

APÓSITOS PARA ANTIINFLAMATORIOS

David Molina Pérez

Grado en Farmacia

Curso 2020-2021

Tutora: Araceli Delgado Hernández

Co-tutora: Patricia García García

Departamento de ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica

Área de conocimiento: Farmacia y Tecnología Farmacéutica

Índice

Agradecimientos	3
Resumen	4
Abstract	5
1. Introducción	6
2. Objetivos	9
3. Material y métodos	10
3.1. Preparación y caracterización de microesferas de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA).....	10
3.1.1. Rendimiento de encapsulación.....	10
3.1.2. Tamaño.....	10
3.2. Preparación y caracterización de gránulos de alginato.....	11
3.2.1. Morfología y tamaño.....	12
3.2.2. Rendimiento de encapsulación.....	12
3.2.3. Ensayo de liberación.....	12
3.3 Preparación y caracterización de apósitos.....	12
3.3.1. Morfología.....	13
3.3.2. Ensayo de liberación.....	13
3.3.3. Captación de agua.....	13
3.3.4. Porosidad.....	14
4. Resultados	15
4.1. Tamaño de microesferas.....	15
4.2. Rendimiento de encapsulación de microesferas.....	15
4.3. Tamaño de gránulos.....	16
4.4. Rendimiento de encapsulación en gránulos.....	17
4.5. Morfología de gránulos y apósitos.....	17
4.6. Porosidad de los apósitos.....	20
4.7. Ensayo de liberación.....	21
4.7.1. Ensayo de liberación de indometacina desde gránulos.....	21
4.7.2. Ensayo de liberación de indometacina desde apósitos.....	23

4.8 Ensayo de captación de agua y pérdida de masa.....	25
5. Discusión.....	26
6. conclusión.....	27
7. Bibliografía.....	28

Agradecimientos

Quiero agradecer profundamente a la Dra. Carmen Évora García y la Dra. Araceli Delgado Hernández por su implicación, dedicación y cercanía en todo momento durante la elaboración de este trabajo. Me han ofrecido una amplia visión del apasionante mundo de la investigación y me han motivado a esforzarme cada día para cumplir con nuestros objetivos.

A Patricia García García por orientarme, ofrecerme su ayuda en el laboratorio, acompañarme a las instalaciones del SEGAI-ULL y explicarme siempre con detalle cualquier duda relativa al proyecto o a aspectos fuera del ámbito académico.

A la Dra. Patricia Díaz Rodríguez por su colaboración y por compartir sus conocimientos sobre la elaboración de apósitos.

A mis familiares y amigos más cercanos que, de forma indirecta, han facilitado mi día a día durante los últimos meses.

Resumen

En este estudio, se formularon apósitos de quitosano-alginato conteniendo indometacina mediante la técnica de “Capa a Capa”. Previamente, la indometacina fue encapsulada en gránulos de alginato, obtenidos por entrecruzamiento del alginato con CaCl_2 .

Inicialmente, el fármaco se encapsuló en microesferas de PLGA para ser incorporadas en gránulos elaborados con alginato al 1,3%. Esta formulación se descartó rápidamente por su lenta liberación (<1% al cabo de siete días). Para mejorar la liberación, se procedió a encapsular el fármaco directamente en los gránulos y a incrementar su porosidad usando una menor concentración de alginato en la elaboración, del 0,7%. Todas las formulaciones presentaron un elevado rendimiento de encapsulación.

Los ensayos de liberación de indometacina desde los apósitos se realizaron en agua y en tampón fosfato (pH 7,4), para simular el pH de una herida cutánea. La liberación en tampón fosfato fue mayor que en agua, probablemente debido a la menor solubilidad de la indometacina en agua y por la capacidad de los fosfatos de secuestrar iones calcio y deshacer así el entrecruzamiento del alginato facilitando la liberación del fármaco. Los apósitos presentaron una elevada captación de agua demostrando su capacidad para absorber los exudados de una herida. Los resultados indican que el apósito podría ser de utilidad en el tratamiento de heridas cutáneas complicadas, a pesar de que la liberación de indometacina no se completa antes de su retirada, en los 3 primeros días.

Abstract

In this study, chitosan-alginate dressings containing indomethacin were formulated using the "Layer to Layer" technique. Previously, indomethacin was encapsulated in alginate granules, obtained by alginate crosslinking with CaCl_2 .

Initially, drug was encapsulated in PLGA microspheres to be incorporated into granules made with 1.3% alginate. This formulation was quickly discarded due to its slow release (<1% after 7 days). To improve the release, drug was encapsulated directly in the granules and their porosity was increased using a lower alginate concentration in the preparation, 0.7%. All the formulations showed a high encapsulation efficiency.

The indomethacin release assay from dressings were performed in water and in phosphate buffer (pH 7.4), to simulate the pH of a skin wound. The release in phosphate buffer was higher than in water, probably due to the lower solubility of indomethacin in water and because of the ability of phosphates to sequester calcium ions and thus undo the alginate crosslinking facilitating drug release. The dressings showed high water uptake, demonstrating their ability to absorb a wound exudates. The results indicate that the dressing could be useful in the treatment of complicated skin wounds despite that the indomethacin release is not completed before its removal, in the first 3 days.

1. Introducción

La piel constituye la barrera más importante y eficaz frente al medio ambiente. Cuando ocurre una lesión cutánea, el organismo inicia una serie de eventos complejos para restablecer esta protección. La cicatrización de heridas se puede dividir, a grandes rasgos, en cuatro fases continuas y superpuestas: hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación [1].

Tras la formación del coágulo, la respuesta inflamatoria provoca la vasodilatación, aumentando el flujo sanguíneo hacia la zona dañada y la permeabilidad de los vasos, lo cual resulta en una extravasación de células, factores de coagulación y un exudado rico en proteínas en la zona del tejido dañado. Las células y los factores de la coagulación limitan la expansión de microorganismos, inician la cascada de coagulación y liberan moléculas de señalización, llamadas citoquinas, que reclutan células inmunitarias para eliminar bacterias y residuos celulares. A medida que se liberan las citoquinas se produce el eritema, la inflamación y el dolor. Dichas citoquinas, también intervienen en la proliferación y formación de una nueva barrera protectora para, finalmente, permitir la remodelación de la matriz extracelular dando lugar a la etapa de cicatrización [2,3].

Por su parte, existen ocasiones en las que el proceso de cicatrización no se completa y queda detenido en la etapa inflamatoria, dando lugar a heridas crónicas. Las causas suelen ser diabetes, insuficiencia vascular, desnutrición, envejecimiento, entre otros.

El tratamiento de una herida crónica comienza con la eliminación de tejidos no viables. Posteriormente, se corrige el desequilibrio de humedad y se administran antibióticos y antiinflamatorios para favorecer la formación de un entorno óptimo que transforme las características inflamatorias de la herida crónica en las de una aguda [2,4].

Los apósitos han sido siempre un pilar en la protección y cuidado de este tipo de heridas. Dicha técnica se remonta varios milenios. Las terapias más antiguas ya se basaban en cubrir heridas con hojas y telas tras la aplicación de ungüentos naturales. Hoy en día, definimos apósito como un producto sanitario específico y esterilizado, de gasa, algodón u otro material, a veces impregnado de sustancias medicamentosas, que se aplica sobre una herida o región enferma para protegerla de infecciones, absorber exudados, detener una hemorragia o facilitar su curación [5,6].

Estos productos son esenciales en la atención médica. Existen diversos tipos en función de la lesión y la etapa del proceso de cicatrización:

- Apósitos tradicionales: Los apósitos tradicionales, comúnmente utilizados en la práctica clínica (gasas, vendas) únicamente ofrecen protección física; además, tienen un limitado beneficio sobre la cicatrización y la prevención de infecciones.
- Nuevos apósitos: Los apósitos modernos favorecen la eliminación del tejido necrótico y la fibrina; pueden influir en la autólisis y el desbridamiento y son beneficiosos para mantener constante la temperatura y humedad locales [7].

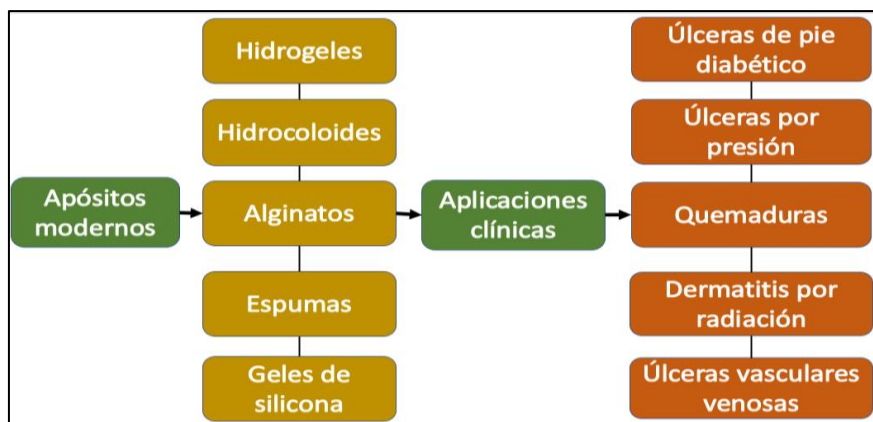


Figura 1. Tipos de apósitos modernos y aplicaciones clínicas. Adaptada de Shi et al., 2020 [7].

Dentro de los apósitos modernos, los hidrogeles de quitosano (CHT) son considerados materiales idóneos para mejorar el proceso de cicatrización debido a sus propiedades antimicrobianas, biocompatibles, atóxicas y hemostáticas. Se ha demostrado que promueven la cicatrización de heridas en sus distintas etapas. Estos geles pueden combinarse con otros polímeros naturales como celulosa, colágeno o alginato [8].

El alginato (ALG) es un copolímero de origen natural compuesto de ácido β -D-manurónico y ácido α -L-gulurónico, caracterizado por su elevada biocompatibilidad. Además, se pueden formar complejos ALG-CHT mezclándose disoluciones de alginato y quitosano, debido a las interacciones entre los grupos carboxilos del ALG y los grupos amino del CHT [9].

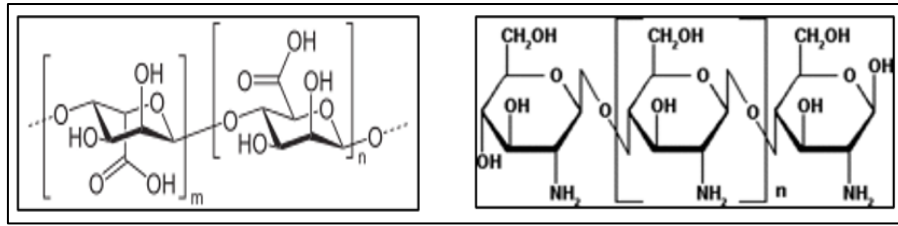


Figura 2. Estructura química de alginato (izq) y quitosano (dcha). Adaptada de Balleño et al., 2016 [9].

Las características biológicas de ambos polímeros les permiten ser utilizados como apósitos y como sistemas de administración de fármacos, lo que podría acelerar aún más la cicatrización de heridas. Estos geles pueden mejorar su eficacia al ser utilizados, a modo de vehículo, para la liberación de sustancias activas como antibióticos, antiinflamatorios, factores de crecimiento o células madre, entre otros [8].

Además, sus cargas opuestas los hacen idóneos para la elaboración de apósitos por la técnica de Capa a Capa, permitiendo así aprovechar las ventajas de ambos polímeros en la curación de heridas.

La técnica de Capa a Capa se basa en la deposición alterna de polielectrolitos con carga opuesta sobre superficies cargadas, de manera que se pueden ir ensamblando distintas capas y construir películas multicapas por interacciones electrostáticas entre policationes y polianiones. Esta técnica presenta aplicaciones en diversas áreas como optoelectrónica, nanofiltración, catálisis y revestimientos anticorrosión, además de sus aplicaciones biológicas y biomédicas. Estas últimas incluyen recubrimientos para promover o prevenir la adhesión celular y la encapsulación de fármacos.

Además de su versatilidad hay que destacar que es una técnica sencilla y fácil de implementar ya que solo requiere la deposición y exposición de los sustratos con distinta carga y el enjuague entre cada una de las deposiciones para eliminar el exceso que no se conjuga [10,11].

2. Objetivos

El objetivo de este trabajo es obtener apósitos capaces de incorporar indometacina, fármaco antiinflamatorio, y servir de vehículo para su liberación, con la finalidad de ser utilizados en el tratamiento local de heridas cutáneas.

Para alcanzar dicha meta, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- Puesta a punto de los métodos de elaboración de microesferas y gránulos de alginato conteniendo indometacina.
- Puesta a punto del método de obtención de apósitos “Capa a Capa”.
- Caracterización de microesferas, gránulos y apósitos mediante ensayos fisicoquímicos y ensayos de liberación.

3. Material y métodos

3.1. Preparación y caracterización de microesferas de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA)

Para elaborar las microesferas se utilizó el método de la emulsión simple, preparando una emulsión o/w (aceite en agua). La fase orgánica estaba formada por una determinada cantidad (24 mg o 50 mg) de indometacina (*Acros Organics, USA*) disuelta en 1 ml de diclorometano (DCM, Merck, Alemania) y 200 mg de polímero (PLGA 50:50, *Resomer® RG 503, viscosidad 0,41 dl/g, Boehringer Ingelheim, Alemania*). Por otro lado, la fase acuosa consistía en 4 ml de una disolución acuosa de alcohol polivinílico (PVA, 87-89% hidrolizado, Mw 30-70 kDa, *Sigma-Aldrich, Alemania*) al 1%.

Se añadió la fase acuosa sobre la oleosa y se aplicó agitación en vórtex (Genie 2, Scientific Industries) durante 1 minuto a alta velocidad (posición 8). Finalmente se mezcló la emulsión con 96 ml de PVA al 0,1% y se dejó bajo agitación magnética durante 1 h en campana de extracción para eliminar el disolvente orgánico. Las microesferas fueron separadas mediante filtración a vacío utilizando un filtro de membrana (0,45 µm, Pall Corporation, 47 mm) y posteriormente liofilizadas.

3.1.1. Rendimiento de encapsulación

El rendimiento de encapsulación se calculó a partir de la determinación de la indometacina libre en la fase externa acuosa tras la filtración, mediante espectrofotometría (Ultrospec 3300 pro, Amersham Biosciences) a una longitud de onda de 320 nm, previa validación del método.

3.1.2. Tamaño

El tamaño de las microesferas tras la liofilización fue determinado usando un analizador de tamaño de partículas por difracción de luz láser (Mastersizer 2000, *Malvern Instruments*) (Figura 3).



Figura 3. Mastersizer 2000 (Malvern Instruments). Laboratorio de Caracterización de Partículas y Microsuperficies, SEGAI-ULL.

3.2. Preparación y caracterización de gránulos de alginato

La formación de los gránulos se basa en la reacción de reticulación del alginato en presencia de cloruro cálcico.

El método consiste en gotear desde una jeringa de 3 mL (9,83 mm de diámetro) una suspensión acuosa de alginato (*Protanal LF 10/60 FT*, viscosidad 44 mPas, FMC Corporation, USA) sobre 50 ml de una disolución de CaCl_2 0,15 M, que actúa como agente entrecruzante, bajo agitación magnética a 300 rpm. El flujo de goteo fue de 0,3 ml/min y se fija utilizando una bomba de infusión situada en un plano de inclinación de 50 grados sobre la superficie y bajo una corriente de aire como se indica en la figura 4. Tras 15 minutos de agitación, los gránulos resultantes fueron separados por filtración y conservados húmedos hasta su utilización (no más allá de 15 minutos).

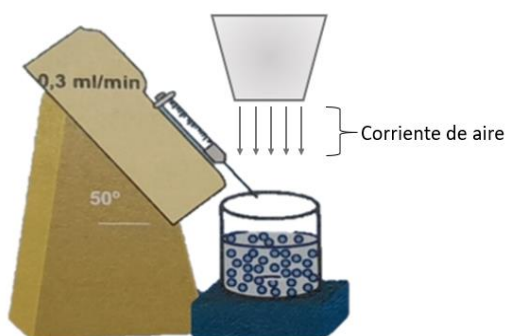


Figura 4. Esquema del montaje realizado para la preparación de los gránulos de alginato. Adaptada de Delgado J.J., 2009 [12].

Los gránulos estudiados fueron preparados con dos concentraciones distintas de alginato, 1,3% y 0,7%, y de cloruro cálcico, 0,15 M y 0,075 M respectivamente. La indometacina

es incorporada al 8,4% en la suspensión de alginato, bien como indometacina libre o previamente encapsulada en las microesferas.

3.2.1. Morfología y tamaño

Con el objetivo de determinar la forma y tamaño de los gránulos formados, se recurrió a la observación y obtención de imágenes usando un estereomicroscopio (Leica M205 C, Leica LAS, v3 software) (figuras 8-13) y con microscopia electrónica de barrido (SEM, ZEISS EVO 15) (*figuras 14 y 15*).

El diámetro medio de los gránulos se obtuvo a través de las imágenes captadas con el estereomicroscopio y utilizando el programa DFC Twain V1.8 (Leica Microsystems).

3.2.2. Rendimiento de encapsulación

Para la evaluación del contenido, se determinó la cantidad de indometacina en la disolución de CaCl_2 sobre la que se gotea la suspensión de alginato conteniendo indometacina libre o en microesferas de PLGA.

3.2.3. Ensayo de liberación

El ensayo de liberación fue realizado utilizando cantidades conocidas de gránulos e incubándolos en pocillos (placas de 24 pocillos) con 100 μl de agua a temperatura ambiente y protegido de la luz. Se tomaron muestras durante 7 días, retirando el volumen de agua y lavando 5 veces con 100 μl . Dicho volumen era repuesto con medio fresco tras cada medición. La cantidad de fármaco liberado fue evaluada a través del método espectrofotométrico anteriormente descrito. El ensayo se realiza por triplicado.

3.3. Preparación y caracterización de los apósitos

Para la elaboración de los apósitos se utilizó el método Capa a Capa depositando capas alternas de disoluciones, en NaCl 0,15 M, de alginato al 0,5% y de quitosano al 0,25% (CHT, viscosidad 598 cP al 1% en una disolución acuosa de ácido acético al 1%; 81% deacetilado, Sigma-Aldrich, Alemania) sobre un soporte de rejilla (moldes de histología).

Entre cada capa se realiza un lavado con NaCl 0,15 M y se retiraba el exceso de líquido con papel. El tiempo de espera tras la adición de cada capa fue de 7 minutos, para permitir el entrecruzamiento entre capas por interacción entre las cargas negativas del alginato y las positivas del quitosano.

Una vez incorporadas las seis primeras capas, tres de alginato y tres de quitosano, se añade una cantidad establecida de gránulos (60 gránulos/cm²) y se completa el procedimiento hasta un total de 12 capas. Finalmente, se dejaron secar a temperatura ambiente 24 h.

3.3.1. Morfología

Nuevamente, para visualizar la morfología se recurrió a la observación y obtención de imágenes usando un estereomicroscopio (Leica M205 C, Leica LAS, v3 software)

3.3.2. Ensayo de liberación

Se utilizó el mismo procedimiento descrito en el ensayo de liberación de gránulos (sección 3.2.3). Para ello, cada apósito (1x1 cm) fue pesado e incubado en 100 µL de medio. El ensayo se llevó a cabo por triplicado y en dos medios de liberación, agua y tampón fosfato pH 7,4 (TP).

3.3.3. Captación de agua

Las condiciones bajo las que se realizó el ensayo de captación de agua fueron las mismas que las descritas para el ensayo de liberación (sección 3.3.2).

Tras tres días de incubación, se extrajeron los apósitos y se retiró el exceso de agua para volver a ser pesados y calcular el porcentaje de agua captada (ecuación 1).

$$\% \text{ Captación de agua} = \frac{\text{Peso húmedo}(mg) - \text{Peso inicial}(mg)}{\text{Peso inicial}(mg)} \times 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

3.3.4. Porosidad

La determinación de la porosidad se realizó midiendo la densidad real con el Picnómetro de Helio (Accupyc 1330, *Micromeritics*) (Figura 5). Una vez conocida la densidad real, se calculó la densidad aparente (ecuación 2) y la porosidad (ecuación 3).

$$\rho_{\text{pap}} = \frac{m}{v} \quad (\text{Ec. 2.})$$

donde, ρ_{pap} : densidad aparente (g/cm^3), m : masa (g), v : volumen (largo x ancho x alto, cm^3).

La altura de los apósitos se midió sobre imágenes obtenidas con el estereomicroscopio (Leica M205 C, Leica LAS, v3 software).

$$\% \text{ Porosidad} = \frac{\rho - \rho_{\text{pap}}}{\rho} \times 100 \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde, ρ : densidad real (g/cm^3); ρ_{pap} : densidad aparente (g/cm^3)



Figura 5. Picnómetro de Helio, Accupyc 1330 (*Micromeritics*). Laboratorio de Caracterización de Partículas y Microsuperficies, SEGAI-ULL.

4. Resultados

4.1. Tamaño Microesferas

En la determinación del tamaño de las microesferas se obtuvieron los siguientes resultados.

Lote	Diámetro medio (percentil acumulado)
Microesferas elaboradas con 24 mg de indometacina	41,99 μm (<50%) (10%< 16,667 μm ; 90%< 63,460 μm)
Microesferas elaboradas con 50 mg de indometacina	18,893 μm (<50%) (10%< 2,797 μm ; 90%< 49,428 μm)

Tabla 1. Diámetro medio de las microesferas, medido en Mastersizer 2000.

A modo de ejemplo, en la figura 6 se muestra la distribución del tamaño de partículas para el lote de microesferas de PLGA preparado con 24 mg de indometacina.

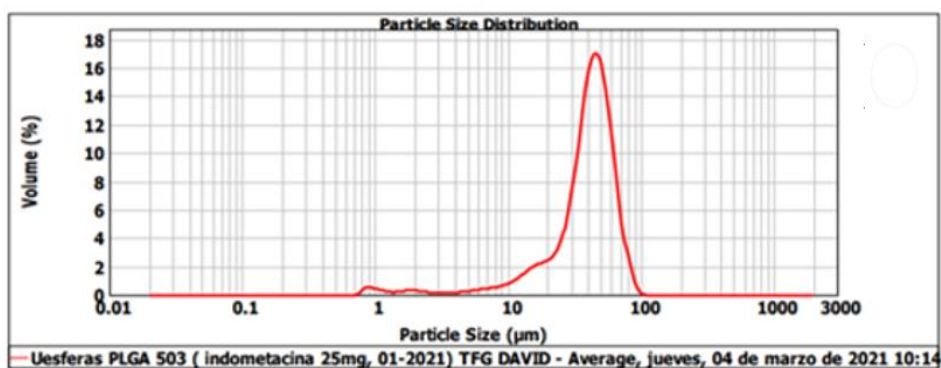


Figura 6. Representación gráfica de la distribución de tamaño de un lote de microesferas de PLGA conteniendo indometacina, a modo de ejemplo.

4.2. Rendimiento de encapsulación en las microesferas

La figura 7 representa la recta de calibrado de indometacina en agua, utilizada para evaluar la cantidad de indometacina no incorporada en las microesferas.

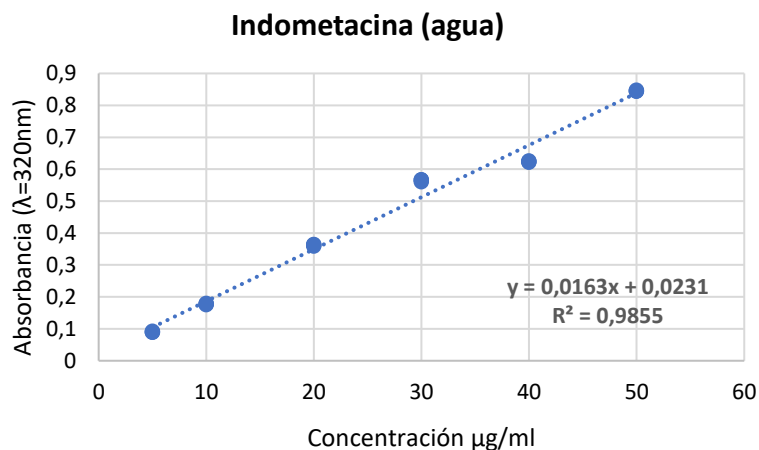


Figura 7. Recta patrón de Indometacina en agua.

La tabla 2 muestra los resultados del rendimiento de encapsulación de la indometacina en microesferas elaboradas con distintas cantidades de fármaco.

Indometacina carga inicial (mg)	Indometacina sobrenadante (mg)	indometacina encapsulada (mg)	Rendimiento encapsulación (%)	Media (%)	SD
24	4,3	19,7	82	84,3	4,9
24	4,6	19,4	81		
50	5,0	45,0	90		

Tabla 2. Rendimiento de encapsulación de indometacina en microesferas de PLGA (media y desviación estándar).

Se puede observar que el rendimiento de incorporación del fármaco es elevado, independientemente de la cantidad utilizada para su preparación, lo que refleja la adecuación del método de elaboración.

4.3. Tamaño de Gránulos

Los diámetros medios de las distintas variedades de gránulos (G) de alginato elaborados se recogen en la tabla 3.

Formulación	Descripción	Diámetro promedio (mm)	SD
G-ALG(1,3)-IM	Gránulos húmedos con microesferas (Alginato 1,3% y CaCl ₂ 0,15M)	1,65	0,19
G-ALG(1,3)-IL	Gránulos húmedos con indometacina libre (Alginato 1,3% y CaCl ₂ 0,15M)	1,40	0,11
G-ALG(0,7)-IL	Gránulos húmedos con indometacina libre (Alginato 0,7% y CaCl ₂ 0,075M)	1,33	0,16

Tabla 3. Diámetro promedio y desviación estándar de gránulos de alginato medidos a partir de las imágenes obtenidas con el estereomicroscopio.

4.4. Rendimiento de encapsulación en gránulos

La cantidad de indometacina perdida durante la elaboración de los gránulos (tras 15 minutos de agitación en CaCl₂) fue indetectable por el método espectrofotométrico utilizado en este trabajo, indicativo de un alto rendimiento de encapsulación, independientemente de su composición.

4.5. Morfología de gránulos y apósitos

En la tabla 4 se recoge la descripción de las distintas formulaciones de apósitos (AP) preparadas.

Formulación	Descripción
AP-G-ALG(1,3)-IM	Apósitos con gránulos (Alginato 1,3% y NaCl ₂ 0,15M) conteniendo microesferas con indometacina 20 mg
AP-G-ALG(1,3)-IL	Apósitos con gránulos (Alginato 1,3% y NaCl ₂ 0,15M) conteniendo indometacina libre 8,4 mg
AP-G-ALG(0,7)-IL	Apósitos con gránulos (Alginato 0,7% y NaCl ₂ 0,075M) conteniendo indometacina libre 8,4 mg

Tabla 4. Nomenclatura utilizada para nombrar las formulaciones en forma de apósitos y detalles de su composición

Las figuras 8-15 muestran las fotografías obtenidas empleando el estereomicroscopio y el microscopio electrónico de barrido de las diferentes formulaciones de gránulos y apósitos.

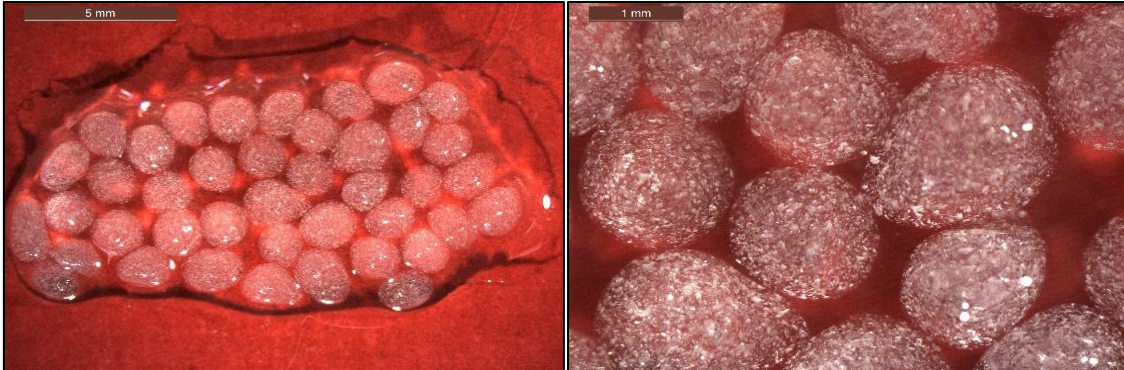


Figura 8. Imágenes de gránulos húmedos (Alginato 1,3% y CaCl_2 0,15M) conteniendo indometacina en microesferas de PLGA, tomadas con un estereomicroscopio.

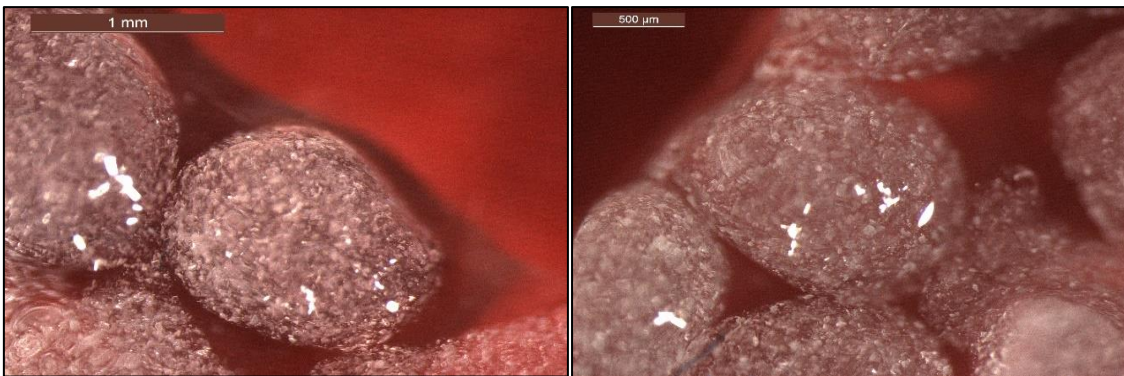


Figura 9. Imágenes de Gránulos húmedos (Alginato 1,3% y CaCl_2 0,15M) conteniendo indometacina libre, tomadas con un estereomicroscopio.

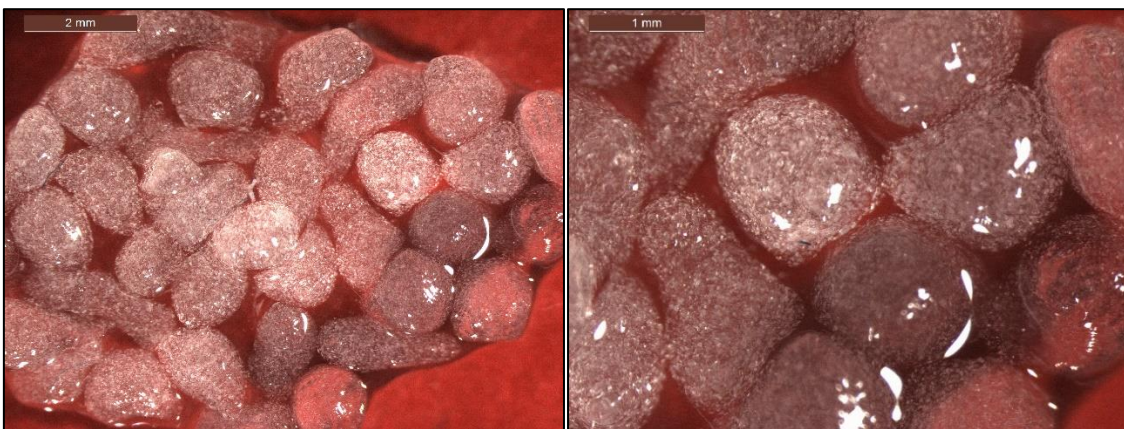


Figura 10. Imágenes de Gránulos húmedos (Alginato 0,7% y CaCl_2 0,075M) conteniendo indometacina libre, tomadas con un estereomicroscopio.

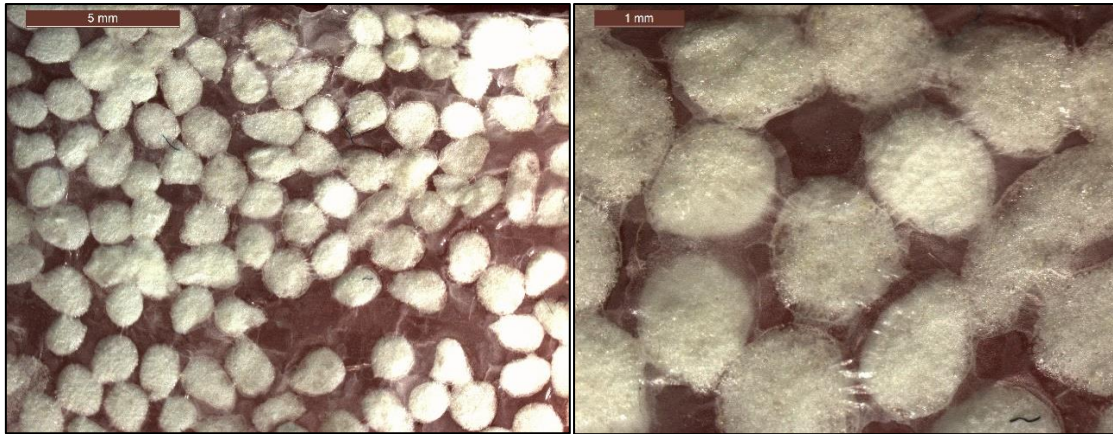


Figura 11. Imágenes de Apósitos conteniendo gránulos (Alginato 1,3% y CaCl_2 0,15M) cargados con microesferas, tomadas con un estereomicroscopio.

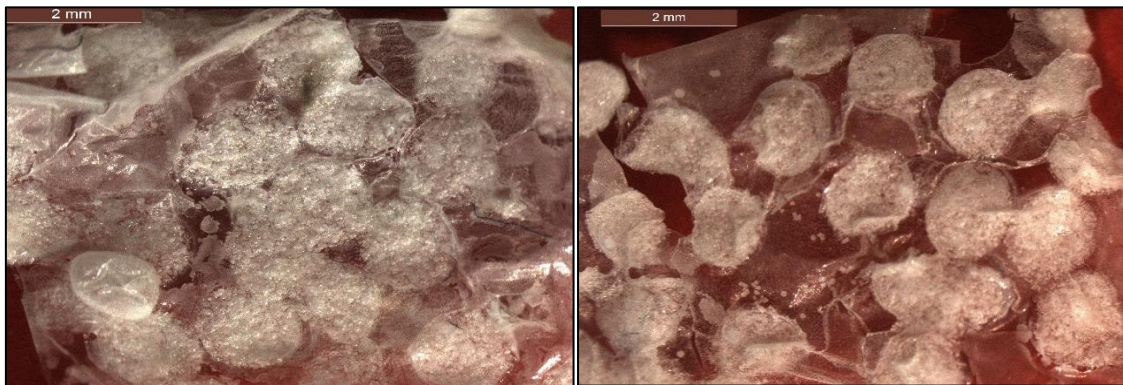


Figura 12. Imágenes de Apósitos conteniendo gránulos (Alginato 1,3% y CaCl_2 0,15M) cargados con indometacina libre, tomadas con un estereomicroscopio.

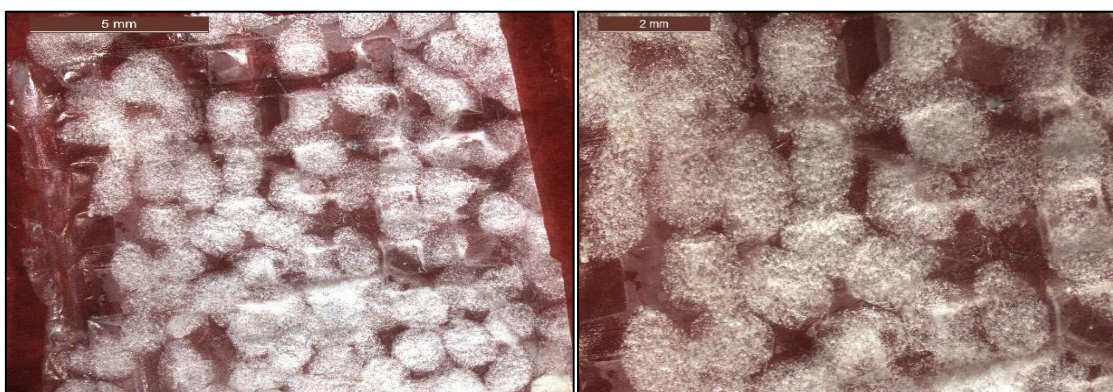


Figura 13. Imágenes de apósitos conteniendo gránulos (Alginato 0,7% y CaCl_2 0,075M) cargados con indometacina libre, tomadas con un estereomicroscopio.

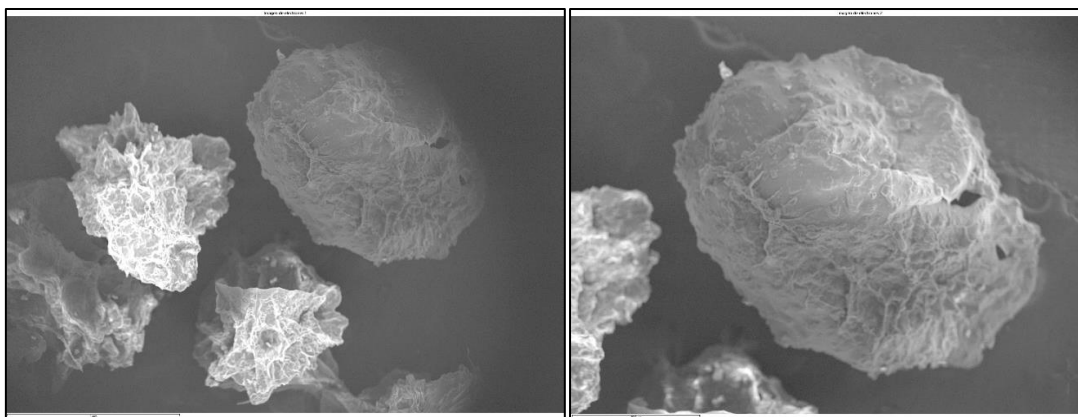


Figura 14. Microfotografías de la superficie de los gránulos conteniendo indometacina libre (Alginato 1,3% y CaCl_2 0,15M) obtenidas al SEM. Aumentos x35 (izq) y x50 (dcha).

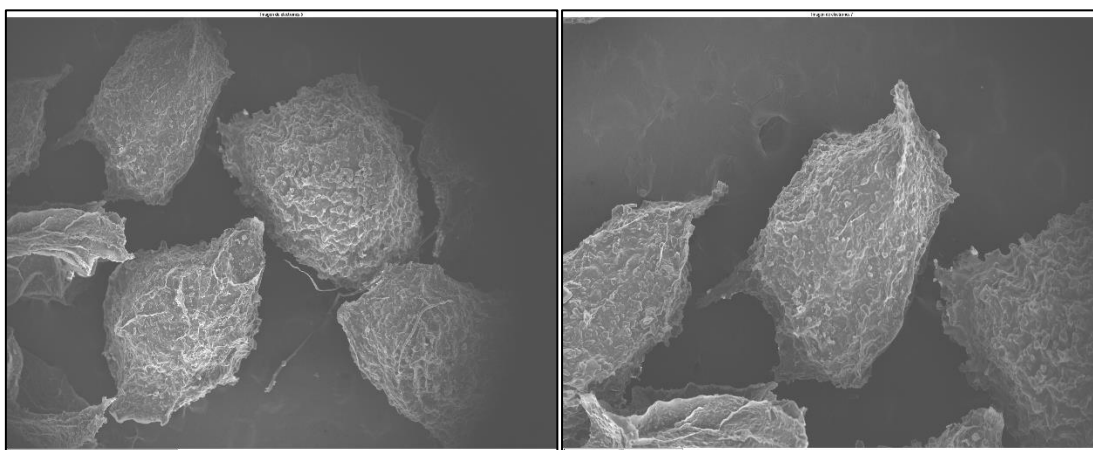


Figura 15. Microfotografías de la superficie de los gránulos conteniendo indometacina libre (Alginato 0,7% y CaCl_2 0,075M) obtenidas al SEM. Aumentos x35 (izq) y x50 (dcha).

4.6. Porosidad de los apósitos

La determinación de la densidad real usando el picnómetro de helio y los posteriores cálculos, proporcionaron los siguientes datos.

Formulación	Densidad real (g/cm^3)	Volumen (cm^3)	Densidad aparente (g/cm^3)	Porosidad (%)
AP-G-ALG(1,3)-IL	1,5087	0,0165	0,778	48,4
AP-G-ALG(0,7)-IL	1,9375	0,0338	0,308	84,1

Tabla 5. Resultados de porosidad de los apósitos preparados.

Efectivamente, la disminución de la concentración de alginato lleva consigo un aumento de la porosidad.

4.7. Ensayo de liberación

Para poder cuantificar la indometacina en los ensayos de liberación realizados, se empleó, además de la recta de calibrado de indometacina en agua (figura 7), una nueva recta patrón en tampón fosfato (figura 16).

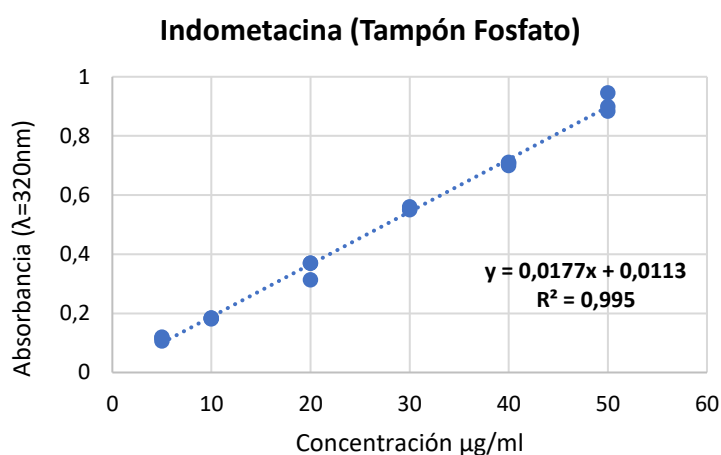


Figura 16. Recta de calibrado de Indometacina en tampón fosfato (pH 7,4).

4.7.1. Ensayo de liberación de indometacina desde los gránulos

La tabla 6 muestra la cantidad acumulada de indometacina liberada, a lo largo de 7 días en agua, desde las formulaciones de gránulos de alginato incorporando la indometacina previamente encapsulada en microesferas (G-ALG(1,3)-IM) o libre (G-ALG(1,3)-IL). La figura 17 refleja los resultados del ensayo en forma de porcentaje liberado.

Días	G-ALG(1,3)-IM		G-ALG(1,3)-IL	
	media (μg)	SD	media (μg)	SD
0,00	0	0,00	0,00	0,00
1,00	6,66	0,03	13,89	0,03
4,00	9,14	0,02	17,09	0,34
5,00	9,14	0,02	25,98	0,29
7,00	9,14	0,02	32,09	0,37

Tabla 6. Cantidad media acumulada y desviación estándar de indometacina liberada desde gránulos conteniendo microesferas (IM) y desde gránulos con indometacina libre (IL) durante 7 días en agua.

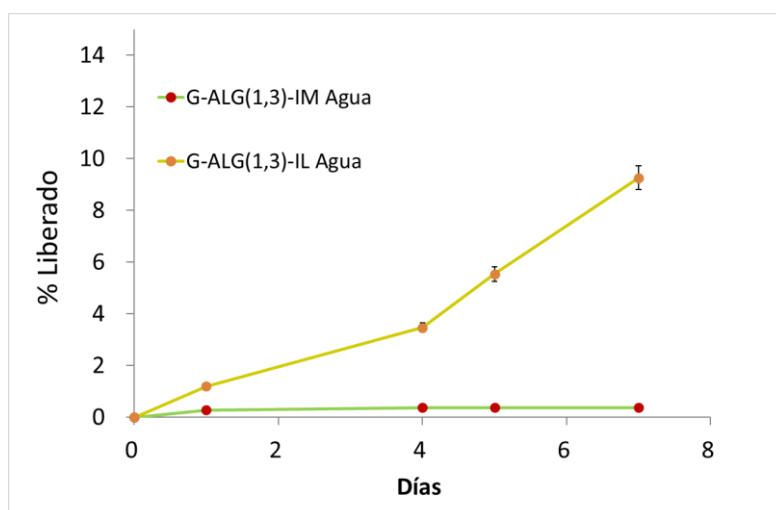


Figura 17. Porcentaje de indometacina liberado desde gránulos cargados con microesferas (IM) y desde gránulos conteniendo indometacina libre (IL) a lo largo de 7 días en agua.

Los resultados indican que los gránulos cargados con indometacina libre presentan una liberación mayor que los gránulos conteniendo la indometacina incorporada en microesferas, alcanzando valores próximos al 10% liberado frente al 0,37% de las microesferas.

Tras esta liberación tan lenta de la indometacina desde las microesferas y teniendo en cuenta la frecuencia del cambio de apósitos, se tomó la decisión de no continuar con las formulaciones que contenían microesferas.

4.7.2. Ensayo de liberación de indometacina desde los apósitos

Los perfiles de liberación de indometacina desde la formulación AP-G-ALG(1,3)-IL, tanto en agua como en tampón fosfato, se muestran en la tabla 7 y figura 18.

Los resultados del ensayo en tampón fosfato (22%) duplicaron el porcentaje liberado en agua (10,3%), denotando el papel del tampón fosfato en el secuestro de los iones calcio que mantienen el entrecruzamiento del alginato. Además comparando las figuras 17 y 18 podemos observar que el porcentaje liberado desde los gránulos G-ALG(1,3)-IL y desde los AP-G-ALG(1,3)-IL en agua es prácticamente el mismo; lo que pone de manifiesto que las capas que constituyen el apósito no juegan ningún papel en la liberación de este fármaco pero sí son un buen soporte para este tipo de sistemas particulados.

AP-G-ALG(1,3)-IL/Agua			AP-G-ALG(1,3)-IL/ TP		
Días	media (μg)	SD	Días	media (μg)	SD
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,00	25,60	0,06	1,00	20,86	0,06
4,00	70,65	0,47	2,00	165,52	0,26
5,00	115,57	0,39	3,00	278,24	0,27
6,00	140,45	0,48	4,00	382,48	1,03
7,00	199,30	0,27	7,00	428,80	1,21

Tabla 7. Cantidad media acumulada y desviación estándar de indometacina liberada desde apósitos (AP) durante 7 días en agua y en tampón fosfato.

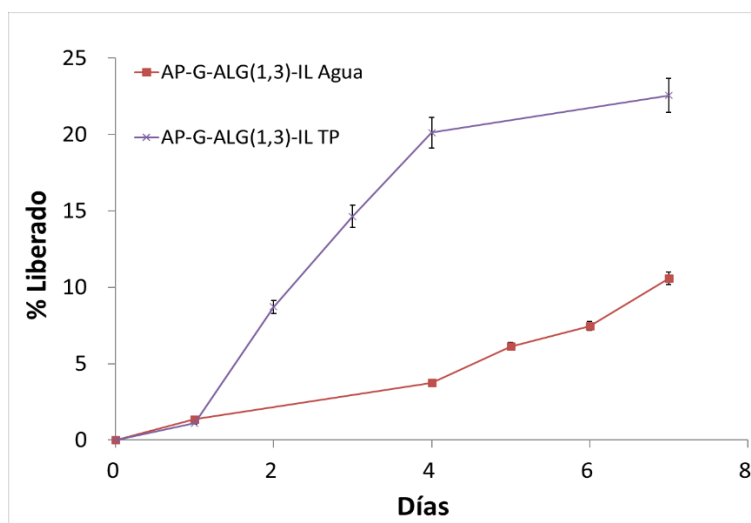


Figura 18. Porcentaje de indometacina liberado desde apósitos (AP) a lo largo de 7 días en agua y en tampón fosfato.

Con la finalidad de incrementar la liberación del fármaco, se preparó un nuevo lote de apósitos (AP-G-ALG(0,7)-IL), esta vez disminuyendo la concentración de alginato y CaCl₂ empleado en la elaboración de los gránulos, a 0,07% y 0,075M, respectivamente. La tabla 8 y figura 19 muestran los resultados del ensayo de liberación para estas formulaciones.

	AP-G-ALG(0,7)-IL/ agua			AP-G-ALG(0,7)-IL/TP	
Días	media (µg)	SD	Días	media (µg)	SD
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,00	19,15	0,04	1,00	21,03	0,06
2,00	41,92	0,07	2,00	162,10	1,37
3,00	72,01	0,27	3,00	300,00	1,93
6,00	94,01	0,30	4,00	431,26	2,43
7,00	174,10	0,40	7,00	731,65	3,66

Tabla 8. Cantidad media acumulada y desviación estándar de indometacina liberada desde apósitos con gránulos elaborados con alginato al 0,7% a lo largo de 7 días en agua y en tampón fosfato.

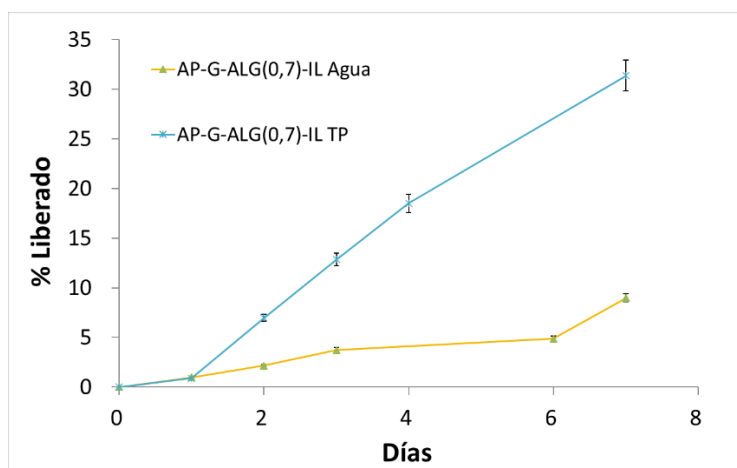


Figura 19. Porcentaje de indometacina liberado desde los apósitos conteniendo gránulos de alginato elaborados con alginato al 0,7%, a lo largo de 7 días en agua y tampón fosfato.

4.8. Captación de agua y tampón fosfato

La tabla 9 refleja los resultados del ensayo de captación de agua y tampón fosfato por parte de los apósitos conteniendo gránulos de alginato elaborados con alginato al 1,3% y al 0,7%.

Ambas formulaciones presentan una elevada captación de agua y tampón fosfato, demostrando su buen rendimiento para absorber exudados de una herida.

	Peso Inicial (mg)	Peso húmedo (mg)	Captación (%)	Media (%)	SD
AP-G-ALG(1,3)-IL en agua	15,50	38,50	148,39	114,76	30,31
	15,30	29,0	89,54		
	12,60	26,00	106,35		
AP-G-ALG(1,3)-IL en TP	14,00	74,90	435,00	452,50	17,23
	11,50	63,60	453,04		
	10,80	61,50	469,44		
AP-G-ALG(0,7)-IL en agua	5,90	16,40	177,97	170,98	15,86
	5,60	15,80	182,14		
	5,30	13,40	152,83		
AP-G-ALG(0,7)-IL en TP	6,90	64,20	830,43	895,94	80,43
	3,50	38,00	985,71		
	6,00	58,30	871,67		

Tabla 9. Resultados del ensayo de captación de agua y tampón fosfato para los apósitos compuestos por gránulos de alginato al 1,3% (AP-G-ALG(1,3)-IL) y al 0,7% (AP-G-ALG(0,7)-IL).

5. Discusión

En este trabajo se ha pretendido formular la indometacina en apósitos elaborados por la técnica de Capa a Capa y que deben retirarse de la herida en un tiempo relativamente corto, que hemos fijado en 3 días.

Inicialmente se incorporó el fármaco en microesferas, que fueron incluidas en gránulos de alginato y finalmente en los apósitos. Aunque esta formulación fue abandonada, debido a la lenta liberación del fármaco, sí nos hizo ver que la baja solubilidad en agua de la indometacina junto con su gran afinidad por el PLGA, polímero hidrófobo, resulta en un alto rendimiento de encapsulación, pero da lugar a una escasa liberación. De hecho, las microesferas de polímero derivados del ácido poliláctico son sistemas utilizados para controlar la liberación de fármacos y, en estas condiciones, resulta excesivamente lenta para el fin perseguido (<1% en una semana).

Por este motivo, nos decantamos por encapsular la indometacina libre directamente en los gránulos de alginato. Además, se disminuyó la concentración de alginato de 1,3 a 0,7% como estrategia para promover la liberación y se evaluó la misma tanto en agua como en tampón fosfato. La primera propuesta se basa en que la porosidad del apósito se incrementa al disminuir la concentración de alginato de los gránulos como se ve reflejado en la tabla 5. Por otro lado, el uso de tampón fosfato no sólo está justificado porque su pH se aproxima al pH de las heridas, que oscila entre 7,15 y 8,9 [13], sino que además el fosfato puede secuestrar al Ca^{+2} que se encuentra entrecruzando las cadenas del alginato aumentando su porosidad, incrementando su capacidad de captación de líquidos y por ende facilitando la disolución de la indometacina que podrá entonces difundir fuera de la red polimérica.

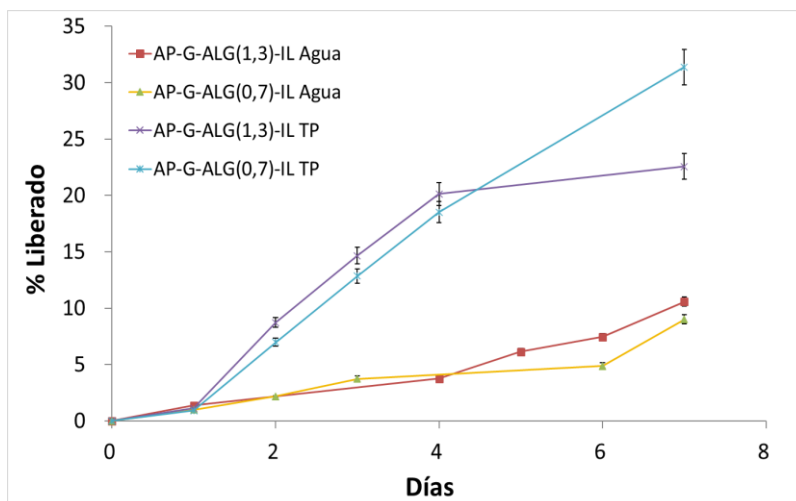


Figura 20. Comparación de los perfiles de liberación de las formulaciones AP-G-ALG(1,3)-IL y AP-G-ALG(0,7)-IL en tampón fosfato y agua.

Efectivamente, la liberación en tampón fosfato fue superior que en agua (figura 20) aunque, el efecto de la concentración de alginato, por lo menos en el periodo inicial de 3 días, no se manifiesta.

Teniendo en cuenta estos resultados y resaltando que la captación de medio tamponado se incrementa notablemente en los apósitos elaborados con la concentración inferior de alginato (tabla 9) se refuerza el argumento de que el principal factor limitante de la liberación de la indometacina es su propia solubilidad.

6. Conclusiones

La técnica de Capa a Capa permite preparar soportes adecuados, por entrecruzamiento de las capas de alginato-quitosano, para incorporar formulaciones particuladas conteniendo fármacos.

La indometacina es un antiinflamatorio que puede resultar eficaz en el tratamiento de heridas. Sin embargo, su baja solubilidad en agua retrasa excesivamente su liberación desde los apósitos fabricados en este trabajo.

El apósito elaborado puede ser útil para el tratamiento de heridas, aun cuando el total de la dosis de indometacina contenida no está disponible en la herida a tratar en los 3 días para los que está diseñado.

7. Bibliografía

- [1] Demidova-Rice TN, Hamblin MR, Herman IM. Acute and impaired wound healing: Pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1 normal and chronic wounds biology, causes, and approaches to care. *Adv Skin Wound Care*. 2012;25(7):304–14.
- [2] Zhao R, Liang H, Clarke E, Jackson C, Xue M. Inflammation in chronic wounds. *Int J Mol Sci*. 2016;17(12):2085
- [3] Armstrong DG, Meyr AJ, Sanfey H, Eidt JF, Mills JL, Bruera E, Berman RS. Basic principles of wound management [Internet]. 2014. Disponible en: <https://www.uptodate.com/contents/basic-principles-of-wound-management>
- [4] Guarín-Corredor C, Quiroga-Santamaría P, Landínez-Parra NS. Proceso de cicatrización de heridas de piel, campos endógenos y su relación con las heridas crónicas. *Rev Fac Med*, 2013; 61(4): 441-448.
- [5] Saghazadeh S, Rinoldi C, Schot M, Kashaf SS, Sharifi F, Jalilian E, et al. Drug delivery systems and materials for wound healing applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018;127:138-66.
- [6] Benedi J, Romero C. Apósitos Revisión. *Farm Prof* 2006; 20(6):52-56.
- [7] Shi C, Wang C, Liu H, Li Q, Li R, Zhang Y, Liu Y, Shao Y, Wang J. Selection of appropriate wound dressing for various wounds. *Front Bioeng Biotech*. 2020; 8:182
- [8] Liu H, Wang C, Li C, Qin Y, Wang Z, Yang F, et al. A functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing. *RSC Adv*. 2018;8(14):7533-49.
- [9] Balleño A, Donato NR, Aranda Garcia FJ, Morales JA, Mendizabal E, Amashta IAK. Hidrogeles de alginato–quitosano y alginato–sulfato de quitosano para la remoción de iones cobre. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 2016;17(5):255-65.
- [10] Yuan W, Weng G-M, Lipton J, Li CM, Van Tassel PR, Taylor AD. Weak polyelectrolyte-based multilayers via layer-by-layer assembly: Approaches, properties, and applications. *Adv Colloid Interface Sci*. 2020;282 (102200):102200.

[11] Escobar, A.; Muzzio, N.; Moya, S.E. Antibacterial Layer-by-Layer Coatings for Medical Implants. *Pharmaceutics* 2021, 13, 16.

[12] Delgado JJ. Sistemas osteoinductores conteniendo Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF). Tesis Doctoral, 2009. Universidad de La Laguna.

[13] Schneider LA, Korber A, Grabbe S, Dissemond J. Influence of pH on wound-healing: a new perspective for wound-therapy? *Arch Derm Res.* 2007;298 (9):413–20.