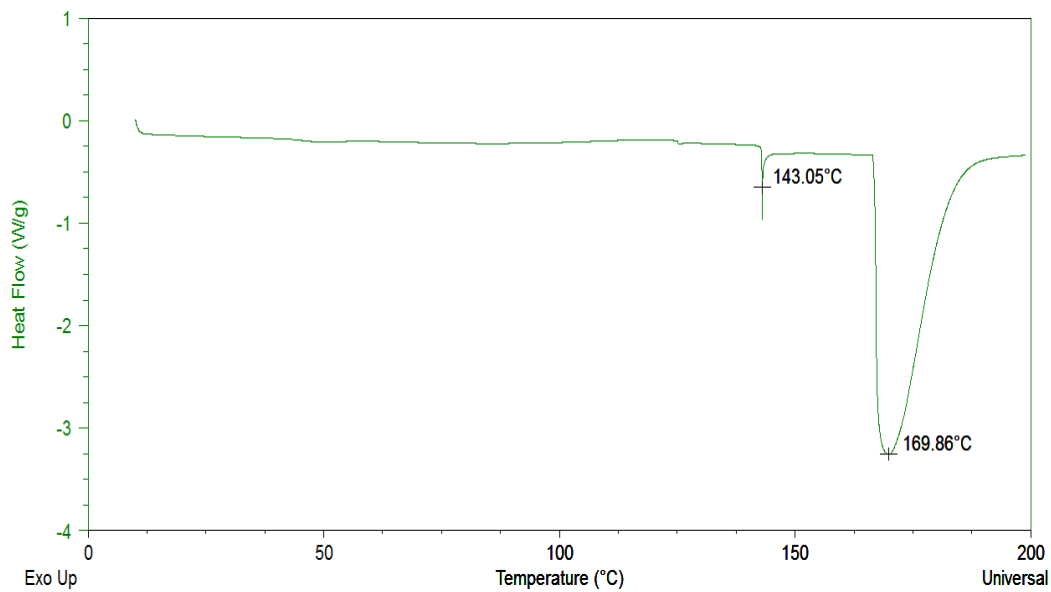


Figura 14. Termograma de DSC para Quitosano-genipina 0.2%, primer calentamiento

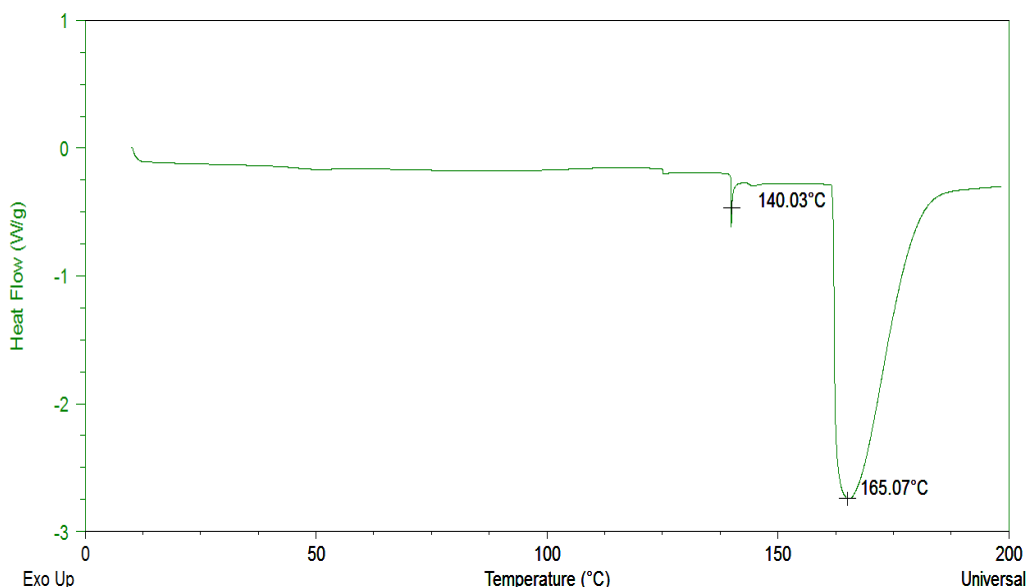


Figura 15. Termograma de DSC para Quitosano-genipina 0.3%, primer calentamiento

En las figuras 13, 14 y 15, se presentan los termogramas de DSC, para los hidrogeles sintetizados, en los cuales se observa el primer calentamiento. Este primer calentamiento se realiza con el fin de eliminar el historial térmico de los materiales, donde ocurren diferentes procesos físicos (evaporación de agua, solventes u otras moléculas pequeñas) y químicos (reacciones de entrecruzamiento). Se puede observar que los hidrogeles de quitosano sintetizados presentan un comportamiento similar.

Todos los materiales poliméricos presentan dos señales endotérmicas de intensidad considerable: uno aproximadamente entre 140 y 145 °C y otro entre 165 y 170 °C. La primera señal probablemente es debido a un proceso de entrecruzamiento adicional, ya que no aparece en el segundo calentamiento.

La segunda señal probablemente es el valor de la Tg de cada hidrogel, puesto que aparece también en el segundo calentamiento.

Una vez el equipo realiza el proceso de enfriamiento, el historial térmico de los materiales se pierde y al realizar el segundo calentamiento debería observarse la temperatura de transición vítrea (Tg) (25).

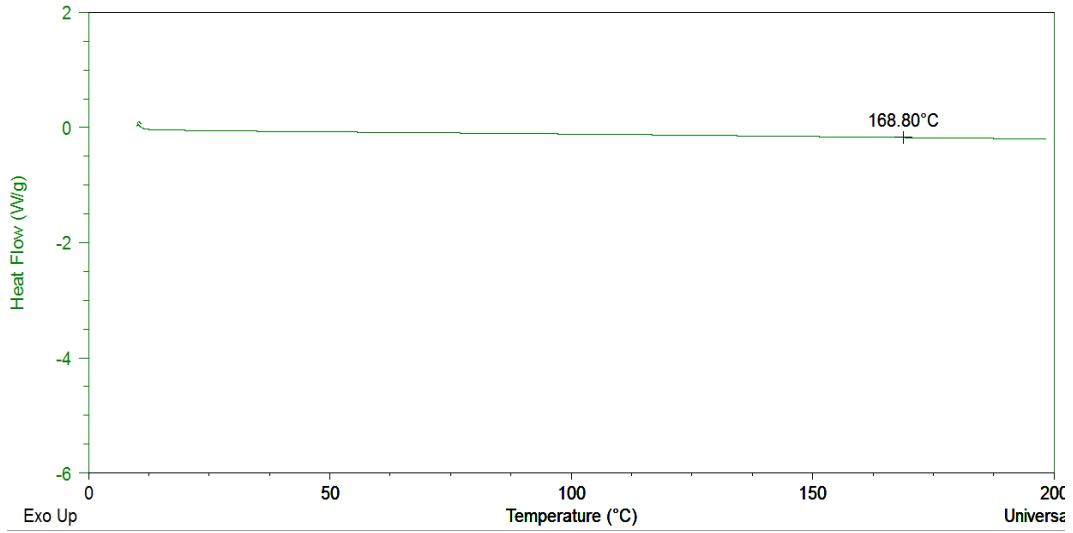


Figura 16 . Termograma de DSC para Qitosano-genipina 0.1%, segundo calentamiento

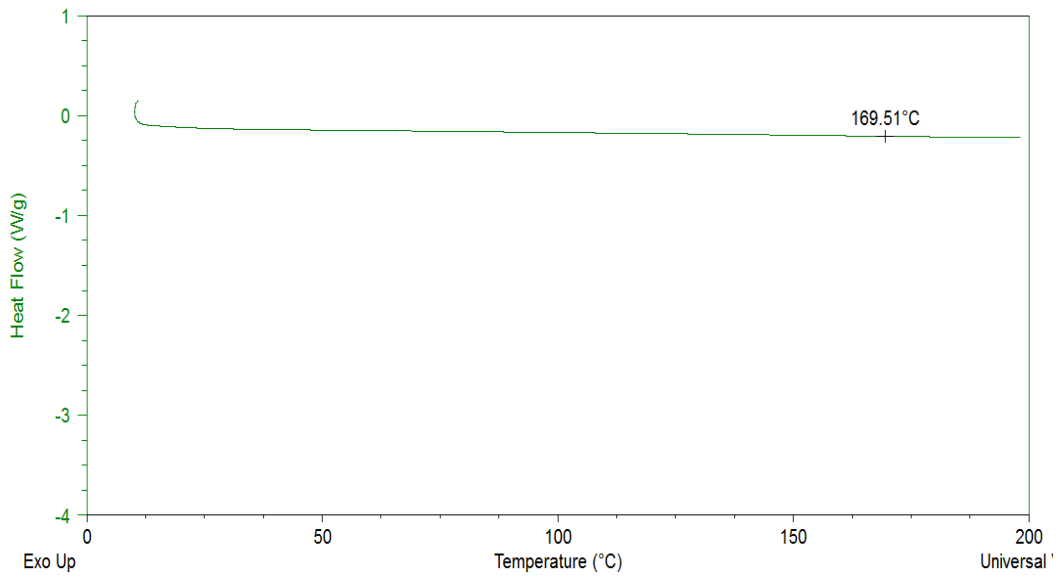


Figura 17. Termograma de DSC para Qitosano-genipina 0.2%, segundo calentamiento

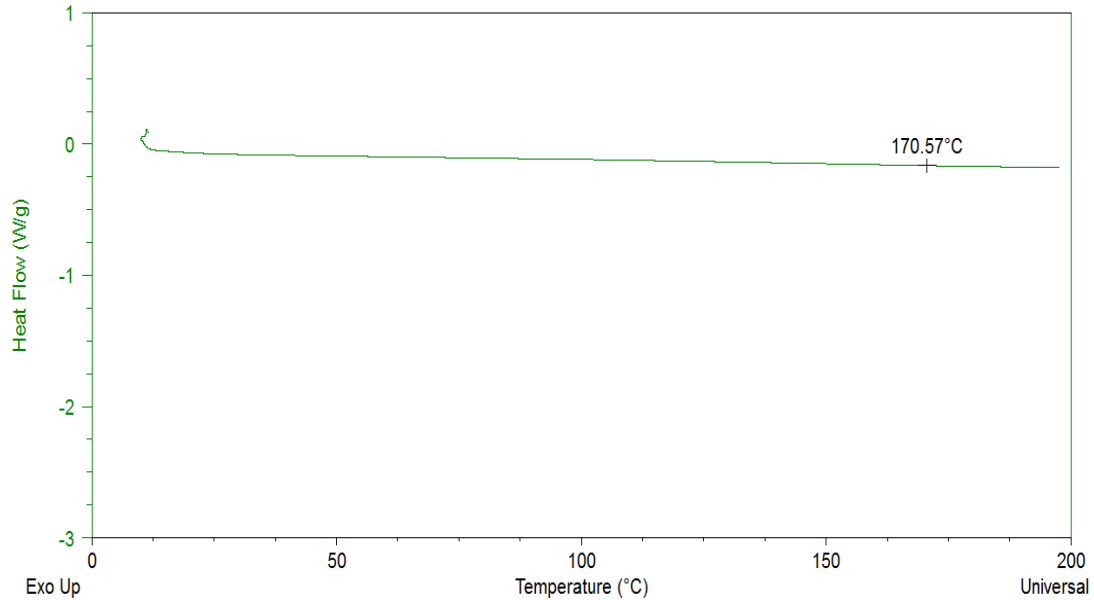
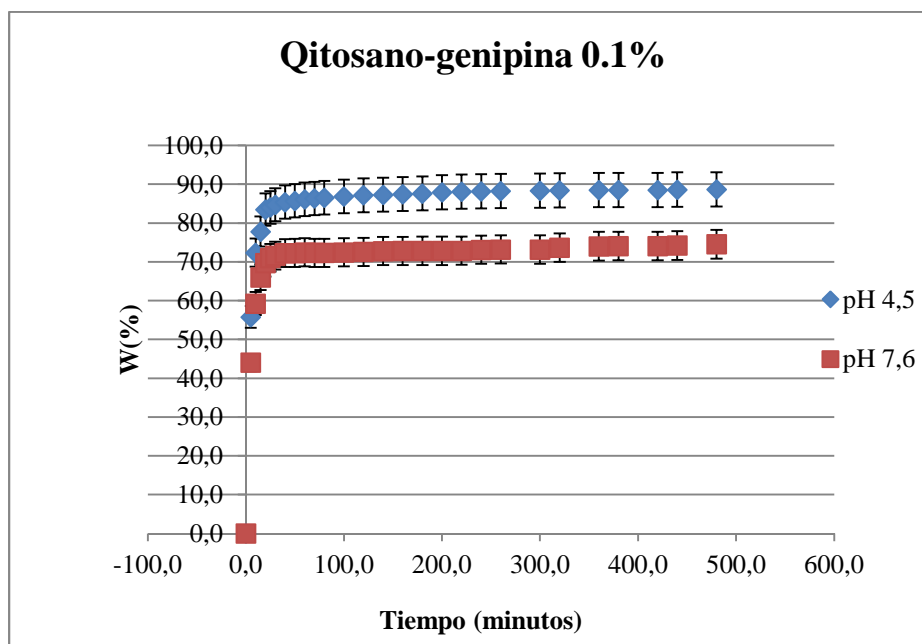


Figura 18. Termograma de DSC para Quitosano-genipina 0.3%, segundo calentamiento

En las figuras 16, 17 y 18, se presentan los termogramas de DSC en los cuales se observa el segundo calentamiento de los tres materiales poliméricos sintetizados. En esta se concluye que los materiales son completamente amorfos, ya que solo se presentó la Tg.

En un trabajo anterior se encontraron valores de la temperatura de transición vítrea muy similar a los del proyecto (161°C -163°C) (4) pero para polímeros interpenetrados de quitosano-genipina/NIPA-Bis sin embargo, aunque los polímeros sintetizados en este proyecto no son interpenetrados, se obtuvieron valores muy similares a los que habitualmente se obtienen a esta clase de polímeros. Cabe aclarar que se realizó una búsqueda bibliográfica exhaustiva y no se encontraron valores de transición vítrea para hidrogeles de quitosano reticulados con genipina. Usualmente la Tg de un material suele incrementarse cuando se combina física o químicamente con otra sustancia, por lo tanto, los resultados concuerdan con lo esperado, ya que se puede observar que las Tg halladas para los materiales poliméricos se encuentran en valores mayores que las Tg del quitosano (140-150 °C). (25)

2.5.4. Cinéticas de hinchamiento de los hidrogeles de quitosano reticulados con genipina a pH 4.5 y 7.6

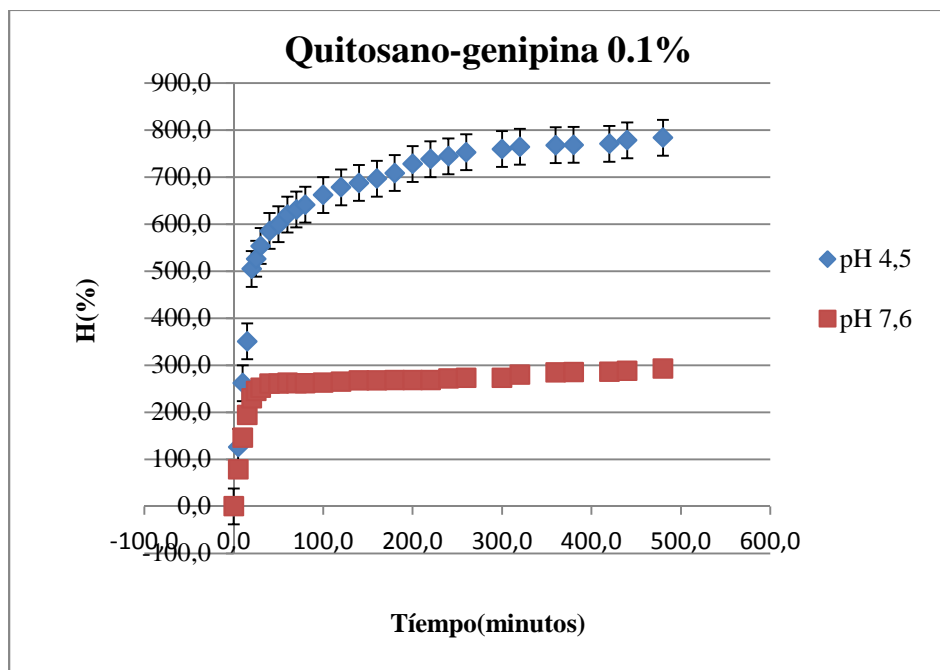


Gráfica 1. Representación del porcentaje de hinchamiento,(W%) en función del tiempo y a 25°C para Qitosano-genipina 0.1% a dos diferentes condiciones de pH.

La grafica 1, presenta el porcentaje de hinchamiento (W%) calculado a partir de la ecuación (1) en función del tiempo para quiosano-genipina 0.1% a los dos pH estudiados (4.5 y 7.6).

Se aprecia una diferencia significativa entre ellos, lo que demuestra la pH-sensibilidad del material. A pH 4.5 se observó el mayor grado de hinchamiento.

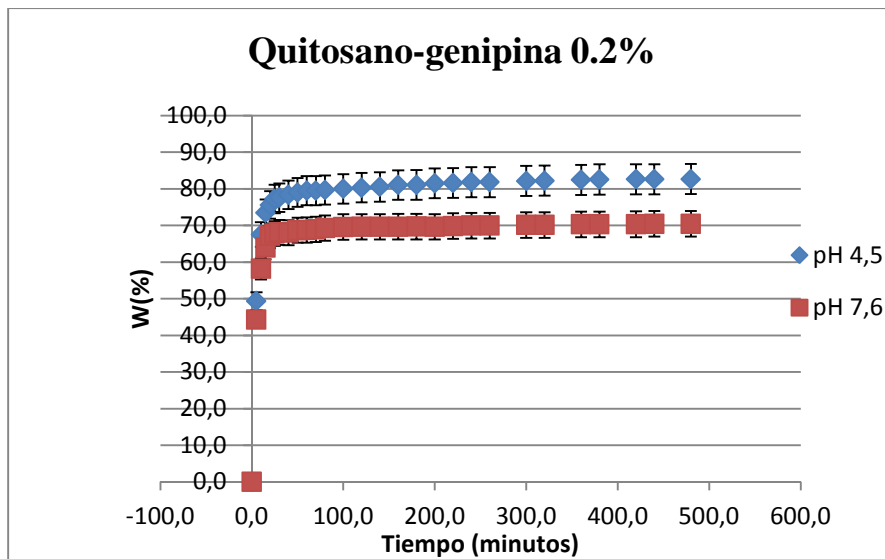
Debido a que la mayor parte de los grupos amino del quitosano están en su forma protonada. En consecuencia, la red del quitosano se encuentra casi totalmente ionizada y ocasiona una repulsión electrostática entre los iones NH_3^+ de las unidades de glucosamina, generando un efecto de extensión de dicha red que da paso a que el material polimérico se hinche más y que aquellos grupos ionizados se solvaten con el agua que difunde dentro del material.



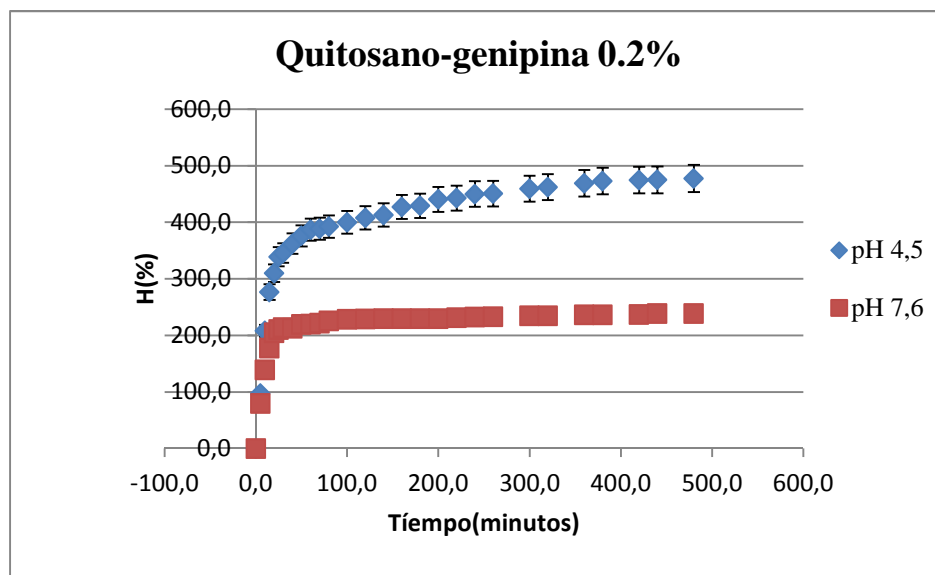
Gráfica 2. Representación del porcentaje de contenido de agua (H%) en función del tiempo y a 25°C para Quitosano-genipina 0.1% a dos diferentes condiciones de pH.

La gráfica 2 muestra el porcentaje del contenido de agua (H%) respecto al tiempo a dos valores de pH para el caso de quitosano-genipina 0.1%. En esta grafica se observa de manera más clara la diferencia en el comportamiento de hinchamiento del material respecto a los diferentes valores de pH evaluados, ya que en esta ecuación se tiene en cuenta el contenido de agua absorbido por el xerogel (polímero seco), a medida que pasa el tiempo.

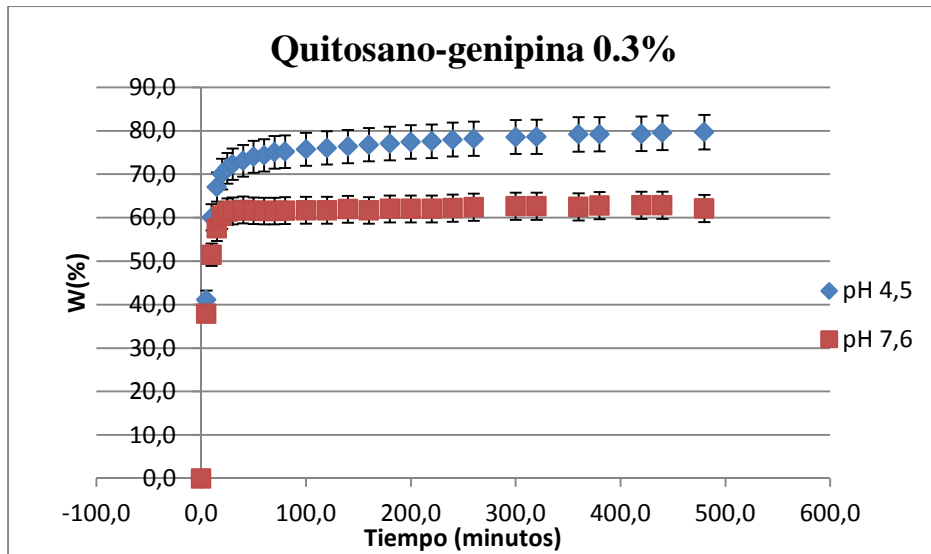
Esta gráfica, evidencia la naturaleza hidrófila del hidrogel de quitosano-genipina y como se ve afectada, por el pH del medio de hinchamiento.



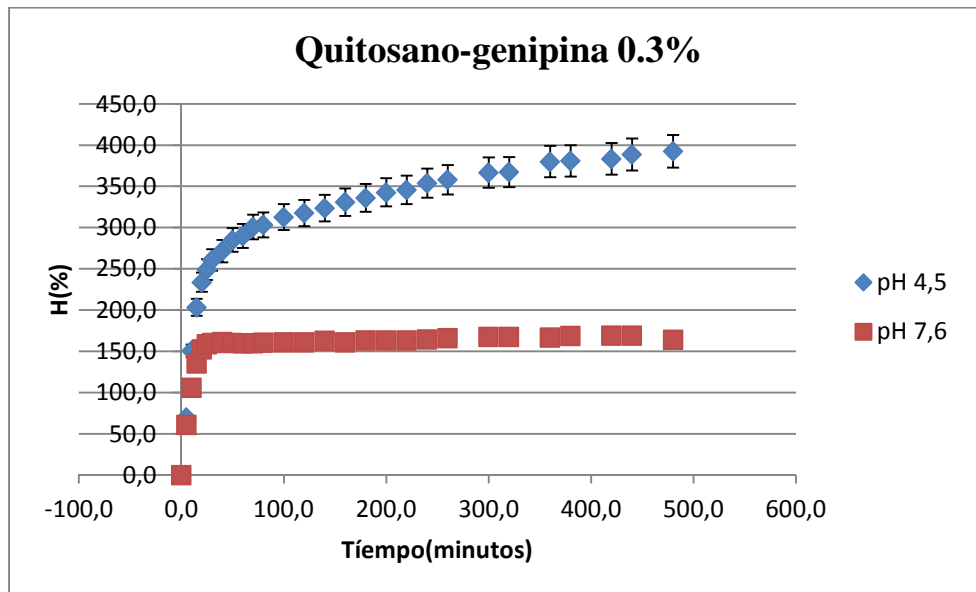
Gráfica 3. Representación del porcentaje de hinchamiento,(W%) en función del tiempo y a 25°C para Quitosano-genipina 0.2% a dos diferentes condiciones de pH.



Gráfica 4. Representación del porcentaje de contenido de agua (H%) en función del tiempo y a 25°C para Quitosano-genipina 0.2% a dos diferentes condiciones de pH.



Gráfica 5. Representación del porcentaje de hinchamiento,(W%) en función del tiempo y a 25°C para Quitosano-genipina 0.3% a dos diferentes condiciones de pH.

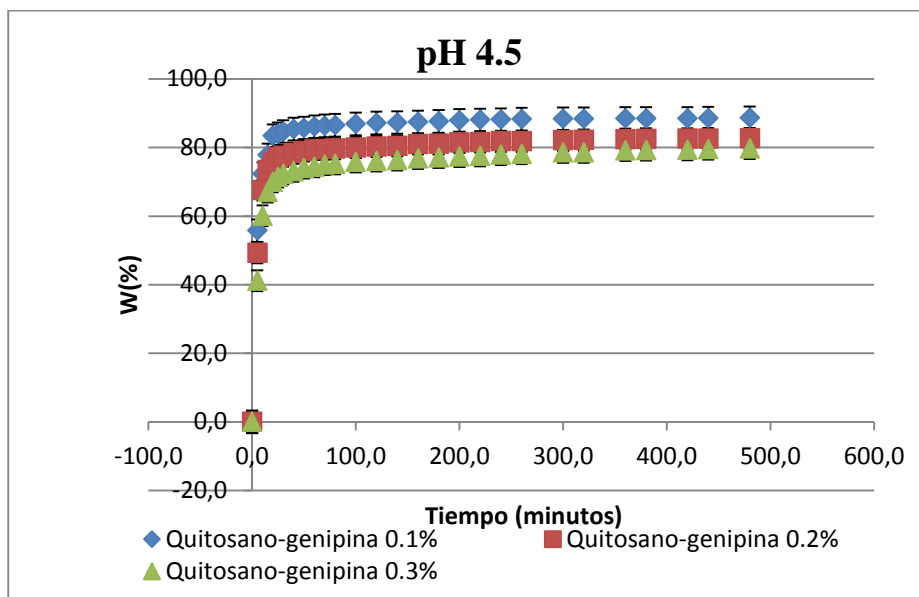


Gráfica 6. Representación del porcentaje de contenido de agua (H%) en función del tiempo y a 25°C para Quitosano-genipina 0.3% a dos diferentes condiciones de pH.

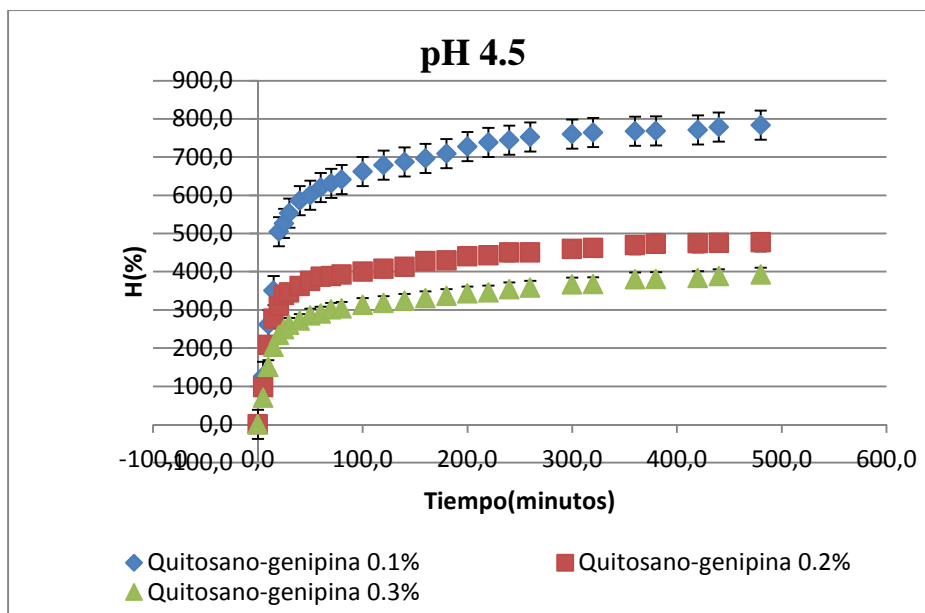
Las gráficas 3 y 5 presentan el porcentaje de hinchamiento (W%) y las gráficas 4 y 6 el porcentaje de contenido de agua (H%) del quitosano entrecruzado con genipina 0.2%, y 0.3%, para los dos valores de pH estudiados, donde se encontró un comportamiento similar al del quitosano entrecruzado con genipina 0.1%, es decir el material se hinchó más a pH 4.5 y menos a pH 7.6.

Sin embargo hay diferencias entre el grado de hinchamiento y contenido de agua entre los diferentes polímeros a un mismo pH. Estas diferencias se evidenciaran mejor cuando se halle W_{∞} y los H_{∞} , para cada polímero en los diferente pHs.

Por otro lado, se plasmó el comportamiento de los tres polímeros en una sola figura, con el fin de evaluar y comparar el comportamiento de hinchamiento y la capacidad de retener agua de los polímeros, en las diferentes condiciones de pH (4.5 y 7.6), Ver graficas : 7, 8, 9 y 10



Gráfica 7. Representación del porcentaje de hinchamiento,(W%) en función del tiempo a 25°C y a pH 4,5 para Quitosano-genipina 0.1%,0,2% y 0,3% .

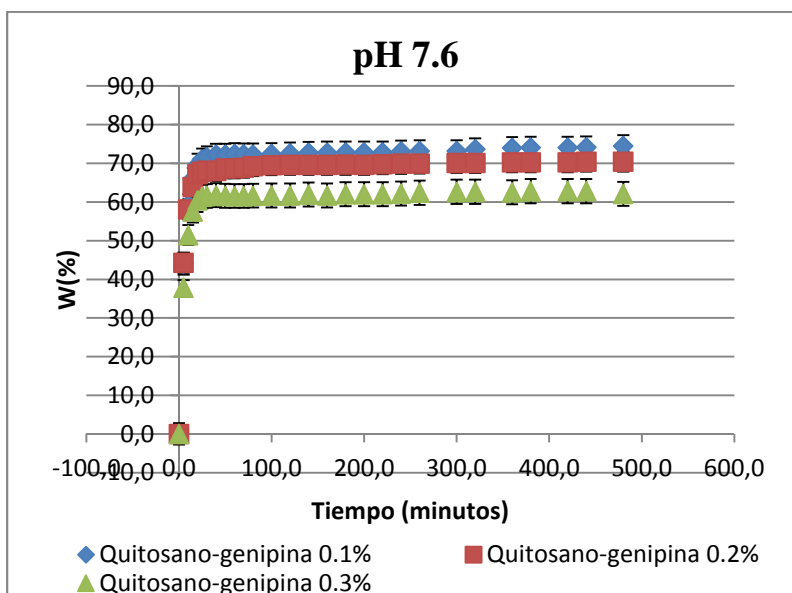


Gráfica No.8. Representación del porcentaje de contenido de agua (H%) en función del tiempo a 25°C y a pH 4,5 para Quitosano-genipina 0.1%, 0.2% y 0.3%.

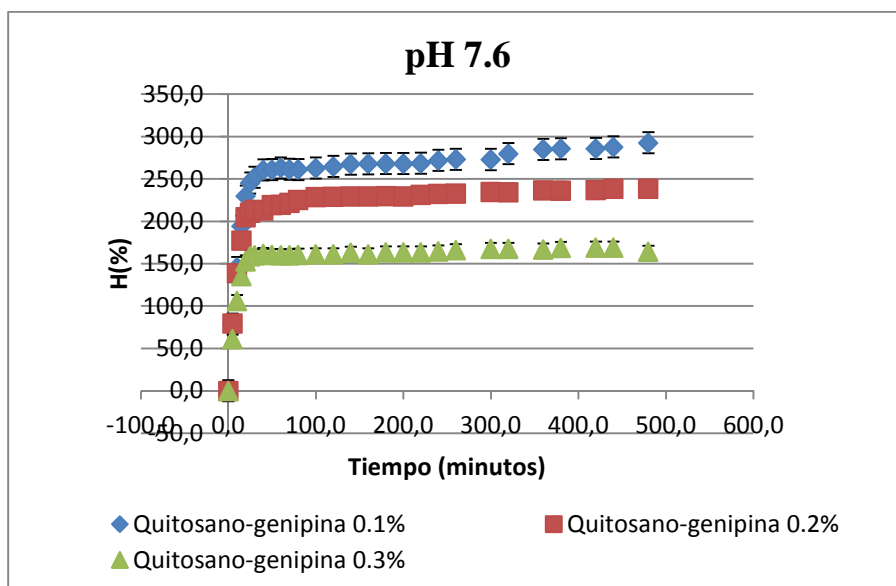
En las gráficas 7 y 8 se puede observar el grado de hinchamiento (W%) del hidrogel quitosano-genipina 0.1% es superior al de quitosano-genipina 0.2% y al del quitosano-genipina 0.3%. Esto ocurre debido a que los grupos amino del quitosano a pH 4.5 en su mayoría se encuentran protonados y esto ocasiona una repulsión entre las cargas positivas, que genera finalmente una configuración extendida del hidrogel y por lo tanto un mayor hinchamiento. (4)

El grado de hinchamiento y el contenido de agua no solamente dependen del pH del medio, sino también de la naturaleza de la red polimérica y su grado de entrecruzamiento. El hidrogel de quitosano –genipina 0.1% tiene una menor proporción en agente reticulante (genipina) y presenta los mayores valores para W% y H% debido probablemente a que cuanto menor es el grado de reticulación, menor será la densidad de entrecruzamiento de la red polimérica, por consiguiente esta tendrá una mayor disponibilidad hidrodinámica para acomodar en su interior moléculas de agua y por lo tanto, aumentar la capacidad de hinchamiento.(23) Esto implica que a medida que aumenta la concentración de genipina, la densidad en enlaces covalentes entre las redes también aumenta, reduciéndose los espacios intermoleculares y limitándose la capacidad de absorber las moléculas de agua. Es por

esto que observamos un menor grado de hinchamiento en el hidrogel de quitosano-genipina 0.3%, por tener una mayor cantidad de genipina.



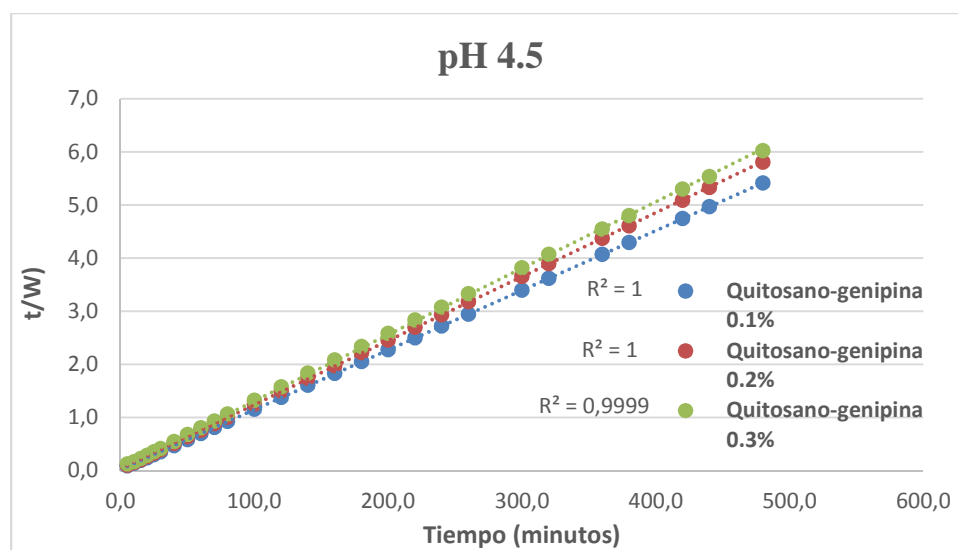
Gráfica 9. Representación del porcentaje de hinchamiento,(W%) en función del tiempo a 25°C y a pH 7,6 para Quitosano-genipina 0.1%,0,2% y 0,3% .



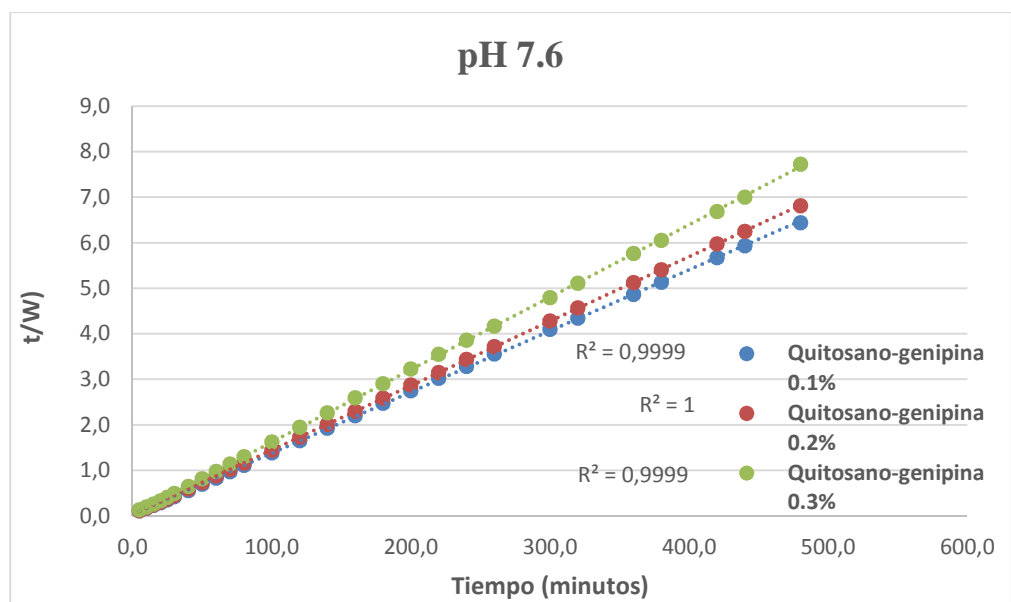
Gráfica 10. Representación del contenido de agua (H%) en función del tiempo a 25°C y a pH 7,6 para Quitosano-genipina 0.1%,0.2% y 0.3

A pH 7.6 se evidenció un comportamiento similar al anterior donde el quitosano-genipina 0.1%, tiene un grado de hinchamiento mayor al de 0.2% y 0.3%. Sin embargo a este pH se observó un menor grado de hinchamiento para los tres polímeros si los comparamos con lo que ocurrió a pH 4.5. Esto ocurre debido a que a pH 7.6 los grupos amino no se encuentran protonados, en consecuencia, la red del quitosano no se encuentra ionizada, no hay repulsión electrostática, no hay extensión de la red y se hincha en una proporción mucho menor que a pH 4.5. El grado de entrecruzamiento del hidrogel juega un papel importante en el porcentaje de hinchamiento, y también se observa que a medida que aumenta la concentración de genipina disminuye el hinchamiento del hidrogel, es por esto que observamos un menor grado de hinchamiento en el hidrogel de quitosano-genipina 0.3%, por tener una mayor cantidad de genipina.

En las gráficas 11 y 12, se muestran las regresiones lineales para todos los hidrogeles sintetizados a pH 4.5 y pH 7.6. Se puede observar que se ajustan al modelo de Schott o cinética de segundo orden, puesto que se obtuvieron gráficas lineales. Los valores de R^2 , se muestran en las gráficas 11 y 12.



Gráfica 11. Representación del hinchamiento a pH 4.5 para Quitosano-genipina 0.1%,0.2% y 0.3% de acuerdo con una cinética de segundo orden.



Gráfica 12. Representación del hinchamiento a pH 7.6 para Quitosano-genipina 0.1%,0.2% y 0.3% de acuerdo con una cinetica de segundo orden.

Tabla 2. Valores del grado de hinchamiento en equilibrio, (W_{∞}), contenido de agua en equilibrio, (H_{∞}) y la constante cinética de hinchamiento, (K), a pH 4.5 y 7.6 de los polímeros sintetizados

<i>pH 4.5</i>			
<i>Hidrogel sintetizado</i>	W_{∞} (%)	H_{∞} (%)	$K(\text{min}^{-1})$
<i>Quitosano-genipina 0.1%</i>	89,29	833,33	0,005140
<i>Quitosano-genipina 0.2%</i>	83,33	500,00	0,003956
<i>Quitosano-genipina 0.3%</i>	80,00	400,00	0,002626
<i>pH 7.6</i>			
<i>Hidrogel sintetizado</i>	W_{∞} (%)	H_{∞} (%)	$K(\text{min}^{-1})$
<i>Quitosano-genipina 0.1%</i>	74,63	294,12	0,005050
<i>Quitosano-genipina 0.2%</i>	70,42	238,10	0,002908
<i>Quitosano-genipina 0.3%</i>	62,89	169,49	0,002073

En la tabla 2, se resumen las propiedades de hinchamiento a pH 4.5 y 7.6 para los materiales sintetizados. A pH 4.5 se observa como el contenido de agua en equilibrio, W_{∞} , y la constante cinética de hinchamiento, K , aumentan a medida que disminuye el porcentaje del agente reticulante. Esto se puede atribuir a las repulsiones electrostáticas que establecen los grupos amino protonados de la red, que finalmente genera un mayor hinchamiento del material y al grado de entrecruzamiento del polímero, a mayor proporción de genipina menor hinchamiento.

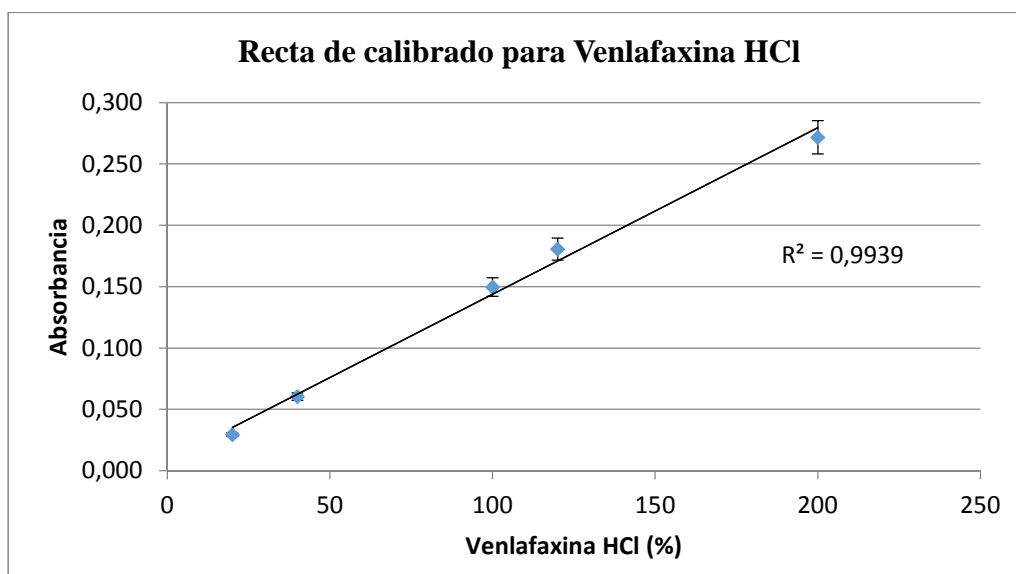
A pH 7.6, al igual que a pH 4.5, el contenido de agua en equilibrio, W_{∞} , y la constante cinética de hinchamiento, K , aumentan a medida que disminuye el porcentaje del agente reticulante. Sin embargo es importante tener en cuenta que el hinchamiento de los hidrogeles no solo depende de las repulsiones electrostáticas que se puedan presentar entre los grupos funcionales ionizables de las redes poliméricas, es una propiedad que también depende de otro tipo de fuerzas intermoleculares que podrían o no favorecer la difusión de agua del medio hacia dentro de estos. De hecho, el proceso de hinchamiento también está dirigido por interacciones dipolo-dipolo y enlaces de hidrógeno que se pueden formar entre el agua y los grupos funcionales presentes en los materiales.

Al observar la estructura del quitosano (Figura 1), se puede evidenciar la presencia de dos grupos OH y un grupo NH_2 por cada unidad manomérica, los cuales pueden establecer enlaces de hidrogeno con el agua del medio. Por lo tanto, una posible explicación al comportamiento observado a pH 7.6, es que a medida que disminuye el porcentaje del agente reticulante en los materiales, aumenta el número de grupos funcionales hidrófilos libres, NH_2 , lo cual implica una mayor cantidad de interacciones favorables con el agua del medio mediante la formación de enlaces de hidrogeno, lo que finalmente ocasiona una mayor grado de hinchamiento. De esta manera el grado de entrecruzamiento del hidrogel, juega un papel importante en la proporción de interacciones que tienen estos materiales con el agua, a mayor entrecruzamiento menor será el número de interacciones de interacciones con el agua.

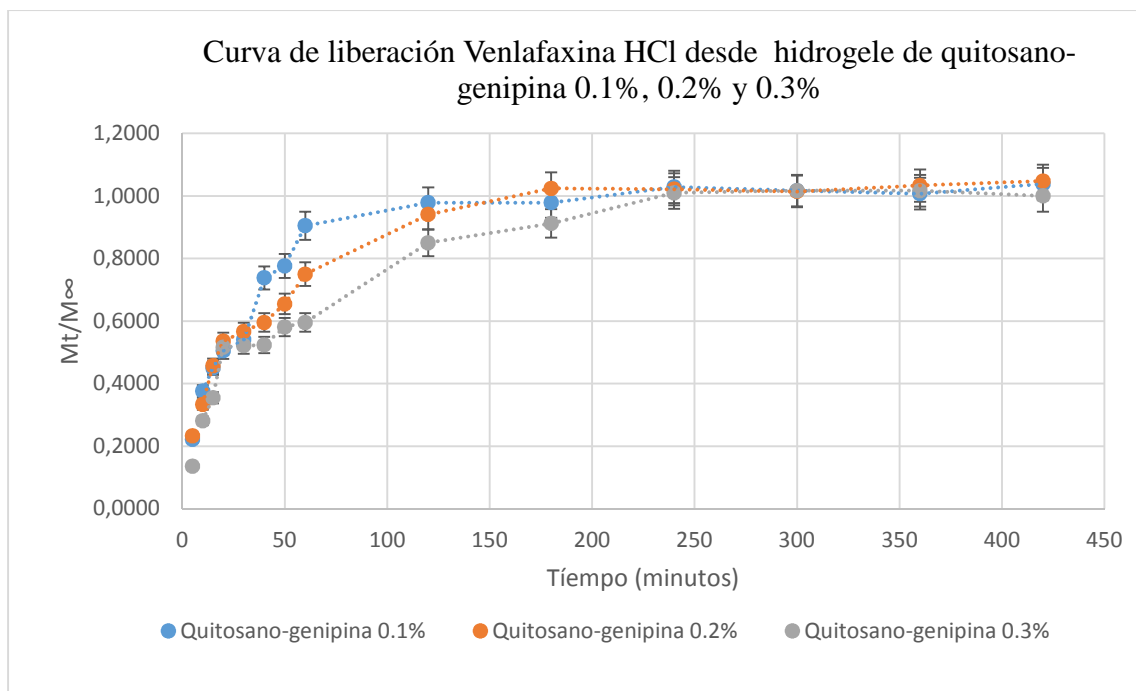
Al parecer a pH ácido (4.5), el grado de hinchamiento depende mucho más de la cantidad de interacciones electrostáticas que se presentan entre los grupos funcionales de la red del hidrogel, donde las repulsiones entre cargas iguales representan un factor clave en su comportamiento. Mientras que a pH neutro (7.6) posiblemente están primando las interacciones por enlace de hidrogeno que se presentan entre los grupos NH_2 y OH con el agua del medio.

2.5.5. Cinética de liberación *in vitro* de venlafaxina HCl desde los Hidrogeles.

Con base en la ecuación de la recta y las absorbancias obtenidas, se construyeron las gráficas de liberación en función del tiempo.



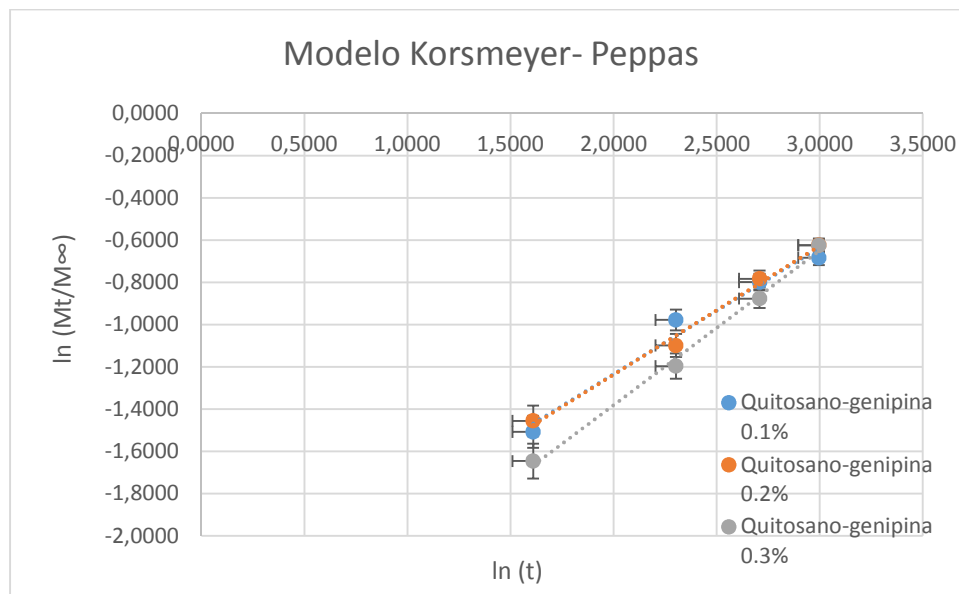
Grafica 13. Recta de Calibrado obtenida para Venlafaxina HCl



Gráfica 14. Curva de liberación de Venlafaxina HCl, desde los hidrogel de Quitosaño-genipina 0.1%,0.2% y 0.3%.

Las curvas de liberación de venlafaxina HCl en función del tiempo, usando xerogel de quitosaño- genipina que contenían el principio activo en su interior, se presentan en la gráfica 14. En esta se observa que el polímero Quitosaño-genipina 0.1%, tiende a liberar mas rapido el principio activo, esto se debe a que el grado de entrecruzamiento es menor por lo tanto la matriz del hidrogel es menos rigida lo que permite la entrada del medio acuoso y salida del principio activo mas rapida que los hidrogel de Quitosaño-genipina 0.2 % y Quitosaño-genipina 0.3% , estos resultados concuerdan con los estudios de hinchamiento discutidos anteriormente.

Para encontrar el mecanismo de liberación del fármaco, los datos de liberación se ajustaron al modelo cinético semi- empírico desarrollado por Korsmeyer-Peppas.



Gráfica 15. Representación del modelo cinético semi-empírico desarrollado por Korsmeyer-Peppas hidrogeles de Qitosano-genipina 0.1%,0.2% y 0.3%.

La gráfica 15, se utilizó para evaluar los exponentes de liberación n , constantes de liberación K y coeficientes de determinación (R^2), estos valores son mostrados en la

Tabla 3.

Tabla 3. Constantes de liberación (K), exponentes de liberación (n) y coeficientes de determinación (R^2), encontrados en los estudios cinéticos de liberación de Venlafaxina HCl para Qitosano-genipina 0.1%,0.2% y 0.3%

<i>Material</i>	<i>n</i>	<i>K (minⁿ)</i>	<i>R²</i>
<i>Qitosano-genipina 0.1%</i>	0.5991	0.088	0.9762
<i>Qitosano-genipina 0.2%</i>	0.6089	0.086	0.9925
<i>Qitosano-genipina 0.3%</i>	0.7312	0.061	0.9953

La Tabla 3 presenta la variación de K y n , respectivamente, con respecto a la composición de agente reticulante (genipina) en el hidrogel, como era de esperar, el valor de K es inversamente proporcional a la concentración de genipina, por lo tanto, la cantidad de agua que penetra el hidrogel, aumenta con la disminución del entrecruzante y por consiguiente, el principio activo es liberado a mayor velocidad.

La Tabla 3 también muestra, que los todos los hidrogeles sintetizados, presentan un mecanismo de liberación no-fickiano o anómalo, ya que los exponentes de liberación son mayores que 0.5, demostrando que el proceso está controlado parcialmente por la relajación viscoelástica de la matriz durante la penetración del agua. En otras palabras, estos resultados deben ser considerados como una combinación de ambos fenómenos (controlado por el hinchamiento y controlado por la difusión), aunque el transporte por difusión contribuye más a la velocidad de liberación de un fármaco, el proceso de relajación es relevante como lo vimos anteriormente cuando el pH del medio de liberación disminuye. Observando los resultados obtenidos el mejor polímero para un sistema de liberación, sería el de Quitosano- genipina 0.3%, ya que con este el principio activo se libera un poco más lento y lo que se busca es prolongar el tiempo que la dosis terapéutica este presente de forma efectiva utilizando una única dosis.

2.6. CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron satisfactoriamente los hidrogeles de quitosano reticulados con genipina al 0.1%, 0.2% y 0.3%.
2. Se caracterizaron las estructuras químicas de los materiales obtenidos mediante espectroscopía FT-IR. Los espectros de los xerogeles demostraron la presencia de los grupos funcionales esperados para los materiales: amina terciaria y amida, demostrando el entrecruzamiento entre el quitosano y la genipina. También se evidenciaron las bandas características de los sacáridos.
3. Las temperaturas de transición vítrea de los hidrogeles se encontraron alrededor de 170 °C. Esto concuerda con lo reportado en otras investigaciones, ya que usualmente la Tg de un material suele incrementar cuando se combina física o químicamente con otra sustancia.
4. A pH 4.5 se observó que el grado de hinchamiento de los hidrogeles, incrementó a medida que la cantidad de quitosano en el material también lo hizo, esto debido al aumento de grupos amino protonados, demostrando la sensibilidad al pH por parte del quitosano.
5. A las dos condiciones de pH (4.5 y 7.6) , el grado de hinchamiento en los diferentes materiales disminuyó a medida que la cantidad de genipina en los hidrogeles aumentó, debido a que la densidad de entrecruzamiento de la red plimérica incrementó, reduciendo los espacios intermoleculares y limitando la capacidad de absorber las moléculas de agua.

6. Todas las cinéticas de hinchamiento se ajustaron a un proceso de segundo orden, en donde el recíproco del hinchamiento (t/Wt) está relacionado con el tiempo de tratamiento de acuerdo al modelo de Scott.

7. Las cinéticas de liberación de Venlafaxina HCl desde los diferentes polímeros sintetizados, se ajustaron a un modelo lineal desarrollado por Korsmeyer-Peppas, este modelo nos mostró que a medida que aumenta la concentración de reticulante (genipina) disminuye la constante de liberación, además, que el proceso de liberación para los tres polímeros es de tipo anómalo o no-fickiano.

2.7. RECOMENDACIONES

Sería interesante realizar estudios de cinética de hinchamiento de los materiales sintetizados a diferentes condiciones de pH, por ejemplo, a pH ácido (1-3) o jugo gástrico simulado y estudiar el hinchamiento, igualmente para pH básico, ya que en el tracto digestivo se experimentan todos estos cambios de pH.

Se sugiere llevar a cabo pruebas reológicas de los materiales poliméricos con el fin de evaluar la elasticidad y propiedades mecánicas de cada una de las composiciones.

Finalmente se recomienda realizar un estudio cinético de liberación variando la carga de principio activo y así observar la influencia que tiene esta en dicho proceso.

2.8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. De Assis A, Melo C, Alves N, Fonseca M. Diferentes Estrategias para Reticulación de Quitosano. *Quim Nova*, 2011; 34 (7): 1215-1223
2. Moura M.J, Gil M.H, Figueiredo M.M. Delivery of cisplatin from thermosensitive co-cross-linked chitosan hydrogels. *European Polymer Journal*, 2013; 49: 2504-2510
3. Fwu-Long M, Hsing- Wen S, Shin-Shing S. Drug release from chitosan-alginate complex beads reinforced by a naturally occurring cross-linking agent. *Carbohydrate Polymers*. 2002; 48: 61-72
4. Vallejo J.C. Síntesis y Caracterización de Redes de Polímeros Interpenetrados de Quitosano y PNIPA-CO-Acido Itacónico. 2014. Universidad ICESI
5. Sáez V, Hernández E, Angulo L. Sistemas de Liberación Controlada de Medicamentos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 2003; 3(3): 1-20
6. Cojocariu A, Profire L, Aflori M, Vasile C. In vitro drug release from chitosan/ Cloisite 15 A hydrogels. *Applied Clay Science*. 2012; 57: 1-9
7. Dominguez-Delgado C.L, Rodriguez-Cruz I.M, Fuentes-Prado E. Drug Carrier Systems Using Chitosan for Non Parenteral Routes. *INTECH. Pharmacology and Therapeutics*. Chapter 10: 273- 304
8. Xu J, Strandman S, X.X. Zhu J, Barralet J, Cerruti M. Genipin-crosslinked catechol-chitosan mucoadhesive hydrogels for buccal drug delivery. *Biomaterials*. 2015; 37: 395-404
9. Roseboom P, Kalin N. Neurofarmacología de Venlafaxina. *Revista de Toxicomanias*. 2002; 31: 33-43
10. Makhija S, Vavia P. Once daily-sustained release tablets of venlafaxine, a novel antidepressant. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2002; 54: 9-15

11. Romero E.L. Obtención de hidrogeles de quitosano a partir del micelio de *aspergillus niger* y su estudio en la liberación controlada de cefalexina. 2011. Universidad Del Valle.
12. F Ahmadi, Z Oveisi, Amoozgar Z, Chitosan based hydrogels: characteristics and applications. *Pharmaceutical Sciences* 2015; 16: 1- 18
13. Dodane V, Vilivalam VD. Pharmaceutical applications of chitosan. *Pharm Sci Technol To.* 1998; 1:246–253.
14. Coviello T, Matricardi P, Marianecchi C, Alhaique F. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *J Control Release.* 2007; 119:5–24.
15. Ma X, Wei R, Cheng J, Cai J, Zhou J. Synthesis and characterization of pectin/poly (sodium acrylate) hydrogels. *Carbohydr Polym.* 2011; 86:313–319.
16. Yoshimura T, Yoshimura R, Seki C, Fujioka R. Synthesis and characterization of biodegradable hydrogels based on starch and succinic anhydride. *Carbohydr Polym.* 2006; 64:345–349.
17. Park JW, Kang YDS, Kim JS, Lee JH, Kim HW. 3D microenvironment of collagen hydrogel enhances the release of neurotropic factors from human umbilical cord blood cells and stimulates the neurite outgrowth of human neural precursor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 447:400–406.
18. Silva R, Fabry B, Boccaccini A. Fibrous protein-based hydrogels for cell encapsulation. *Biomaterials.*2014; 35:6727–6738.
19. Gaowa A, Horibe T, Kohno M, Sato K, Harada H, Hiraoka M, et al. Combination of hybrid peptide with biodegradable gelatin hydrogel for controlled release and enhancement of anti-tumor activity in vivo. *J Control Release.* 2014; 176:1–7.
20. Sokker HH, Abdel Ghaffar AM, Gad YH, Aly AS. Synthesis and characterization of hydrogels based on grafted chitosan for the controlled drug release. *Carbohydr Polym.* 2009; 75:222–229

21. Martínez R. Síntesis, Antonio-Cruz RC, Álvarez AM, and Morales A. Cinética de Hinchamiento de Hidrogeles a partir de metil celulosa y poliacrilamida. 2007; 6: 339-343.
22. Jitendra K, Meenakshi K. Intra-articular delivery of genipin cross-linked chitosan microspheres of flubiprofen: Preparation, characterization, in vitro and in vivo studies. 2012; 81: 564-571.
23. Li Cui, Junfang Jia, Yi Guo, Yun Liu, Ping Zhu. Preparation and characterization of IPN hydrogels composed of chitosan and gelatin cross- linked by genipin. 2013; 99: 31-38.
24. Suvakanta D, Padala N, Lilakanta N and Prasata CH. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. 2010; 67: 219-220.
25. Valderruten NE, Valverde J.D, Zuluags F and Durante-Ruiz E. Synthesis and characterization of chitosan hydrogels cross- linked with dicarboxylic acids. 2014; 84:21-28
26. Cowie J (1991), En Polymers Chemistry & physics of modern materials; 13-15, España: chapman & Hall.
27. Montoya G, Álvarez G. Extracción, caracterización y valoración de genipina a partir del fruto de la Genipina Americana, 2013 Universidad Icesi.
28. Gierzewska M, Ostrowska-Czubenko J. Chitosan-based membranes with different ionic crosslinking density for pharmaceutical and industrial applications.2016; 501-511.
29. Tapan Giri, Amrita T, Amit A, Ajazuddin B, Krishna T. Modified chitosan hydrogels as drug delivery and tissue engineering systems: present status and applications. Acta Pharmaceutica Sinica B.2012; 439-449.
30. Muzzarelli R. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. Carbohydrate Polymers.2009; 1-9.
31. Bhattarai N, Gunn J, Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. Advanced drug delivery. 2010;60; 83-99.

32. Muzzarelli R., Muzzarelli C. Chitin and chitosan hydrogels. Handbook of Hydrocolloids. 2009;2; 849-888
33. Holback H, Yeo Y, Park K. 1-Hydrogel swelling behavior and its biomedical applications. 2011;34; 3-24.
34. Moura J, Margarida M, Gil H. Rheological Study of Genipin Cross- Linked Chitosan Hydrogels. Biomacromolecules, 2007: 8; 3823-3829.
35. Berger J, Reist M, Mayer J.M, Felt O, Peppas N.A, Gurny R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 57: 2004; 19-34.
36. Tronci G, Ajiro H, Russell J, Akashi M. Tunable drug- loading capability of chitosan hydrogels with varied network architectures. Acta Biomaterialia .2014: 10; 821-830.
37. Allan S. Hoffman. Hydrogels for biomedical applications. Advanced Drug Delivery Reviews.2012;64; 18-23.
38. Dragan E. Design and applications of interpenetrating polymer network hydrogels. Chemical Engineering journal.2014: 243; 572-590.
39. Ezequiel S, Costa-Junior, Edel F, Barbosa- Stancioli, Alexandra A.P, Wander L, Vasconcelos H, Mansur S. Preparation and characterization of chitosan/poly (vinyl alcohol) chemically crosslinked blends for biomedical applications. Carbohydrate Polymers. 2009;76; 472-481.
40. Klouda L, Mikos A. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2008;68: 34-35.
41. Majeti N, Kumar R. A review of chitin and chitosan applications. Reactive and functional Polymers. 2000: 46; 1-27.
42. Ostrowska J, Pieróg M, Gierszewska. State of water in noncrosslinked and crosslinked hydrogel chitosan membranes-DSC studies.2015: three; 1-10.

43. Modrzejewska Z. Characterization of water state in chitosan hydrogel membranes. *Progress on Chemistry and Application of Chitin*. 2011: 17; 1-12.
44. Ostrowska J, Pieróg M. State of Water in citrate, crosslinked chitosan membrane. *Progress on Chemistry and Application of Chitin*. 2010: 15; 1-8.
45. Pasqui D, De Cagna M, Barbucci R. Polysaccharide- Based Hydrogels: The Key Role of Water in Affecting Mechanical Properties. *Polymers*. 2012;4; 117-1534.
46. Syed K, Gulrez, Saphwan Al- Assaf, Phillips O. Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications. *Polymers*. 2010: 76; 2345-2372.