



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Estudio de las propiedades fisicoquímicas y antimicóticas de complejos entre un polielectrolito y el ácido benzoico como molécula modelo**

**Leidy Johanna Dallos Morantes**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia  
Bogotá, Colombia  
2019



# **Estudio de las propiedades fisicoquímicas y antimicóticas de complejos entre un polielectrolito y el ácido benzoico como molécula modelo**

**Leidy Johanna Dallos Morantes**

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

**Doctora en Ciencias Farmacéuticas**

Directora:

D. Sc., M Sc., Q.F. Yolima Baena Aristizábal  
Profesora Titular  
Departamento de Farmacia  
Universidad Nacional de Colombia

Codirector:

Ph D., F. Bioq, Rubén Hilario Manzo.  
Profesor Titular  
Universidad Nacional de Córdoba

Línea de Investigación:

Sistemas conformados por complejos con polielectrolitos

Grupo de Investigación:

SILICOMOBA

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá, Colombia

2019



"Pour accomplir des grandes choses, nous devons  
ne pas seulement agir, mais aussi rêver ; ne pas  
seulement planifier, mais croire aussi"

Anatole France

"Para lograr grandes cosas debemos no sólo  
actuar, sino también soñar; no sólo planear sino  
también creer"

Traducción libre



# Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia, porque más allá de la formación académica, me lo ha brindado todo.

A mi directora de tesis, la profesora Yolima Baena por su incondicional apoyo, por su contagiosa alegría y positivismo, pero sobre todo por no rendirse.

A Jesús Vásquez por ser mi compañía, mi alegría y mi consuelo desde mucho antes que este proyecto iniciara. Porque antes de mí, tú no eras tú y antes de ti, yo no era yo.

A mi má Yolanda Morantes, a mi pá Víctor Dallos y a mi hermana Diana Carolina por su inmenso apoyo y por todo el amor que me han expresado. Éste logro es gracias a ustedes, por hacer de mí todo lo que soy.

Al equipo de mujeres valiosas que me rodeó en este largo camino, a todas las siento como amigas y hermanas, son grandes luchadoras, conocerlas hizo que este proceso valiera la pena. A Carolina Bejarano por su cariño, a Sindy Jimenez por su sincera amistad, a Marcela Mesa porque sus carcajadas todo lo curan, a Nataly Duarte por su nobleza para conmigo, a Lina Sanabria por su incondicional apoyo, a Patricia Avellaneda porque siento que la conozco *“de toda la vida”* y a Milena Baena por su sencillez y por la bonita amistad que compartimos.

A mis amigos de laboratorio también les quiero agradecer todo el apoyo que me brindaron. A Aldemar Gordillo por sus sabios consejos, a Jorge Montaña por su alegría y frescura, a Jors Vargas por toda la ayuda que me ofreció en los ensayos de actividad, A Juan José Carrascal y David Porras por hacer del laboratorio un lugar muy agradable.

Con mi más profunda admiración, le doy gracias a mi amiga Blanca Ovalle por todo el *“matoneo-amoroso”* que me hizo para animarme a culminar este ciclo. No sabes cómo lamento que ya no estés para compartir este momento.



## Resumen

La interacción de polielectrolitos con contraiones de uso farmacéutico ha sido aprovechada con múltiples propósitos, tales como la modulación de liberación, aumento de estabilidad de activos e incluso como potenciador de actividad bactericida. Sin embargo, pocos son los reportes de complejación de polielectrolitos con compuestos antimicóticos o con excipientes. La presente investigación buscó obtener complejos polielectrolito (CPE), de diferente composición, entre el polímero catiónico Eudragit® E100 y el ácido benzoico (agente preservante) y, evaluar sus propiedades fisicoquímicas y antimicóticas, para establecer posibles correlaciones entre ellas. Los resultados demostraron la apropiada obtención, por el método de evaporación de solvente, de diez composiciones de CPE (diferentes en el porcentaje de grupos amino del polímero neutralizado con el contraión benzoato y/o cloruro). Todas las propiedades fisicoquímicas estudiadas: patrones de difracción de rayos X, temperatura de transición vítrea, solubilidad, constante de afinidad, desplazamiento de ácido benzoico por intercambio iónico, evaluación de la carga de superficie y el comportamiento de liberación, demostraron dependencia de la composición de los CPE. Los estudios de actividad realizados frente a los hongos: *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis* y *Penicillium rubens*, por su parte, evidenciaron que, a condiciones de pH controlado, los complejos con mayor porcentaje de contraión benzoato contaban con un mayor efecto sobre los hongos filamentosos, mientras que, los resultados en la levadura fueron independientes de la composición. El polímero neutralizado únicamente con HCl, también exhibió actividad frente a los tres microorganismos. La correlación de las variables fisicoquímicas con las antimicóticas para *A. brasiliensis* y *P. rubens* demostró relación directa para solubilidad, pseudo-potencial  $\zeta$  y liberación. La causalidad de las correlaciones fue asociada a la interacción entre la carga de los CPE con los hongos y a la cantidad de activo disponible para ingresar a la célula.

**Palabras clave:** Polielectrolito, complejación, ácido benzoico, Eudragit® E100, actividad antimicótica.

## Abstract

The unique properties arising from the interaction of PE with inorganic or organic counterions have been explored for a variety of purposes such as drug delivery modulation, drug stability improvement and as bactericidal activity enhancer. However, there are few studies involving complexation between polyelectrolytes and antimycotic agents or excipients. The aim of the present study was focused on polyelectrolyte complex formation (PEC) between Eudragit® E100 (cationic polymer) and benzoic acid (preservative agent) obtaining a set of complexes with different composition. Physicochemical properties and antimycotic activity were evaluated in order to establish possible correlation. Results demonstrated the complexes formation, using solvent evaporation method, out of ten different PEC compositions (difference lies in neutralization amino group percentage by benzoate/chloride as counterion). The following properties were studied: X-ray diffraction, thermal analysis, solubility, counterionic condensation constant, benzoate displacement by ion exchange, surface charge and release profile. Evaluation of these properties proved that results are depending on PEC composition. Regarding with antimycotic activity, fungi *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis* and *Penicillium rubens*, showed that at fixed pH values, complexes with higher counterion benzoate percentage lead to higher activity on filamentous fungi whilst activity on yeast was independent of PEC composition. Polymer amino groups were also completely neutralized with hydrochloric acid and its antimycotic activity was evaluated and it exhibited activity on fungi. Physicochemical properties and antimycotic activity are directly correlated for *A. brasiliensis* and *P. rubens* concerning to solubility, pseudo,  $\zeta$  potential and release profile. This relation might be explained by interaction of PEC charge with fungi and benzoate amount available to cross cell membrane.

**Keywords:** polyelectrolyte complex, benzoic acid, Eudragit® E100, antimycotic activity.

# Contenido

	Pág.
Resumen .....	IX
Abstract.....	X
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas .....	XVII
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XXI
Introducción .....	1
Objetivos.....	3
<b>1. Aspectos teóricos .....</b>	<b>5</b>
1.1 Fundamento.....	6
1.2 Complejo desarrollado .....	13
1.2 Estado del arte.....	15
<b>2. Obtención de los complejos.....</b>	<b>29</b>
2.1 Metodología .....	30
2.1.1 Materiales.....	30
2.1.2 Métodos.....	31
<i>i. Selección de las condiciones de obtención.....</i>	<i>31</i>
<i>ii. Reproducibilidad del método de obtención de los complejos .....</i>	<i>36</i>
<i>iii. Caracterización por espectroscopía infrarroja .....</i>	<i>36</i>
2.2 Presentación y discusión de los resultados .....	37
<i>i. Selección de las condiciones de obtención.....</i>	<i>37</i>
<i>ii. Reproducibilidad del método de obtención de los complejos .....</i>	<i>43</i>
<i>iii. Caracterización por espectroscopía infrarroja .....</i>	<i>44</i>
2.3 Conclusiones .....	49
<b>3. Determinación de propiedades fisicoquímicas.....</b>	<b>51</b>
3.1 Metodología .....	51
3.1.1 Materiales.....	51
3.1.2 Métodos. ....	51
<i>i. Difracción de rayos X (DRX).....</i>	<i>52</i>
<i>ii. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) .....</i>	<i>52</i>
<i>iii. Solubilidad .....</i>	<i>52</i>
<i>iv. Distribución de especies y constante de afinidad.....</i>	<i>54</i>

v. Desplazamiento de AB por intercambio iónico .....	54
vi. Evaluación de la carga de superficie .....	55
vii. Comportamiento de liberación del ácido benzoico .....	55
3.2 Presentación y discusión de los resultados .....	57
i. Difracción de rayos X (DRX) .....	57
ii. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) .....	62
iii. Solubilidad .....	74
iv. Distribución de especies y constante de afinidad .....	83
v. Desplazamiento de AB por intercambio iónico .....	92
vi. Evaluación de la carga de superficie .....	98
vii. Comportamiento de liberación del ácido benzoico .....	110
3.3 Conclusiones .....	136
<b>4 Actividad antimicótica .....</b>	<b>139</b>
4.1 Metodología .....	147
4.1.1 Materiales .....	147
4.1.2 Métodos .....	148
i. Difusión en agar .....	148
ii. Dilución en agar .....	149
iii. Dilución en caldo .....	150
iv. Germinación de esporas .....	151
4.2 Presentación y discusión de los resultados .....	152
i. Difusión en agar .....	152
ii. Dilución en agar .....	160
iii. Dilución en caldo .....	162
iv. Germinación de esporas .....	184
4.3 Conclusiones .....	189
<b>5 Correlación entre propiedades fisicoquímicas y actividad antimicótica .....</b>	<b>193</b>
5.1 Metodología .....	195
i. Selección de las variables .....	195
ii. Determinación de las correlaciones .....	195
5.2 Presentación y discusión de los resultados .....	195
i. Selección de las variables .....	195
ii. Determinación de las correlaciones .....	196
5.3 Conclusiones .....	205
<b>Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>207</b>
Conclusiones .....	207
Recomendaciones .....	208
<b>Anexo A: Espectros IR de los complejos restantes .....</b>	<b>209</b>
<b>Anexo B: Activación de las cepas y preparación de inóculos .....</b>	<b>211</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>213</b>

## Lista de figuras

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1-1</b> Representación esquemática de la formación y agregación de los CPE. ....	9
<b>Figura 1-2</b> Equilibrios involucrados en la formación de un CPE con PE catiónico.....	10
<b>Figura 1-3</b> Estructura química del PE Eudragit® E100 .....	14
<b>Figura 1-4.</b> Estructura química del Ácido Benzoico.....	15
<b>Figura 2-1</b> Procedimientos utilizados para obtención de complejos PE-IFA.....	29
<b>Figura 2-2</b> Espectros FTIR de los complejos EuB <sub>25</sub> y EuB <sub>25</sub> Cl <sub>75</sub> , AB, EuE y MF. ....	45
<b>Figura 2-3</b> Espectro de FTIR en el rango de 2870 cm <sup>-1</sup> a 2750 cm <sup>-1</sup> para los complejos con neutralización de AB del 25%. ....	47
<b>Figura 2-4</b> Espectro de FTIR en el rango de 3700 cm <sup>-1</sup> a 3080 cm <sup>-1</sup> para los complejos con neutralización de AB del 25%. ....	48
<b>Figura 2-5</b> Espectro FTIR en el rango de 3700 cm <sup>-1</sup> a 2700 cm <sup>-1</sup> para EuE y los ionómeros EuCl <sub>25</sub> , EuCl <sub>50</sub> , EuCl <sub>75</sub> y EuCl <sub>100</sub> . ....	49
<b>Figura 3-1.</b> Punto final del ensayo de solubilidad de “ <i>Cantidad máxima aceptada</i> ”.....	54
<b>Figura 3-2:</b> Esquema de una celda de Franz y partes que la conforman. ....	56
<b>Figura 3-3</b> Patrones de DRX de los diez complejos obtenidos, reactivos de partida y mezcla física. ....	58
<b>Figura 3-4</b> Sobreposición de los difractogramas de ácido benzoico experimental y el reportado por Cambridge Structural Database. ....	59
<b>Figura 3-5</b> Termogramas de AB, EuE, mezcla física y complejos de la familia “EuB <sub>50</sub> ”..	63
<b>Figura 3-6</b> Termogramas de los complejos de la familia “EuB <sub>25</sub> ”, “EuB <sub>75</sub> ” y EuB <sub>100</sub> .....	64
<b>Figura 3-7</b> Termogramas de EuE, MF y los diez complejos en rango de temperatura de 0°C a 75°C. ....	66
<b>Figura 3-8</b> Temperaturas de transición vítrea <i>T<sub>g</sub></i> para los complejos EuB <sub>25</sub> Cl <sub>x</sub> (■), EuB <sub>50</sub> Cl <sub>x</sub> (●), EuB <sub>75</sub> Cl <sub>x</sub> (▲) y EuB <sub>100</sub> (▼). En el eje X se presenta el porcentaje de grupos DMAE neutralizado con ácido clorhídrico. ....	67
<b>Figura 3-9</b> Temperaturas de transición vítrea <i>T<sub>g</sub></i> para los ionómeros EuCl <sub>(25-100)</sub> reportadas por los autores: (■) Guzmán [71], (●) Villada [164] y los obtenidos en el presente estudio (▲) (Dallos). ....	69
<b>Figura 3-10</b> Temperaturas del evento endotérmico para los complejos EuB <sub>25</sub> Cl <sub>x</sub> (■), EuB <sub>50</sub> Cl <sub>x</sub> (●), EuB <sub>75</sub> Cl <sub>x</sub> (▲) y EuB <sub>100</sub> (▼). En el eje X se presenta el porcentaje de grupos DMAE neutralizado con ácido clorhídrico. ....	72
<b>Figura 3-11.</b> Formación del anhídrido cíclico de seis miembros en Eudragit® E 100.....	72
<b>Figura 3-12</b> Comparación del espectro de FTIR para el complejo EuB <sub>25</sub> Cl <sub>50</sub> antes y después del análisis de DSC.....	73

<b>Figura 3-13</b> Valores de pH promedio de las dispersiones acuosas de los complejos EuB <sub>25</sub> Cl <sub>x</sub> (■), EuB <sub>50</sub> Cl <sub>x</sub> (●), EuB <sub>75</sub> Cl <sub>x</sub> (▲) y EuB <sub>100</sub> (▼), a concentración de 0,5% de EuE. En el eje X se presenta el porcentaje de grupos DMAE neutralizado con ácido clorhídrico. ....	77
<b>Figura 3-14</b> Cantidad de <b>a)</b> complejo y <b>b)</b> ácido benzoico, por mililitro de agua para EuB <sub>25</sub> Cl <sub>x</sub> (■), EuB <sub>50</sub> Cl <sub>x</sub> (●), EuB <sub>75</sub> Cl <sub>x</sub> (▲) y EuB <sub>100</sub> (▼). En el eje X se presenta el porcentaje de grupos DMAE neutralizado con ácido clorhídrico.....	82
<b>Figura 3-15</b> Equilibrios asociados a la obtención de CPE entre EuE y AB. ....	84
<b>Figura 3-16</b> Representación de las especies y equilibrios establecidos en los complejos obtenidos en condiciones de diálisis. ....	86
<b>Figura 3-17</b> Valores de <i>Log K<sub>cc</sub></i> promedio de las dispersiones acuosas de los complejos EuB <sub>25</sub> Cl <sub>x</sub> (■), EuB <sub>50</sub> Cl <sub>x</sub> (●), EuB <sub>75</sub> Cl <sub>x</sub> (▲) y EuB <sub>100</sub> (▼), a concentración de 0,5% de EuE. En el eje X se presenta el porcentaje de grupos DMAE neutralizado con ácido clorhídrico. ....	91
<b>Figura 3-18</b> Variación del pH debida al intercambio iónico tras la adición de cloruro de sodio en los complejos de las familias <b>a)</b> “EuB <sub>25</sub> ”, <b>b)</b> “EuB <sub>50</sub> ”, <b>c)</b> “EuB <sub>75</sub> ” y <b>d)</b> para EuB <sub>100</sub> y aquellos sin AB. El porcentaje de grupos DMAE neutralizado con ácido clorhídrico corresponde a: (■) 0%; (●)25%; (▲)50%; (▼)75% y (◆) 100%.....	95
<b>Figura 3-19</b> Valores de ΔpH debidos al intercambio iónico tras la adición de cloruro de sodio a las dispersiones acuosas de los sistemas EuB <sub>25</sub> Cl <sub>x</sub> (■), EuB <sub>50</sub> Cl <sub>x</sub> (●), EuB <sub>75</sub> Cl <sub>x</sub> (▲), EuB <sub>100</sub> (▼) y EuCl <sub>x</sub> (◆), a concentración de 0,5% de EuE. En el eje X se presenta el porcentaje de grupos DMAE neutralizado con ácido clorhídrico.....	97
<b>Figura 3-20</b> Representación del modelo de doble capa de sistemas coloidales. ....	99
<b>Figura 3-21</b> Valores de p-ζ promedio de las dispersiones en NaCl 1mM de los complejos EuB <sub>25</sub> Cl <sub>x</sub> (■), EuB <sub>50</sub> Cl <sub>x</sub> (●), EuB <sub>75</sub> Cl <sub>x</sub> (▲) y EuB <sub>100</sub> (▼), a concentración de 0,5% de EuE. En el eje X se presenta el porcentaje de grupos DMAE neutralizado con ácido clorhídrico. ....	106
<b>Figura 3-22</b> Cambios en el p-ζ y pH con el incremento de la proporción del contraión cloruro para las series de complejos: a) B <sub>25</sub> , b) B <sub>50</sub> y c) B <sub>75</sub> .....	107
<b>Figura 3-23</b> Efecto del pH en el p-ζ para el EuE, a partir de los valores de las diez composiciones. Concentración del PE 0,5%, medio dispersante: NaCl 1mM en agua. .	108
<b>Figura 3-24</b> Efecto de la concentración de EuE en el pot-ζ. Concentración: 0,06% AB, medio dispersante: NaCl 1mM en agua, ajuste de pH a 6,0.....	109
<b>Figura 3-25</b> Perfiles de liberación acumulativa de ácido benzoico en agua, para las dispersiones de los diez complejos al 0,5 % de EuE, con volumen de compartimento donador de 5 ml.....	116
<b>Figura 3-26</b> Valores de porcentaje máximo liberado de AB en agua (en t=8h), para las dispersiones al 0,5 % de EuE, con volumen de compartimento donador de 5 ml de los complejos: EuB <sub>25</sub> Cl <sub>x</sub> (■), EuB <sub>50</sub> Cl <sub>x</sub> (●), EuB <sub>75</sub> Cl <sub>x</sub> (▲) y EuB <sub>100</sub> (▼). En el eje X se presenta el porcentaje de grupos DMAE neutralizado con ácido clorhídrico. ....	118
<b>Figura 3-27</b> Valores de constante de velocidad de orden cero ( <i>K<sub>0</sub></i> ) para las dispersiones al 0,5 % de EuE, medio receptor agua y volumen de compartimento donador de 5 ml de los	

complejos:  $\text{EuB}_{25}\text{Cl}_x(\blacksquare)$ ,  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_x(\bullet)$ ,  $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_x(\blacktriangle)$  y  $\text{EuB}_{100}(\blacktriangledown)$ . En el eje X se presenta el porcentaje de grupos DMAE neutralizado con ácido clorhídrico. .... 119

**Figura 3-28** Perfiles de liberación acumulativa de ácido benzoico en agua, para las dispersiones de los diez complejos al 0,5 % de EuE, con volumen de compartimento donador de 1 ml. .... 122

**Figura 3-29** Valores de constante de velocidad de Higuchi ( $K_H$ ) para las dispersiones al 0,5 % de EuE, medio receptor agua y volumen de compartimento donador de 1 ml de los complejos:  $\text{EuB}_{25}\text{Cl}_x(\blacksquare)$ ,  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_x(\bullet)$ ,  $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_x(\blacktriangle)$  y  $\text{EuB}_{100}(\blacktriangledown)$ . En el eje X se presenta el porcentaje de grupos DMAE neutralizado con ácido clorhídrico. .... 123

**Figura 3-30** Valores de constante de velocidad de Higuchi ( $K_H$ ) vs pH para las dispersiones al 0,5 % de EuE, medio receptor agua y volumen de compartimento donador de 1 ml ..... 124

**Figura 3-31** Perfiles de liberación acumulativa de ácido benzoico en agua, para las dispersiones de los diez complejos y solución de referencia; concentración: 0,046 % de AB y volumen de compartimento donador: 1 ml. .... 126

**Figura 3-32** Valores de constante de velocidad de Higuchi ( $K_H$ ), concentración de PE ([EuE]) y pH donador ( $t=0$ ) para las dispersiones al 0,046 % de AB, medio receptor agua y volumen de compartimento donador de 1 ml de los complejos:  $\text{EuB}_{25}\text{Cl}_x(\blacksquare)$ ,  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_x(\bullet)$ ,  $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_x(\blacktriangle)$  y  $\text{EuB}_{100}(\blacktriangledown)$ . En el eje X se presenta el porcentaje de grupos DMAE neutralizado con ácido clorhídrico. .... 129

**Figura 3-33** Perfiles de liberación acumulativa de AB en buffer de fosfatos a pH: 6,0, para las dispersiones de los diez complejos y solución de referencia. Concentración: 0,6 % de AB y volumen de compartimento donador: 1 ml. .... 131

**Figura 3-34** Valores de constante de velocidad de Higuchi ( $K_H$ ) para las dispersiones al 0,6 % de AB, medio receptor buffer de fosfatos a pH 6,0 y volumen de compartimento donador de 1 ml de los complejos:  $\text{EuB}_{25}\text{Cl}_x(\blacksquare)$ ,  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_x(\bullet)$ ,  $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_x(\blacktriangle)$  y  $\text{EuB}_{100}(\blacktriangledown)$ . En el eje X se presenta el porcentaje de grupos DMAE neutralizado con ácido clorhídrico. .... 133

**Figura 3-35** Perfiles de liberación acumulativa de AB en buffer de fosfatos a pH: 6,9, para las dispersiones de los complejos  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$ ,  $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$  y  $\text{EuB}_{100}$  y solución de referencia. Concentración: 0,6 % de AB y volumen de compartimento donador: 1 ml..... 134

**Figura 4-1.** Fotografía de la interacción presentada entre agar Sabouraud y la dispersión acuosa del complejo  $\text{EuB}_{50}$  (al 0,5% de AB) al emplear la metodología de difusión en agar..... 153

**Figura 4-2** Fotografías del estudio de difusión en agar para algunos CPE y BNa (al 0,5% de AB) en **a)** *C. albicans*, **b)** *A. brasiliensis* y **c)** *P. rubens*. En cada placa se presenta control de crecimiento y control de inhibición (nistatina). .... 154

**Figura 4-3** Diámetro de los halos de inhibición (en mm) presentados por a) *C. albicans*, b) *A. brasiliensis* y c) *P. rubens* como respuesta a la aplicación de las dispersiones de los CPE al 0,5% de AB. Complejos:  $\text{EuB}_{25}\text{Cl}_x(\blacksquare)$ ,  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_x(\bullet)$ ,  $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_x(\blacktriangle)$  y  $\text{EuB}_{100}(\blacktriangledown)$ . En el eje X se presenta el porcentaje de grupos DMAE neutralizado con ácido clorhídrico. .... 159

<b>Figura 4-4</b> Fotografías de los resultados de la metodología dilución en agar para la determinación de la CMI de: <b>a)</b> Benzoato de sodio a pH 4,5 y <b>b)</b> $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$ a pH 5,3; frente a <i>C. albicans</i> .....	161
<b>Figura 4-5</b> Fotografías de los resultados de la metodología dilución en caldo para la determinación <b>a)</b> CMI y <b>b)</b> CMF de: $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$ frente a <i>C. albicans</i> (utilizando medio de crecimiento a pH 5,2 sin ajuste de pH final) .....	164
<b>Figura 4-6</b> Fotografías de los resultados de la metodología dilución en caldo para la determinación de CMI y CMF para $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$ frente a <b>A. brasiliensis</b> (sección a y b) y frente a <b>P. rubens</b> (sección c y d).....	167
<b>Figura 4-7</b> Fotografías del recuento de células viables por la técnica de conteo por placa para el control de crecimiento de <b>a)</b> <i>C. albicans</i> , <b>b)</b> <i>A. brasiliensis</i> y <b>c)</b> <i>P. rubens</i> .....	173
<b>Figura 4-8</b> Efecto de la composición de los CPE en la reducción logarítmica de UFC de <b>a)</b> <i>C. albicans</i> , <b>b)</b> <i>A. brasiliensis</i> y <b>c)</b> <i>P. rubens</i> para BNa(◆) y los complejos: $\text{EuB}_{25}\text{Cl}_x$ (■), $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_x$ (●), $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_x$ (▲), $\text{EuB}_{100}$ (▼) y $\text{EuCl}_{100}$ (◄) al 0,6% de AB y pH 6,0. En el eje X se presenta el porcentaje de grupos DMAE neutralizado con ácido clorhídrico.....	175
<b>Figura 4-9</b> Efecto del pH en la reducción logarítmica de UFC de <b>a)</b> <i>C. albicans</i> , <b>b)</b> <i>A. brasiliensis</i> y <b>c)</b> <i>P. rubens</i> para $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$ (■), $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$ (●), $\text{EuB}_{100}$ (▲), $\text{EuCl}_{100}$ (◄) y BNa(◆) al 0,6% de AB.....	179
<b>Figura 4-10</b> Efecto de la concentración de AB en la reducción logarítmica de UFC de <b>a)</b> <i>C. albicans</i> , <b>b)</b> <i>A. brasiliensis</i> y <b>c)</b> <i>P. rubens</i> para $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$ (■), $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$ (●), $\text{EuB}_{100}$ (▲), $\text{EuCl}_{100}$ (◄) y BNa(◆) a pH 6,9.....	182
<b>Figura 4-11</b> Fotografías de las esporas de <i>A. brasiliensis</i> y <i>P. rubens</i> , con y sin proceso germinativo, tomadas en objetivo 40x de microscopio óptico (Leica, DM500). .....	184
<b>Figura 4-12</b> Efecto de la concentración de AB en la inhibición de la germinación de esporas de <i>A. brasiliensis</i> y <i>P. rubens</i> para $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$ (■), $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$ (●), $\text{EuB}_{100}$ (▲), $\text{EuCl}_{100}$ (◄) y BNa(◆) a pH 6,0 y 6,9. ....	186
<b>Figura 4-13.</b> Organización estructural de la pared celular de algunos hongos patógenos, .....	188
<b>Figura 5-1</b> Influencia de varias propiedades fisicoquímicas en la actividad antimicótica de los diez CPE frente a <i>Aspergillus brasiliensis</i> y <i>Penicillium rubens</i> a pH 6,0. ....	198
<b>Figura 5-2</b> Influencia las variables de liberación (% $\text{AB}_{\text{Liberado}}$ y $K_H$ ) en la actividad antimicótica de los CPE: $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$ (■), $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$ (●) y $\text{EuB}_{100}$ (▲), frente a <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus brasiliensis</i> y <i>Penicillium rubens</i> a pH 6,9. ....	202
<b>Figura 5-3</b> Influencia las variables de liberación (% $\text{AB}_{\text{Liberado}}$ y $K_H$ ) en la inhibición de germinación de esporas de <i>Aspergillus brasiliensis</i> y <i>Penicillium rubens</i> , por parte de los CPE: $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$ (■), $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$ (●) y $\text{EuB}_{100}$ (▲), a pH 6,0 y 6,9.....	204

## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 1-1</b> Clasificación general de los agentes preservantes más utilizados. ....	12
<b>Tabla 1-2</b> Investigaciones relacionadas con formulaciones de IFA antimicrobianos y su efecto en la actividad antimicrobiana. ....	16
<b>Tabla 1-3</b> Estado del arte de CPE con fármacos con actividad antimicrobiana. ....	18
<b>Tabla 1-4:</b> Estado del arte de CPE con preservantes en alimentos. ....	21
<b>Tabla 1-5.</b> Estado del arte de CPE con preservantes en farmacia. ....	23
<b>Tabla 1-6</b> Estudios de caracterización y evaluación de propiedades fisicoquímicas de CPE. ....	24
<b>Tabla 1-7.</b> Estudios para la evaluación de actividad antimicótica. ....	26
<b>Tabla 2-1</b> Composición de los complejos obtenidos. ....	32
<b>Tabla 2-2</b> Variables y niveles seleccionados para los ensayos preliminares de obtención de los complejos. ....	32
<b>Tabla 2-3</b> Variables seleccionadas para la obtención de los complejos en los ensayos preliminares. ....	33
<b>Tabla 2-4</b> Factores seleccionados para el DEE factorial fraccionado para la obtención de los complejos. ....	35
<b>Tabla 2-5</b> Matriz del DEE factorial fraccionado para la selección de las condiciones de elaboración del complejo EuB <sub>100</sub> . ....	35
<b>Tabla 2-6</b> Matriz del DEE factorial fraccionado para la selección de las condiciones de elaboración del complejo EuB <sub>50</sub> Cl <sub>50</sub> . ....	35
<b>Tabla 2-7.</b> <i>Porcentaje de AB retenido por el complejo</i> , determinado por la metodología de <i>ultracentrifugación</i> para los ensayos preliminares con los complejos modelo. ....	40
<b>Tabla 2-8</b> Porcentaje de AB retenido por el complejo, determinado por la metodología de <i>diálisis</i> para los ensayos preliminares con los complejos modelo. ....	40
<b>Tabla 2-9.</b> Selección de las condiciones de elaboración de los complejos aplicando DEE factorial fraccionado. Resultados consolidados para la variable respuesta. ....	42
<b>Tabla 2-10</b> Selección de las condiciones de elaboración de los complejos aplicando DEE factorial fraccionado. Resultados de los efectos y error experimental. ....	42
<b>Tabla 2-11.</b> Condiciones para la obtención de los complejos elegidos. ....	43
<b>Tabla 2-12</b> Valores de AB experimentales y teóricos para tres lotes de cada uno de los CPE estudiados. ....	43

<b>Tabla 2-13</b> Bandas de las transiciones vibracionales —de importancia en el proceso de complejación— de los espectros FTIR de los diez complejos obtenidos, reactivos de partida y mezcla física (MF). .....	44
<b>Tabla 2-14.</b> Señales de FTIR asociadas a Eudragit® E100. ....	46
<b>Tabla 2-15.</b> Señales de FTIR asociadas a ácido benzoico.....	46
<b>Tabla 3-1</b> Condiciones de volumen de compartimento donador, concentración, medio receptor y frecuencia de muestreo para las cinco etapas de estudios de liberación.....	57
<b>Tabla 3-2</b> Estudios de DRX para dispersiones sólidas de EuE. ....	61
<b>Tabla 3-3</b> Valores de $T_m$ y $T_g$ asociados a los termogramas obtenidos, para los complejos, compuestos de partida y mezcla física. ....	67
<b>Tabla 3-4</b> Estudios relacionados con el efecto de la adición de principios activos en la $T_g$ de un polímero. ....	68
<b>Tabla 3-5</b> Valores de temperatura y flujo de calor asociados al evento endotérmico presente en la parte final de los termogramas.....	71
<b>Tabla 3-6</b> Estudio de la solubilidad y pH para los diez complejos en dispersión al 0,5% de EuE.....	76
<b>Tabla 3-7</b> Solubilidad cualitativa de los diez complejos a concentración de 0,6 % de AB, en buffer de fosfatos a diferentes valores de pH. ....	79
<b>Tabla 3-8</b> Solubilidad cualitativa de los diez complejos a concentración de 0,6 % de AB en agua, a diferentes valores de pH.....	80
<b>Tabla 3-9</b> Cantidad máxima de complejo aceptada en agua.....	81
<b>Tabla 3-10.</b> Estudios de CPE relacionados con la determinación de la distribución de especies en el equilibrio y el cálculo de la constante de afinidad de condensación iónica. ....	85
<b>Tabla 3-11</b> Distribución de especies en el equilibrio y $\text{Log } K_{cc}$ obtenidas por diálisis a 25°C.....	89
<b>Tabla 3-12</b> Cambios de pH debidos al intercambio iónico tras la adición de cloruro de sodio a las dispersiones de los complejos al 0,5 % de EuE. ....	97
<b>Tabla 3-13</b> Estudios relacionados con el comportamiento electroforético de PE. ....	101
<b>Tabla 3-14</b> Valores del pseudo-potencial zeta ( $p-\zeta$ ) para los diez complejos en dispersión. Concentración: al 0,5 % de EuE; medio dispersante: solución de NaCl 1mM en agua..	104
<b>Tabla 3-15</b> Valores del pseudo-potencial zeta ( $p-\zeta$ ) para los diez complejos en dispersión (pH 6,0; concentración: al 0,06 % de AB; medio dispersante: solución de NaCl 1mM en agua) y concentración del PE a las condiciones del estudio. ....	109
<b>Tabla 3-16</b> Modelos matemáticos comúnmente utilizados para analizar la cinética de liberación de activos.....	111
<b>Tabla 3-17.</b> Estudios de liberación de sistemas CPE en celdas de difusión bicompartimentales. ....	111
<b>Tabla 3-18</b> Condiciones sink de los ensayos de liberación de la Etapa 1 (Vol donador: 5ml, concentración complejo: 0,5 % de EuE y medio: agua).....	115
<b>Tabla 3-19</b> Valores de porcentaje máximo liberado de AB (en $t=8h$ ) y de pH relacionados con los ensayos de liberación de la etapa 1 (Vol donador: 5ml, concentración complejo: 0,5	

% de EuE y medio: agua). El pH del medio receptor (agua miliq) en $t=0$ fue 5,60 (0,21). .....	117
<b>Tabla 3-20</b> Parámetros y coeficientes de determinación de varios modelos cinéticos de liberación para la dispersión de complejos entre EuE y AB, a las condiciones de la etapa 1 (al 0,5 % de EuE, con volumen de compartimento donador de 5 ml y medio receptor: agua). .....	119
<b>Tabla 3-21</b> Condiciones sink de los ensayos de liberación de la etapa 2 (Vol donador: 1ml, concentración complejo: 0,5 % de EuE y medio: agua). .....	121
<b>Tabla 3-22</b> Parámetros y coeficientes de determinación de varios modelos cinéticos de liberación para la dispersión de complejos entre EuE y AB, a las condiciones de la etapa 2 (al 0,5 % de EuE, con volumen de compartimento donador de 1 ml y medio receptor: agua). .....	123
<b>Tabla 3-23</b> Concentración del PE para cada dispersión, valores de porcentaje máximo liberado de AB (en $t=8h$ ) y pH relacionado con los ensayos de liberación de la etapa 3 (Vol donador: 1ml, concentración complejo: 0,046 % de AB y medio: agua). .....	127
<b>Tabla 3-24</b> Parámetros y coeficientes de determinación de varios modelos cinéticos de liberación para la dispersión de complejos entre EuE y AB, a las condiciones de la etapa 3 (al 0,046 % de AB, con volumen de compartimento donador de 1 ml y medio receptor: agua). .....	128
<b>Tabla 3-25</b> Concentración del PE para cada dispersión y valores de porcentaje máximo liberado de AB (en $t=8h$ ) para los ensayos de liberación de la etapa 4 (Vol donador: 1ml, concentración complejo: 0,6 % de AB y medio: buffer de fosfatos a pH 6,0). .....	131
<b>Tabla 3-26</b> Parámetros y coeficientes de determinación de varios modelos cinéticos de liberación para la dispersión de complejos entre EuE y AB, a las condiciones de la etapa 4 (al 0,6 % de AB, con volumen de compartimento donador de 1 ml y medio receptor: buffer de fosfatos a pH 6,0). .....	132
<b>Tabla 3-27</b> Parámetros y coeficientes de determinación de varios modelos cinéticos de liberación para la dispersión de los complejos $EuB_{50}Cl_{50}$ , $EuB_{75}Cl_{25}$ y $EuB_{100}$ y para AB, a las condiciones de la etapa 5 (al 0,6 % de AB, con volumen de compartimento donador de 1 ml y medio receptor: buffer de fosfatos a pH 6,9). .....	134
<b>Tabla 3-28</b> Valores promedio y rango de los coeficientes de difusión ( $D$ ) del modelo cinético de Korsmeyer-Peppas para las cinco etapas de estudios de liberación. .....	135
<b>Tabla 4-1:</b> Condiciones de composición de CPE, concentración y pH, en las tres fases de análisis de actividad antimicótica en caldo, mediante conteo de UFC en el punto final. .....	151
<b>Tabla 4-2</b> Halos de inhibición (en mm) presentados por <i>C. albicans</i> , <i>A. brasiliensis</i> y <i>P. rubens</i> como respuesta a la aplicación de benzoato de sodio y a las dispersiones de los CPE al 0,5 % de ácido benzoico mediante la técnica de difusión en agar. .....	155
<b>Tabla 4-3</b> Análisis de varianza evaluando los halos de inhibición del crecimiento de <i>C. albicans</i> , <i>A. brasiliensis</i> y <i>P. rubens</i> tratados con dispersiones de los complejos al 0,5% de AB. .....	156
<b>Tabla 4-4</b> Método de Tukey evaluando los halos de inhibición del crecimiento de <i>C. albicans</i> , <i>A. brasiliensis</i> y <i>P. rubens</i> tratados con dispersiones de los complejos al 0,5% de AB. .....	156
<b>Tabla 4-5</b> Concentración de $Cl^-$ y EuE para las dispersiones de CPE al 0,5% de AB. .....	158

X	Estudio de las propiedades fisicoquímicas y antimicóticas de complejos entre un
X	polielectrolito y el ácido benzoico como molécula modelo

---

<b>Tabla 4-6</b>	CMI frente a <i>Candida albicans</i> para el complejo $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$ y benzoato de sodio a seis valores de pH, determinada por el método de dilución en agar.....	160
<b>Tabla 4-7</b>	CMI y CMF frente a <i>C. albicans</i> para BNa y los diez CPE, (utilizando medio de crecimiento a pH 5,2 pero sin ajuste de pH final) y el pH de las dispersiones o solución al 0,6% de AB.....	165
<b>Tabla 4-8</b>	CMI y CMF frente a <i>C. albicans</i> , <i>A. brasiliensis</i> y <i>P. rubens</i> para BNa y los diez CPE a pH ajustado de 6,0.....	169
<b>Tabla 4-9</b>	Concentración de $\text{EuE}$ y $\text{Cl}^-$ para las dispersiones de CPE al 0,6% de AB..	170
<b>Tabla 4-10</b>	Valores de CMI de AB frente a <i>C. albicans</i> y <i>A. niger</i> reportados en la literatura.....	171
<b>Tabla 4-11</b>	Reducción logarítmica de UFC de <i>C. albicans</i> , <i>A. brasiliensis</i> y <i>P. rubens</i> como respuesta a la aplicación de benzoato sodio, $\text{EuCl}_{100}$ y los diez complejos en dispersión al 0,6% de AB y pH 6,0. ....	174
<b>Tabla 4-12</b>	Reducción logarítmica de UFC de <i>C. albicans</i> , <i>A. brasiliensis</i> y <i>P. rubens</i> como respuesta a la aplicación de $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$ , $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$ , $\text{EuB}_{100}$ , $\text{EuCl}_{100}$ y BNa al 0,6% de AB a diferentes condiciones de pH. ....	178
<b>Tabla 4-13</b>	Reducción logarítmica de UFC de <i>C. albicans</i> , <i>A. brasiliensis</i> y <i>P. rubens</i> como respuesta a la aplicación de $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$ , $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$ , $\text{EuB}_{100}$ , $\text{EuCl}_{100}$ y BNa a pH 6,9 en diferentes concentraciones de AB.....	181
<b>Tabla 4-14</b>	Inhibición de la germinación de esporas de <i>A. brasiliensis</i> y <i>P. rubens</i> como respuesta a la aplicación de $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$ , $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$ , $\text{EuB}_{100}$ , $\text{EuCl}_{100}$ y BNa a pH 6,0 y pH 6,9 en diferentes concentraciones de AB.....	185
<b>Tabla 5-1</b>	Estudios en los que relacionan propiedades fisicoquímicas con actividad antimicrobiana.....	193
<b>Tabla 5-2</b>	Información asociada a la regresión lineal (pendiente e intercepto de la recta), coeficiente de correlación de Pearson ( $r_{XY}$ ) y concepto de la correlación de las gráficas incluidas en la Figura 5-1. ....	200
<b>Tabla 5-3</b>	Información asociada a la regresión lineal (pendiente e intercepto de la recta), coeficiente de correlación de Pearson ( $r_{XY}$ ) y concepto de la correlación de las gráficas incluidas en la Figura 5-2. ....	203
<b>Tabla 5-4</b>	Información asociada a la regresión lineal (pendiente e intercepto de la recta), coeficiente de correlación de Pearson ( $r_{XY}$ ) y concepto de la correlación de las gráficas incluidas en la Figura 5-3. ....	205

## Lista de Símbolos y abreviaturas

### Símbolos

Símbolo	Término
<i>cm</i>	Centímetro
<i>Da</i>	Dalton
$\varepsilon$	Constante dieléctrica
$f_2$	Factor de diferenciación
$^{\circ}\text{C}$	Grado Celsius
<i>g</i>	Gramo
$K_a$	Constante de acidez
$K_{cc}$	Constante de afinidad de condensación iónica
<i>L</i>	Litro
$\lambda$	Longitud de Onda
<i>M</i>	Molaridad
<i>min</i>	Minuto
<i>ml</i>	Mililitro
<i>N</i>	Normalidad
<i>nm</i>	Nanómetro
<i>psi</i>	Libras por pulgada cuadrada
$r_{xy}$	Coefficiente de correlación de Pearson
<i>rpm</i>	Revoluciones por minuto
<i>t</i>	Tiempo
$T_g$	Temperatura de transición vítrea
$\mu\text{m}$	Micrómetro
$\zeta$	Potencial electrocinético
$\text{p-}\zeta$	Pseudo-potencial electrocinético
$U_E$	Movilidad electroforética

## Abreviaturas

### Abreviatura Término

---

AA19	Agar antibiótico No 19
AB	Ácido benzoico
ATCC	Colección americana de cultivos tipo, por sus siglas en inglés.
ATR	Reflectancia total atenuada, por sus siglas en inglés.
BNa	Benzoato de sodio
B <sup>-</sup>	Ion benzoato
CIPE	Complejo inter polielectrolito
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMF	Concentración mínima fungicida
Cl <sup>-</sup>	Ion cloruro
CPE	Complejo polielectrolito
<i>col</i>	Colaboradores
CV	Coefficiente de variación
DMAE	Grupo dimetilaminoetil metacrilato del Eudragit® E100
DEE	Diseño estadístico experimental
DSC	Calorimetría diferencial de barrido, por sus siglas en inglés
EuE	Eudragit® E100
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier, por sus siglas en inglés
ICONTEC	Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación
IFA	Ingrediente farmacéutico activo
MF	Mezcla física
NTC	Norma Técnica Colombiana
OMS	Organización Mundial de la Salud
PDA	Agar papa dextrosa, por sus siglas en inglés
PE	Polielectrolito
SBF	Solución de buffer de fosfatos
SDB	Caldo Sabouraud dextrosa, por sus siglas en inglés

**Abreviatura Término**

---

UV-VIS Ultravioleta Visible

UFC Unidades formadoras de colonia

USP Farmacopea de Estados Unidos, por sus siglas en inglés



# Introducción

La investigación en el desarrollo de sistemas de liberación modificada para ingredientes farmacéuticos activos (IFA) es un tema de gran interés en el campo farmacéutico, tanto en Colombia, como a nivel mundial y es una de las áreas de la farmacia que ha permitido múltiples avances, no solo en el control de liberación del IFA, sino además en tópicos como el aumento de estabilidad, incremento de solubilidad, potenciación de actividad farmacológica, entre otros. Afortunadamente para la industria farmacéutica de los países de desarrollo intermedio, esta área de investigación puede ser implementada con un presupuesto limitado y constituye una oportunidad para coexistir de forma competitiva con investigaciones de punta, que se focalizan en la síntesis y desarrollo de nuevas moléculas [1]. En este contexto, los sistemas de liberación modificada tipo “complejo polielectrolito” (CPE), son de gran interés, puesto que la interacción entre polielectrolitos (PE) e IFA con carga opuesta, modifican propiedades que han sido utilizadas favorablemente con múltiples propósitos: modulación de liberación, enmascaramiento de sabor, compatibilidad entre IFA, incremento de solubilidad, potenciación de actividad bactericida, etc. [2].

La interacción entre el PE Eudragit® E100 (EuE) y activos aniónicos ha sido el centro de estudio, por más de una década, de una de las líneas investigación del grupo SILICOMOBA perteneciente al Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia. La experiencia en la evaluación de estos sistemas condujo al desarrollo de la presente investigación, que buscó determinar algunas propiedades fisicoquímicas y la actividad antimicótica de CPE obtenidos entre ácido benzoico y EuE. La elección del preservante tuvo como propósito ampliar los estudios del grupo al área de los excipientes y, por otro lado, servir como molécula modelo de activo antimicótico. Hoy en día, la investigación relacionada con excipientes es uno de los campos que está en auge a nivel mundial y el presente trabajo contribuye en este sentido. Aunque en el ámbito alimenticio es bastante común el desarrollo de CPE con preservantes (en la obtención de películas comestibles con actividad antimicrobiana) los reportes académicos al respecto son

bastante limitados, ya que el objetivo de estos estudios es la funcionalidad de las películas; por lo anterior la consolidación de información del análisis de las propiedades fisicoquímicas asociadas a la interacción entre un PE y un preservante, es de gran utilidad, aún más si se tiene en cuenta que las investigaciones de este tipo son casi nulas en el campo cosmético y farmacéutico.

Por otra parte, la presente investigación puede suscitar la investigación de CPE para otros agentes antimicóticos; a fin de obtener nuevos entes químicos con características mejoradas respecto a sus precursores, no sólo en términos de actividad, sino también en función de las propiedades fisicoquímicas. Sobre esta base, una de las aplicaciones de la presente tesis, es el desarrollo de otros CPE entre EuE e IFA antifúngicos de carácter aniónico, dado que en las últimas décadas ha habido un incremento dramático de la incidencia de infecciones fúngicas, que requieren de nuevas propuestas, que suplan los mayores desafíos en el campo de investigación de enfermedades infecciosas, considerando la disminución de la susceptibilidad antifúngica de hongos emergentes en pacientes inmunosuprimidos [3].

Respecto a las correlaciones entre las propiedades fisicoquímicas y la actividad antimicótica de los CPE, la presente tesis aporta información útil para el direccionamiento de futuros estudios, ya que, el desarrollo de nuevos CPE con activos antimicóticos, debe focalizarse hacia los resultados de aquellas variables fisicoquímicas que demostraron tener incidencia en la actividad antimicótica. En este sentido se recomienda especial atención a la carga de la superficie de los complejos, a la solubilidad y al comportamiento de liberación.

# Objetivos

## Objetivo General

Estudiar algunas propiedades fisicoquímicas asociadas a la complejación entre el ácido benzoico y un polielectrolito catiónico, así como la posible influencia en su actividad antimicótica.

## Objetivos específicos

Establecer las condiciones para la obtención de CPE de diferente composición, formados entre el ácido benzoico y el Eudragit® E, empleando el método de evaporación del solvente.

Evaluar la influencia de la composición de los CPE en las propiedades fisicoquímicas: solubilidad, constante de afinidad, potencial Z y comportamiento de liberación.

Estudiar la influencia de la composición de los CPE en la actividad antimicótica de los sistemas obtenidos.

Establecer las posibles correlaciones entre las propiedades fisicoquímicas de los CPE obtenidos y su actividad antimicótica.



# 1. Aspectos teóricos

Las primeras investigaciones realizadas con polielectrolitos (PE) de las que se tiene referencia datan de 1930, sin embargo, el estudio de la ciencia y tecnología de polímeros inició algunas décadas atrás con la síntesis y caracterización de la estructura primaria. La evaluación de la conformación secundaria surgió años después impulsada por los avances desarrollados en otros campos como la bioquímica, en los que se evidenció la importancia de las interacciones no covalentes, entre ellas las iónicas, en las estructuras y en el metabolismo de los seres vivos [4]. Uno de los primeros estudios que demostró la existencia de interacciones poliméricas no covalentes, fue el realizado por Bungenberg de Jong y *col* en la Universidad de Leyden en 1932, en el que analizaron varios polímeros de origen natural en medio acuoso y determinaron que aquellos con grupos ionizables en su estructura eran capaces de “reaccionar” con otras macromoléculas para formar “complejos coacervados” siempre y cuando contaran con cargas contrarias. En esta misma investigación se estableció que la naturaleza y magnitud de la “reacción” eran sensibles a diferentes variables como la temperatura, el pH y la fuerza iónica de la fase en solución [5].

En la actualidad existen diversos campos de investigación dedicados al estudio de las interacciones poliméricas no covalentes; dentro de ellos, el dedicado a los complejos polielectrolito (CPE) es uno de los de mayor impacto; sus aplicaciones involucran diferentes áreas del conocimiento, en las que sobresalen los alcances en alimentos, farmacia, cosméticos, pinturas, separación de minerales, fabricación de papel y descontaminación de suelos [6,7]. Los avances en el campo farmacéutico surgieron a mediados del siglo XX con algunos estudios como el de Kennon y *col* de la Universidad de Wisconsin Madison, en el que evaluaron la interacción entre carboximetilcelulosa sódica y algunos fármacos de naturaleza química catiónica (procaína, quinina, difenhidramina entre otros) confirmando la formación de los respectivos complejos; sin embargo, por algunos

años estos hallazgos fueron asociados únicamente a incompatibilidades en el desarrollo de formulaciones farmacéuticas [8,9], fue hasta inicios de los años sesenta que se descubrió el potencial uso de los CPE como sistemas para la liberación controlada de fármacos y a partir de ello se han desarrollado múltiples investigaciones al respecto con principios activos de distinta naturaleza [10–24]. Las aplicaciones más modernas han permitido modular la liberación de material génico debido a la alta densidad de carga y biocompatibilidad con PE [25] e incluso las aplicaciones para la industria farmacéutica no se han limitado a fármacos, han surgido estudios sobre propiedades de CPE con propósitos relacionados con excipientes como: agentes viscosantes [26–28], enmascaramiento de sabores desagradables [29–33], incremento de estabilidad de activos [34–37], complejación con agentes preservantes para la obtención de entidades químicas con propiedades mejoradas [38,39], entre otros. Estos estudios enfocados a la interacción con excipientes, comparados en proporción a los desarrollados para controlar la liberación de fármacos, son muy pocos, sin embargo cuentan con un gran potencial de investigación, pues plantean la posibilidad de obtener “nuevos materiales”, con aplicaciones o con propiedades mejoradas, a partir de otros previamente caracterizados y totalmente conocidos [40–43].

En la presente investigación se estudió la interacción entre el PE catiónico Eudragit E100® (EuE) y el ácido benzoico (AB) —como molécula modelo de agente preservante y de activo antimicótico— buscando establecer las posibles ventajas en propiedades como solubilidad, liberación o incluso en actividad antimicótica de las “nuevas entidades químicas”. Para establecer un marco de referencia apropiado, a continuación, se presentan algunos aspectos fundamentales en la formación de CPE y características generales de agentes preservantes de uso farmacéutico; información relacionada con el PE y el activo seleccionados y el estado del arte en el cual se enmarca esta investigación.

## 1.1 Fundamento

### **Polielectrolitos**

El término polielectrolito hace referencia a un tipo de macromoléculas que al ser disueltas en un solvente polar, generalmente agua, adquieren un gran número de cargas distribuidas

a lo largo de la cadena macromolecular; el ADN, las proteínas y ciertos derivados de celulosa, son algunos de los más conocidos [44]. Los PE pueden ser clasificados de diferentes maneras. Basados en su origen en: naturales, sintéticos y modificados químicamente; de acuerdo a su composición: homopolímeros (un solo tipo de monómero) y copolímeros (más de un tipo de monómero); según su arquitectura molecular, en lineales, ramificados y entrecruzados; por su electroquímica en: ácidos (aniónicos), básicos (catiónicos) y anfóteros (zwiteriónicos) y basados en su solubilidad en: insolubles (resinas de intercambio iónico) y solubles (polímeros hidrofílicos dispersables) [45].

En estado “no cargado” los PE se comportan al igual que cualquier otra macromolécula, pero cuando disocian, aunque solo sea una pequeña fracción de los grupos ionizables, todas sus propiedades cambian dramáticamente. Las desviaciones del comportamiento “normal” del polímero derivan de las numerosas interacciones intra e intermoleculares producidas por la disociación parcial o total de los pares iónicos; propiedades como el coeficiente de difusión, la viscosidad y generación de dipolos dependen de la expansión de la cadena polimérica y por tanto de la repulsión electrostática entre segmentos cargados [45–48]. Aunque existan múltiples estudios experimentales de PE, la plena comprensión de sus propiedades emergió en años recientes, la razón principal por la que tomó tanto tiempo entender este tipo de polímeros es que la interacción entre grupos cargados, las fuerzas hidrofóbicas y los puentes de hidrogeno ocurren al mismo tiempo, de modo que la interrelación entre estos fenómenos conlleva a diferentes e interesantes efectos, como:

- ☞ Formación de estructura secundaria (linear, aglomerada) en función del tipo de solvente y carga del PE.
- ☞ Altos valores de presión osmótica debido a la liberación de contraiones.
- ☞ Formación de complejos con moléculas de carga opuesta.
- ☞ Mezcla de regiones de concentración diluida a semidiluida.
- ☞ Disminución de viscosidad con el aumento de concentración [25].

### **Complejos polielectrolito**

Los CPE corresponden al producto de la interacción entre un PE y otra molécula — polimérica o no— con carga eléctrica opuesta, en este sentido se pueden obtener CPE “sencillos”, en los que el contraión corresponde a una molécula de bajo peso molecular o complejos interpolielectrolito (CIPE) como producto de la reacción entre al menos dos PE.

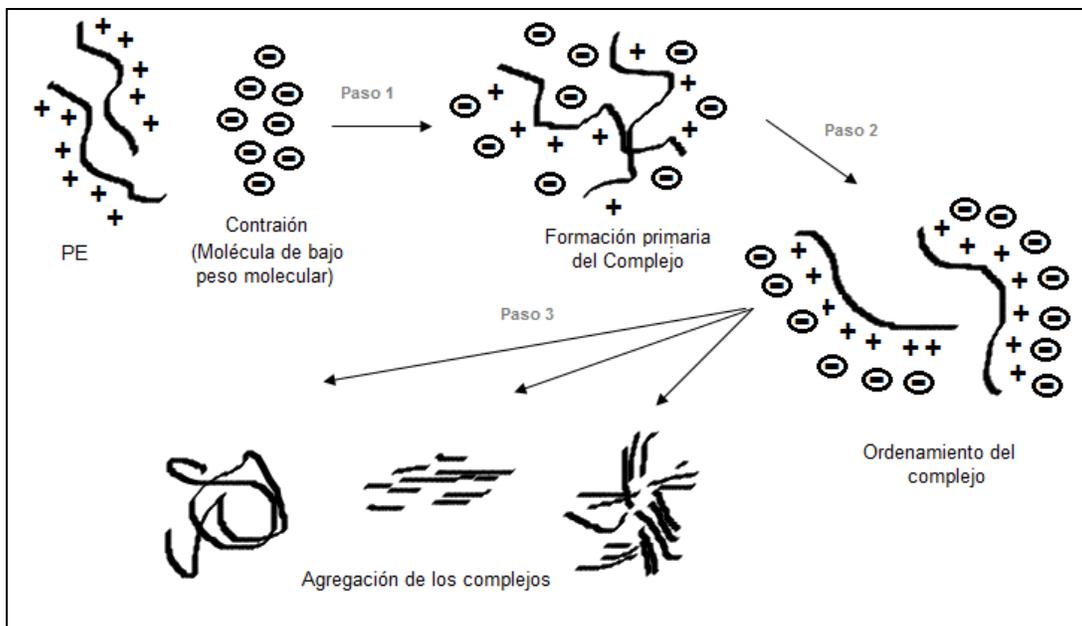
Las interacciones electrostáticas constituyen las principales fuerzas de atracción en la formación de los complejos, sin embargo, los enlaces de hidrogeno, las fuerzas ion dipolo y las interacciones hidrofóbicas frecuentemente juegan un papel determinante en la estructura final del complejo [49].

Aunque el trabajo experimental en complejación de PE es bastante amplio, existen muy pocas aproximaciones teóricas, esto ocurre porque la termodinámica y comportamiento en solución de los CPE involucra múltiples contribuciones como las de los grupos cargados, los iones presentes, el solvente empleado, entre otros. Las dos aproximaciones más frecuentemente utilizadas para describir los fenómenos observados son la teoría de Flory-Huggins (basada en un campo medio) y una teoría termodinámica estadística basada en Debye-Hückel, en esta última las interacciones entre cargas del mismo signo causan repulsión intramolecular que influye en la interacción y estructura del PE. La aproximación de Flory-Huggins se basa en la teoría del campo medio y la calidad del solvente, donde un buen solvente causa la extensión de la cadena del PE y uno malo la separación de fases; este enfoque asume que cada parte de la interacción monómero-monómero y de la interacción solvente-solvente tienen la misma energía y desestima la sobreposición de cadenas y fluctuaciones. De manera alterna a la teoría de Flory-Huggins, otros métodos, como el parámetro de solubilidad de Hansen, pueden ser utilizados para determinar la calidad del solvente [25].

Para la formación de complejos a partir de PE débiles es fundamental controlar el pH y la fuerza iónica ya que el comportamiento del polímero depende de estos, por ejemplo, si el pH causa una densidad de carga muy baja, las fuerzas hidrofóbicas y los puentes de hidrógeno son los que prevalecen. Asimismo, ocurre para el parámetro termodinámico que direcciona la formación del CPE: a densidades de carga bajas la entalpía es la que controla el proceso, mientras que a porcentajes altamente cargados del PE, la entropía es la que dirige la complejación debido a la liberación de contraiones que es una de las principales fuerzas impulsoras del proceso [50,51]. La razón por la cual la entropía desempeña un papel de mayor relevancia en la formación de complejos es porque la entalpía del PE cambia muy poco entre estados (sólido, solución o complejo) en comparación con la de la entropía de los contraiones [25].

Derivado de la información reportada en la literatura especializada para la formación de CIPE, se plantean tres posibles pasos en la formación de CPE sencillos, representados en la Figura 1-1. El primero corresponde a la formación primaria y aleatoria del complejo debido a las fuerzas de “Coulomb”; el segundo es el proceso de ordenamiento dentro de los complejos, que involucra nuevos enlaces, relacionados con interacciones intermoleculares de valencia secundaria y por último, están los procesos de agregación entre las diferentes macromoléculas que ya están complejadas asociándose entre ellas, principalmente mediante interacciones hidrofóbicas [6,7,49,50].

**Figura 1-1** Representación esquemática de la formación y agregación de los CPE.



Fuente: Adaptado de Lankalapalli y col [6].

La atracción electrostática que se da entre un PE y un activo con capacidad de ionizar, corresponde a una reacción de equilibrio, que de manera simple se representa en la Ecuación 1-1 [52] y que en la mayoría de los casos corresponde a una dispersión estable.

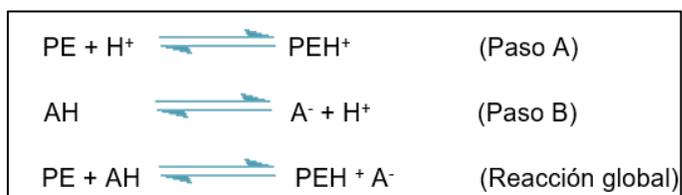


Asociado a este equilibrio existe una constante de afinidad de condensación iónica,  $K_{cc}$ , definida en la Ecuación 1-2 [53].

$$K_{cc} = \frac{[\text{complejo}]}{[\text{activo}][\text{polielectrolito}]} \quad (1-2)$$

De manera más específica, para un PE catiónico y un activo ácido (AH), los equilibrios involucrados se representan en la Figura 1-2 [16], donde PEH<sup>+</sup> hace referencia al PE protonado y PEH<sup>+</sup>A<sup>-</sup> corresponde al par iónico formado y representa el estado en el que se encuentra la mayoría del compuesto ácido, ya que estas reacciones cuentan con una alta proporción de condensación iónica [2,35].

**Figura 1-2** Equilibrios involucrados en la formación de un CPE con PE catiónico.



Los equilibrios descritos en la figura pueden verse afectados por factores como: pH, fuerza iónica del medio de reacción, densidad y distribución de cargas, relación de mezcla de los reactivos, orden de adición, duración de la interacción, exposición de los grupos iónicos en el PE, grado de ionización y flexibilidad de la cadena polimérica [54,55].

En todos los casos el polímero puede ser neutralizado total o parcialmente con el compuesto de carga opuesta. Según la relación estequiométrica utilizada se pueden obtener, o no, entidades químicas electro neutras, hecho que —junto a las propiedades intrínsecas del PE— determinan las características del CPE formado: cuando no todos los grupos ionizables son neutralizados, se obtienen complejos que generalmente son más solubles en agua ya que las cargas en exceso (que no participan en la formación del CPE) interaccionan con el medio acuoso y son responsables de la estabilidad coloidal de la dispersión del CPE [56].

Los CPE se pueden obtener directamente en dispersión o llevándolos al estado sólido. Existen varias metodologías para la obtención de CPE en estado sólido, entre las más utilizadas están:

- ☞ *En solución*: consiste en la dispersión del PE y la molécula de bajo peso molecular en un solvente que permite la interacción y que posteriormente es eliminado por algún método como evaporación, filtración, liofilización o secado por aspersión. [2,24,52,53].
- ☞ *Extrusión*: se realiza mediante la mezcla de los reactivos en estado sólido a temperaturas superiores a la de la transición vítrea del PE; no requiere de solventes y es de alto rendimiento a nivel industrial [57,58].

Independiente al método empleado, es posible obtener complejos que cuentan con propiedades fisicoquímicas diferentes a las de los compuestos de partida, y que reflejan modificaciones en su solubilidad [2], estabilidad [34–37], comportamiento de liberación [12–16,22–24], entre otras. Las propiedades de los CPE obtenidos no solo son influenciadas por la composición química del polímero (peso molecular, estereoquímica, densidad de carga, etc) o por la naturaleza del contraión, sino además por las condiciones experimentales de su obtención, como la concentración del PE antes de la mezcla, la velocidad de agitación, la fuerza iónica de la solución, el orden de adición, entre otras [59].

Existen diferentes técnicas analíticas, tanto para monitorear la formación del complejo en el proceso como para evidenciar que las interacciones previstas se hayan dado. En cuanto a las primeras se destacan: mediciones de turbidez, pH, fuerza iónica, viscosidad y dispersión de la luz, mientras que para las segundas (demostrar que la interacción entre el PE y la molécula con carga opuesta realmente tuvo lugar) se emplean: espectroscopia de IR, RMN, análisis térmico y difracción de rayos X., técnicas que buscan caracterizar las diferencias entre los compuestos puros, la mezcla física de ellos y el producto de la interacción [6,16,34,35,43]

### **Agentes preservantes**

Los preservantes tienen como función mantener la población microbiana —que en ningún caso debe ser patógena— por debajo de los límites permitidos durante el tiempo de vida útil del producto y en algunas formulaciones también durante el tiempo de uso; buscan

asegurar el bienestar del usuario y la seguridad del producto [60,61]. En formulaciones farmacéuticas los preservantes se utilizan principalmente en preparaciones líquidas y semisólidas, pues son un excelente medio de crecimiento para microorganismos como hongos, levaduras y bacterias, incluso preparaciones estériles como soluciones oftálmicas requieren preservantes para mantener su condición aséptica durante vida útil y uso [62]

La selección del preservante debe hacerse teniendo en cuenta múltiples consideraciones, como el sitio de aplicación del producto, la compatibilidad con la formulación y las características propias del preservante. Dentro de los antimicrobianos más comúnmente utilizados en alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos se encuentran los presentados en la Tabla 1-1 [63].

**Tabla 1-1** Clasificación general de los agentes preservantes más utilizados.

<b>Familia</b>	<b>Ejemplos de preservante</b>
<b>Ácidos orgánicos débiles</b>	Ácidos acético, benzoico, sórbico y sus sales
<b>Esteres</b>	Esteres del ácido p-hidroxibenzoico
<b>Alcoholes</b>	Alcohol bencílico, alcohol 2,4 diclorobencílico
<b>Aminas, amidas, piridinas y sales de benzalconio</b>	Triclocarban, hexamidina, clorhexidina, cloruro de benzalconio, cloruro de cetilpiridinio.
<b>Derivados Fenólicos</b>	Fenoxietanol, Triclosán
<b>Donadores formaldehído</b>	Bromonitrodioxano, diazolidinil úrea, imidazonilil úrea.
<b>Derivados de Imidazol</b>	Climbazol, DMDM hidantoína.
<b>Otros</b>	Bromo - 5 - nitro - 1,3 - dioxano (bronidox), metildibromo glutaronitrilo, metilcloroisotiazolinona y metilisotiazolinona

El preservante ideal debe ser efectivo contra un amplio espectro de microorganismos y en un gran rango de pH, asimismo debe ser atóxico, incoloro, inodoro, soluble en agua, no alérgeno, ni irritante, económico y compatible con los demás componentes de la formulación. [64]. Todas estas condiciones son difíciles de encontrar en un mismo compuesto y aún más si se tiene en cuenta que las listas de los preservantes aprobados por los entes regulatorios como la FDA son bastante reducidas y que la posible inclusión de nuevas moléculas, requiere un arduo trabajo de investigación, debido a las múltiples exigencias reglamentarias para su aprobación, pues se trata de sustancias que dependiendo de su comercialización pueden llegar a tener una ingesta crónica en alimentos y medicamentos. Por lo anterior es fundamental hacer una mejor utilización de los preservantes aprobados [65] por lo que, el desarrollo de estrategias para crear

entidades químicas con propiedades del compuesto original modificadas, cobra gran relevancia.

## 1.2 Complejo desarrollado

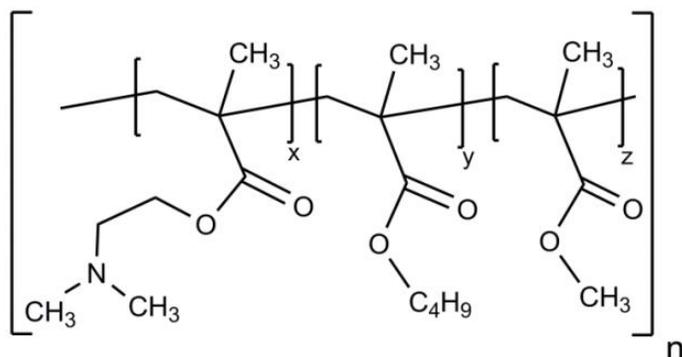
El CPE estudiado en este trabajo corresponde al formado entre un PE y un excipiente “activo”, específicamente un preservante. Se eligió un polímero de carácter catiónico, pues en el campo de la farmacia estos han sido utilizados en menor medida como posibles transportadores de moléculas, debido en parte a la toxicidad atribuida a la interacción con ácidos nucleicos y otras especies cargadas presentes en el organismo [66], sin embargo, existen polímeros como el quitosano y derivados de polimetacrilatos, que cuentan con átomos de nitrógeno susceptibles de protonación que han sido ampliamente utilizados en formulaciones farmacéuticas y han demostrado seguridad de uso [23,67,68]. Lo anterior sumado a la experiencia del grupo de investigación con el manejo del polielectrolito Eudragit® E 100 (EuE) contribuyó a su selección. Como agente preservante se utilizó ácido benzoico (AB), su elección obedeció a la presencia del grupo carboxílico en su estructura química, es decir a su naturaleza ácida, a la simplicidad de su molécula y en especial a las limitantes de uso relacionadas con las propiedades fisicoquímicas como la baja solubilidad de la especie no dissociada; además se eligió por su potencial como molécula modelo de activos antimicóticos.

A continuación, se presentan algunas de las propiedades más importantes de las especies seleccionadas para la formación del CPE de la presente investigación.

### **Eudragit® E100**

Copolímero básico del ácido metacrílico, está conformado por grupos dimetilaminoetil metacrilato (DMAE), n-butil metacrilato y metil metacrilato en una proporción molar de 2:1:1 (Ver Figura 1-3); los monómeros se encuentran distribuidos aleatoriamente a lo largo de la cadena del copolímero. Los grupos amino terciario son susceptibles a protonación dependiente del pH: se cargan positivamente a valores de pH debajo de 5, rango al cual es soluble en agua. Tiene un peso molecular promedio ( $M_w$ ) aproximado de 47000 g/mol determinado por cromatografía de exclusión de tamaño [68,69] y una temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) de 48,5°C [70].

**Figura 1-3** Estructura química del PE Eudragit® E100



Fuente: Tomado de Evonik Industries [69].

El EuE es ampliamente empleado en formulaciones orales y tópicas y generalmente considerado como no tóxico, no irritante y esencialmente seguro en humanos [71,72]. Suele utilizarse para recubrimientos solubles a pH gástrico de tabletas con fines de enmascaramiento de sabor [67] y para la modificación de la solubilidad de algunos fármacos [2,73]. Estudios recientes han demostrado su fuerte interacción con membranas biológicas, debido a la atracción electrostática entre las cargas catiónicas del polímero y los grupos electronegativos de la superficie celular; fenómeno altamente dependiente del pH y de la presencia de iones en el medio acuoso [74–77].

### **Ácido benzoico**

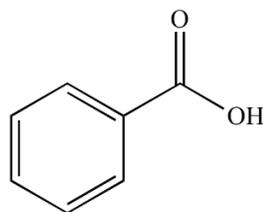
Es uno de los agentes preservantes más antiguos utilizado en la industria farmacéutica, cosmética y de alimentos, incluso fue el primero (como benzoato de sodio) en ser aprobado por la FDA para uso en alimentos. Se describió por primera vez en 1875, sin embargo, su comercialización se difundió hasta 1900, cuando fue sintetizado en grandes cantidades, se encuentra en forma natural en algunos frutos y en productos lácteos. Ventajas como su bajo costo, facilidad para ser incorporado en productos, ausencia de color y una relativa baja toxicidad lo han convertido en uno de los preservantes más ampliamente utilizados en todo el mundo [78].

Es un ácido carboxílico aromático (Figura 1-4), cuenta con un valor de pKa de 4,2 y debido a que la actividad antimicrobiana se debe principalmente a la especie química no disociada, el pH máximo recomendado para utilizarlo en una formulación es de 5,0, sin

embargo se aconseja el uso a valores de pH inferiores a 4,0. Las concentraciones en las que se utiliza oscilan entre 0,05-0,1%, aunque pueden ser mayores cuando se emplea como ingrediente activo en formulaciones para el tratamiento de infecciones fúngicas superficiales [63]. La solubilidad en agua es de 3,4 g/L a 25°C [79,80]. Cuenta con actividad sobre algunas bacterias, pero en términos generales es empleado para inhibir el crecimiento de hongos y levaduras [81]. La ingesta diaria aceptada (ADI) reglamentada por la JECFA (Junta de Expertos del Comité de Aditivos Alimentarios) para el ácido benzoico es de 0-5mg/kg [82].

El ácido benzoico, al igual que los demás ácidos orgánicos débiles, establece un equilibrio entre el estado iónico y la forma no disociada, está última permea libremente a través de la membrana y entra a la célula, donde se encuentra con un pH más alto y por ello se disocia, originando los iones respectivos —benzoato y protón— estos son incapaces de cruzar la membrana hacia el exterior de la célula, de modo que se difunden en el interior hasta alcanzar una gran acumulación. Este proceso ha sido asociado al mecanismo de acción de los ácidos orgánicos débiles y está mediado por disrupción de la membrana, inhibición de reacciones metabólicas esenciales, estrés en los procesos de homeostasis intracelular y acumulación de aniones tóxicos. En levaduras además se ha establecido que los ácidos orgánicos débiles llevan a una repuesta de estrés energéticamente costosa para tratar de restablecer la homeostasis que resulta en la reducción de los “pools” energéticos necesarios para el crecimiento y otras funciones metabólicas esenciales de la célula [78,83].

**Figura 1-4.** Estructura química del Ácido Benzoico.



## 1.2 Estado del arte

En el campo farmacéutico existen muchos estudios realizados con CPE, en su mayoría enfocados al desarrollo de sistemas que modifican la liberación de ingredientes farmacéuticos activos (IFA) mientras que, para excipientes tipo preservante la información

reportada es escasa, por ello para el marco de referencia de la presente investigación se incluyeron estudios con IFA antimicrobianos. En cuanto a estudios de agentes preservantes se contemplaron otros campos de aplicación, como el alimenticio, en donde se ha explotado el diseño de sistemas de liberación modificada para la obtención de envases activos. Adicionalmente se mencionaron investigaciones relacionadas con la evaluación de propiedades fisicoquímicas de CPE y estudios de actividad antimicótica.

En la Tabla 1-2 se presentan algunos de los estudios recopilados por Bautista D [84] y otras investigaciones en los que desarrollan sistemas de diversa naturaleza —diferentes a CPE— para la formulación de IFA antimicrobianos. A partir de los hallazgos de la tabla se evidencia que el uso de liposomas y de estrategias que involucran moléculas poliméricas favorece la actividad de los agentes antimicrobianos, ya que permiten obtener sistemas con propiedades mejoradas a las del IFA solo; asimismo estos estudios permiten visualizar los posibles efectos que se pueden dar mediante otras técnicas como la complejación de activos.

**Tabla 1-2** Investigaciones relacionadas con formulaciones de IFA antimicrobianos y su efecto en la actividad antimicrobiana.

<b>Autores</b>	<b>Año</b>	<b>Sistema Obtenido</b>	<b>Hallazgos</b>
Nacucchi o M y col [85]	1985	Piperacilina en liposomas de fosfatidilcolina y colesterol.	Los sistemas desarrollados, generaron una reducción al 50% de la CMI frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y además demostró actividad en presencia de $\beta$ -lactamasa.
Schumacher y col [86]	1997	Ampicilina cargada en liposomas multilaminares de fosfatidilcolina y colesterol.	La formulación presentó una mayor estabilidad del antibiótico y demostró su capacidad para mantener su actividad frente a <i>Micrococcus luteus</i> .
Fontana y col [87]	1998	Nanopartículas de polietilenoacrilato cargadas con ampicilina.	Las nanopartículas exhibieron igual o mayor actividad antimicrobiana frente a cinco bacterias diferentes.
Yu B. y col [88]	1998	Anfotericina B cargada en micelas de copolímeros de bloque de poli(óxido de etileno) y poli( $\beta$ -benzyl-L-aspartato).	Al evaluar la formulación de las micelas frente a cuatro hongos diferentes se observó que la CMI era de entre 4 y 16 veces menor, que la de dos formulaciones comerciales. Las micelas sin cargar con el antifúngico no presentaron actividad.
Beaulac C y col [89]	1998	Tobramicina en liposomas compuestos por un fosfatidilglicerol y una fosfatidilcolina.	Se observó que los liposomas obtenidos presentaban una mayor actividad frente a las cinco bacterias evaluadas a concentraciones inferiores a la CMI del antibiótico libre.
Kim HJ y col [90]	1999	Vancomicina cargada en liposomas catiónicos obtenidos a partir de colesterol, lípidos	Los liposomas cargados con vancomicina mostraron inhibición del crecimiento bacteriano de biopelículas de <i>Staphylococcus aureus</i> en una proporción superior a la generada por el antibiótico libre.

Autores	Año	Sistema Obtenido	Hallazgos
		catiónicos y una fosfatidilcolina.	
Patel J y col [91]	1999	Ampicilina unida de manera covalente a una matriz polimérica.	El sistema permitió una liberación prolongada del fármaco (6 a 8 días) y demostró inhibición del crecimiento de tres bacterias después de un tiempo de latencia de entre 8 y 16 horas.
Şenel S y col [92]	2000	Películas e hidrogeles de quitosán y clorhexidina.	Se encontró que la actividad antifúngica de la clorhexidina frente a la cepa de <i>C. albicans</i> estudiada (aislado clínico), se incrementaba directamente con la concentración de quitosano utilizado en la formulación.
Furneri P y col [93]	2000	Liposomas a base de dimiristoilfosfatidilcolina y colesterol cargados con ofloxacin.	Al evaluar la actividad de la fluoroquinolona en las formulaciones desarrolladas sobre 5 bacterias (25 cepas en total) se encontró una reducción de los valores de CMI respecto al activo libre, esto se atribuyó a un incremento en la penetración de antibiótico en la célula y a la protección en contra de condiciones desfavorables del medio.
Lavasanifar A y col [94]	2002	Anfotericina B encapsulada en micelas de un copolímero de bloque.	Se obtuvieron las micelas de anfotericina B, estas permitieron la solubilización del fármaco y la reducción de su actividad hemolítica sin afectar la actividad antimicótica.
Carafa M y col [95]	2004	Ampicilina cargada en sistemas vesiculares formados por Tween 20, colesterol y cloruro de cetilpiridinio o dicetilfosfato.	Se desarrollaron tres formulaciones diferentes y se encontró que todas contaban con una mayor actividad, frente a dos bacterias, en comparación con la ampicilina libre. Las vesículas con carga negativa fueron las que arrojaron mejores resultados.
Wei W y col [96]	2005	Nanotubos de carbono funcionalizados de manera covalente con anfotericina B.	Se obtuvieron nanotubos de pared simple y múltiple; ambos presentaron actividad antimicótica mucho más potente que la anfotericina libre frente a los microorganismos: <i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 90118), <i>Cryptococcus neoformans</i> (aislado clínico) y <i>Candida albicans</i> (ATCC 90112).
Drulis y col [97]	2006	Trece formulaciones diferentes de liposomas catiónicos, aniónicos y neutros, cargados con meropenem o gentamicina.	Los liposomas catiónicos mostraron una mejor actividad antibacteriana al realizar la evaluación sobre cuatro microorganismos, dos de ellas reportaron CMI de dos a 4 veces más bajas que la del meropenem libre.
Ruggeri V y col [98]	2006	Sistema formado por discos de poliuretanos sintéticos y los antibióticos cefamandol y rifampicina adsorbidos en su superficie.	Las matrices desarrolladas inhibieron el crecimiento de los microorganismos estudiados, para una de las formulaciones se encontró efecto sobre cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente, hasta por 23 días.
Turos E y col [99]	2007	Nanopartículas de poliacrilato unidas covalentemente a derivados penicilínicos.	Se desarrollaron siete formulaciones diferentes. Al determinar las CMI frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y a una cepa meticil resistente se encontró que las propiedades antibacterianas <i>in vitro</i> eran equipotentes.
Tin S y col [100]	2009	Mezclas físicas entre un antibiótico y un polímero o derivado de quitosano.	Estudiaron las CMI de 10 antibióticos en combinación con cuatro tipos de quitosano (de diferente peso molecular y grado de desacetilación) y con oligosacáridos de quitosano, frente a cuatro cepas de <i>Pseudomonas aureginosa</i> se encontró que los polímeros contaban con actividad antimicrobiana y que el sulfametoxazol

Autores	Año	Sistema Obtenido	Hallazgos
			presentaba un efecto sinérgico en todas las combinaciones.
Chamun deeswari M y col [101]	2010	Nanopartículas de quitosano con oro, unidas por enlace covalente a ampicilina.	Se obtuvieron 8 sistemas nanoparticulados con concentraciones diferentes de antibiótico. La evaluación antibacteriana frente a 3 microorganismos mostró que la CMI se reducía a la mitad. Los autores resaltan el impacto de los resultados en la reducción de los efectos secundarios del IFA estudiado.
Huynnh T.T.N. y col [102]	2010	Películas de poliuretano cargadas con cuatro concentraciones diferentes de diacetato de clorhexidina.	Al estudiar los sistemas de liberación controlada frente a dos bacterias, se encontró que las películas permitían mantener una actividad antimicrobiana, por al menos cinco semanas.
Chakraborty S y col [103]	2010	Nanopartículas de quitosano funcionalizado con ácido fólico, y conjugadas con vancomicina.	La vancomicina nanoconjugada redujo la CMI y CMB frente a <i>S. aureus</i> resistente al antibiótico. Se encontró además que era indispensable la funcionalización con ácido fólico, para contar con el efecto mencionado.
Arenas T y col [104]	2012	Mezcla de ampicilina y un compuesto sintético tipo chalcona en presencia de una matriz polimérica hidrosoluble.	Se apreció un incremento significativo de la actividad antibiótica de la ampicilina, evidenciado en la reducción de la CMI a la mitad de la referente comercial, frente a un aislamiento clínico de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a penicilinas.
Cui X y col [105]	2013	Compósitos de una mezcla homogénea de vidrio bioactivo de borato, quitosano y sulfato de gentamicina.	En la evaluación <i>in-vitro</i> de la actividad cualitativa de los compósitos frente a <i>S. aureus</i> se encontró que la formulación sin antibiótico también contaba con efecto antibacteriano, aunque en una menor proporción.

Para investigaciones específicas de sistemas tipo CPE con IFA antimicrobianos, se elaboró la Tabla 1-3 con algunas de los estudios más relevantes al respecto.

**Tabla 1-3** Estado del arte de CPE con fármacos con actividad antimicrobiana.

Autores	Año	Sistema Obtenido	Hallazgos
Krone V y col [106]	1994	Patente de CIPE, en forma microparticulada para diversos agentes activos.	La composición de los complejos con al menos uno de los activos (péptidos, proteínas, enzimas, inhibidores de enzimas, antígenos, agentes citostáticos, antiinflamatorios, antibióticos o vacunas) asegura una administración de estos, con un efecto benéfico en su biodistribución, biodisponibilidad y absorción.
De la Torre y col [13]	2003	CIPE del tipo quitosano/poliácido acrílico – amoxicilina.	Estudiaron varios complejos y sus mecanismos de liberación. Encontraron que las interacciones entre el fármaco y los polímeros retardaban el proceso de liberación y que era posible utilizarlos para la liberación del activo a nivel gástrico.
Nurkeeva y col [107]	2004	Estreptomina sulfato y un polímero derivado del ácido acrílico.	Caracterizaron el complejo y demostraron que la actividad antibacteriana del fármaco era comparable a la del complejo formado.

<b>Autores</b>	<b>Año</b>	<b>Sistema Obtenido</b>	<b>Hallazgos</b>
Pandey R y col [108]	2004	Microesferas de CIPE quitosano-alginato cargadas con rifampicina, isoniazida y pirazinamida.	La formulación permitió aumentar el tiempo de vida media de los activos y potenciar su biodisponibilidad. El estudio <i>in vivo</i> mostró un efecto en 10 días, equivalente al generado en seis semanas por el tratamiento convencional.
Yu S.H. y col [109]	2004	Membranas de CIPE quitosano – alginato, con sulfadiazina de plata incorporada.	Desarrollaron una formulación del CIPE con características físicas deseadas para utilizar sobre heridas, al incorporar el principio activo y evaluar sobre <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. aureus</i> demostraron capacidad para evitar la proliferación de bacterias para la vía de administración diseñada.
Bigucci F. y col [110]	2008	CIPE quitosano – pectina formulado con vancomicina.	Optimizaron el proceso de obtención del complejo interpolielectrolito para asegurar la liberación colónica de vancomicina.
Gomez M. y col [111]	2008	CIPE quitosano – carboximetilcelulosa, formulado con claritromicina.	Evaluaron la influencia del peso molecular de quitosano y la proporción entre este y la carboximetilcelulosa, en la liberación gástrica de claritromicina. Encontraron que el pH del medio, las características de erosión de los polímeros, el $pK_a$ del fármaco y la interacción entre los dos PE son los principales factores que gobiernan el proceso de liberación.
Esteban S, y col [35]	2009	CPE entre carbómero y azitromicina.	Investigaron la interacción entre el CPE, evaluaron sus propiedades de liberación y estabilidad, encontrando que la estabilidad de la azitromicina se incrementaba por la formación del complejo, asimismo se concluyó que su actividad antimicrobiana se favorecía indirectamente.
Seleem M y col [112]	2009	Copolímeros de bloque aniónicos complejados con los activos estreptomina y doxiciclina.	El complejo obtenido fue evaluado <i>in vivo</i> con ratones infectados con <i>Brucella melitensis</i> , los resultados mostraron reducción en el número de bacterias viables en hígado y bazo, comparado con los fármacos libres.
Zan X y col [113]	2010	PE multicapa con iones de plata.	Obtuvieron películas de PE multicapa que contenían iones de plata y encontraron que su actividad antibacteriana se mantenía por un tiempo prolongado. Sugieren utilizar la misma técnica para incorporar otros agentes antimicrobianos.
Moskowitz J y col [114]	2010	CPE multicapa con gentamicina.	Desarrollaron el complejo para recubrir implantes óseos y eliminar infecciones asociadas a la cirugía mediante la liberación controlada del antibiótico. Recomiendan emplear la misma estrategia con otros tipos de IFA y otros fines terapéuticos (manejo del dolor, osteomielitis, etc).
Marinelic h D.M y col [115]	2010	CIPE quitosano – carbómero y econazol.	Estudiaron una película del CIPE para la liberación de econazol en el tratamiento de candidiasis cutánea; encontraron buenos resultados para la actividad <i>in vitro</i> , que sugieren el desarrollo de una forma farmacéutica de solo una dosis diaria.
Ranjan A y col [116]	2010	Complejos formados entre gentamicina y copolímeros aniónicos.	La formulación desarrollada permitió obtener un sistema de liberación controlada, que arrojó en el estudio <i>in vivo</i> de salmonelosis murina, una reducción en el número de bacterias viables en hígado y bazo.

Autores	Año	Sistema Obtenido	Hallazgos
Olivera M y col [117]	2011	Dos tipos de CPE: 1. Ácido algínico e isoniazida 2. Carboximetilcelulosa y rifampicina.	Desarrollaron una formulación con los dos complejos para liberar rifampicina en estómago e isoniazida en intestino. La formulación garantizó una mayor estabilidad de rifampicina en medio ácido e indirectamente el aumento de su efectividad y reducción de efectos adversos.
Arora S. y col [118]	2011	Amoxicilina cargada en CIPE quitosano – alginato de sodio.	Mediante el diseño estadístico experimental “Box-Behnken”, optimizaron la formulación del complejo y obtuvieron un sistema nanoparticulado con movilidad adecuada y penetración de mucosa gástrica aceptable para la erradicación de <i>H. pylori</i> .
Romero VL, y col [119]	2012	Eudragit® E100 y ofloxacina.	Evaluaron la interacción del CPE y encontraron que la actividad bactericida del antibiótico sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> se potenciaba por la formación del complejo, debido al efecto del PE catiónico sobre la membrana. Se consideró la obtención del complejo como una herramienta útil para ampliar el espectro de antibióticos cuyo uso clínico se ha limitado por la impermeabilidad de la membrana bacteriana.
Cheow W.S. y col [120]	2012	CPE de los antibióticos ofloxacina y levofloxacina con el PE sulfato de dextrano.	Desarrollaron los complejos nanoparticulados, como alternativa para la liberación de antibióticos en vía de administración pulmonar. Encontraron que la formulación permitía obtener sistemas con altos porcentajes de carga de los principios activos. Al evaluar su actividad frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> se demostró que las CMI se mantenían iguales respecto a los valores del antibiótico libre.
Barajas S [121]	2014	Asociación polimérica entre el polímero PAM-18 Na (sal sódica de poli(ácido maléico-alt-octadeceno)) y ampicilina trihidratada.	Evaluaron el efecto de la asociación en tres cepas de <i>S. aureus</i> , se encontró que para las dos cepas resistentes se reducía la CMI del antibiótico en aproximadamente un 75 %, además se observó que la matriz polimérica no poseía efecto antimicrobiano.
Ureña N [122]	2015	Recubrimiento de lentes de contacto con un CPE de capa por capa entre gentamicina, la enzima acilasa y el PE polietilimina cargado positivamente.	Los recubrimientos desarrollados demostraron inhibir la formación de biopelícula en los lentes de contacto, específicamente frente a la cepa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145.
Bajpai S.K. y col [123]	2016	Películas de CIPE: quitosano y un polímero derivado de acrilamida y del ácido itacónico, cargada con nanopartículas de plata.	La evaluación de la actividad antimicrobiana frente a <i>Escherichia coli</i> de las películas desarrolladas mostró un notable desempeño en comparación con las películas sin cargar.
Angulo D.C. [124]	2016	Complejo de asociación entre ampicilina y el polímero sal sódica del poli(ácido maleico-alt-isobutileno) PAM-4Na.	Al determinar las CMI del complejo frente a tres cepas de <i>S. aureus</i> se encontró que los valores se mantenían iguales a los del tratamiento ampicilina, concluyendo que el polímero no tiene la capacidad de potenciar el efecto antimicrobiano de la ampicilina ya que no genera

Autores	Año	Sistema Obtenido	Hallazgos
			pseudofases hidrófobas para retener terceros componentes.

Para los estudios presentados en la Tabla 1-3 se observa que la investigación de CPE con IFA antimicrobianos es bastante amplia y que abarca tanto CIPE como complejos sencillos, ambos han permitido la obtención de entidades químicas con propiedades diferentes a las del agente antimicrobiano sin complejar, que se reflejan en características de mayor ventaja para el tratamiento de infecciones. Esto es logrado mediante diferentes flancos: sistemas que se adecúan a la vía de administración como películas, incremento de estabilidad del IFA, adherencia al tratamiento por disminución en la frecuencia de administración y modificación de la liberación de los activos para su direccionamiento sitio-específica. Todas en general permiten la optimización de los IFA y mantienen o aumentan la actividad antimicrobiana.

En cuanto a investigaciones desarrolladas para CPE de agentes preservantes, se encontró un campo específico de acción en los envases activos de la industria alimenticia. El concepto tradicional de envase involucra preservar la calidad del producto mediante una mínima interacción, sin embargo, estos materiales rompen con este modelo pues contienen activos antimicrobianos que prolongan el tiempo de vida útil del producto disminuyendo la cantidad de preservante que tiene que adicionar al alimento, incluso han demostrado utilidad en la inhibición de las reacciones de degradación que ocurren principalmente en la superficie de los alimentos. Las publicaciones relacionadas en la Tabla 1-4 corresponden a este tipo de envases e incluyen únicamente estudios que por la naturaleza química de los componentes corresponden a CPE, sin embargo existen múltiples investigaciones de películas comestibles conformadas por polímeros biodegradables, que cuentan con actividad antimicrobiana, pero no presentan ninguna interacción ácido-base en su estructura [125–129].

**Tabla 1-4:** Estado del arte de CPE con preservantes en alimentos.

Autores	Año	Sistema Obtenido	Hallazgos
Chen Y. y col [130]	1996	Quitosano -metilcelulosa y sorbato de potasio o benzoato de sodio.	Diseñaron los envases activos y evaluaron la actividad antimicrobiana, encontrando inhibición en el crecimiento de los microorganismos estudiados y una adecuada liberación de los preservantes. Adicionalmente demostraron la interacción iónica entre el carboxilo del conservante y el grupo amino del quitosano.

<b>Autores</b>	<b>Año</b>	<b>Sistema Obtenido</b>	<b>Hallazgos</b>
Ouattara B. y col. [131]	2000	Ácidos acético y propiónico en películas de quitosano.	Evaluaron la difusión de los ácidos desde películas de envases activos hechas con quitosano, y determinaron que tal comportamiento se desviaba del modelo de difusión de Fick, además estudiaron el efecto de la temperatura y encontraron que se acomodaba al modelo de Arrhenius.
Cagri A y col [132]	2001	Aislado de proteínas de suero de leche y ácido sórbico o p-aminobenzoico.	Al incorporar los ácidos de interés a diferentes concentraciones en las películas comestibles preparadas con el aislado proteínico, se observó la inhibición del crecimiento de las cepas de las tres bacterias estudiadas a pH 5,2. Adicionalmente se evaluaron propiedades mecánicas de las películas y se probó su utilidad para preservar alimentos.
Janes M. E y col [133]	2002	Nisina y/o propanoato de calcio y la proteína de maíz zein.	Obtuvieron películas comestibles de diferente composición en dos medios: etanol y propilenglicol; al realizar la evaluación antimicrobiana frente a <i>L. monocytogenes</i> se observó su potencial uso para la preservación de productos tipo "carne refrigeradas listas para comer".
Dawson J. L. y col [134]	2002	Nisina y/o ácido láurico y aislado de proteína de soya.	Mediante prensado en caliente se obtuvieron películas de cada uno de los activos y de su combinación. Al evaluar su efecto frente a un inóculo de <i>L. monocytogenes</i> y a un embutido de pavo contaminado con el mismo microorganismo se encontró un descenso significativo del conteo de bacterias hasta por 21 días.
Pranoto Y. y col [135]	2005	Nisina, sorbato de potasio y aceite de ajo y quitosano.	Películas comestibles de cada uno de los activos fueron obtenidas y evaluadas frente a cinco bacterias patógenas comúnmente encontradas en productos cárnicos, adicionalmente se realizó análisis FTIR de las películas y de sus propiedades físicas. Los resultados mostraron inhibición del crecimiento de las bacterias para todas las formulaciones. La interacción sorbato de potasio - quitosano fue confirmada por FTIR y asociada a la modificación de algunas de las propiedades físicas de las películas.
Vascone z M. y col [136]	2009	Mezclas de almidón de tapioca y quitosano y/o sorbato de potasio.	Crearon películas comestibles, para cubrir alimentos con actividad antimicrobiana, a partir de las mezclas mencionadas, para proteger filetes de salmón. Determinaron que el almidón y el sorbato de potasio disminuían la actividad del quitosano.
Salleh E y col [137]	2009	Almidón, quitosano y ácido láurico.	Las películas diseñadas con los dos polímeros y ácido láurico fueron caracterizadas por FTIR y difracción de rayos X. Luego se evaluó transparencia, transmisión de oxígeno y tasa de transmisión de vapor de agua; los resultados demostraron que las películas obtenidas contaban con propiedades de barrera ideales para su uso como películas antimicrobianas.
Guillard y col. [138]	2009	Ácido sórbico y películas de agar, gluten de trigo y cera de abejas.	Diseñaron un modelo matemático que describe la liberación del ácido sórbico a partir de cada una de las películas utilizadas como recubrimiento interno en

Autores	Año	Sistema Obtenido	Hallazgos
			productos alimenticios que son capaces de controlar la liberación del preservante.

En las investigaciones de la Tabla 1-4 se observa que los PE de elección son de origen natural, esto obedece a que los sistemas son desarrollados para que sean comestibles; también se observa que todos permitieron el control del crecimiento microbiano para el que fueron diseñados. De manera general, estos estudios (relacionados con el diseño de envases activos) incluyen algunos de los siguientes aspectos: proceso de obtención, ensayo de liberación (o modelamiento) y estudio microbiológico. Sin embargo, son muy pocos los que estudian el tipo de interacción que ocurre entre el agente preservante y el polímero involucrado ya que su principal propósito es corroborar su funcionalidad. Este hecho dificulta la consolidación del nuevo conocimiento adquirido en CPE de agentes preservantes y corrobora la necesidad de reportar información desde el punto de vista fisicoquímico de este tipo de sistemas.

Respecto a las investigaciones realizadas en el campo farmacéutico y cosmético para CPE con preservantes, se hallaron mucho menos reportes; en la Tabla 1-5 se relacionan algunos de los existentes.

**Tabla 1-5.** Estado del arte de CPE con preservantes en farmacia.

Autores	Año	Sistema Obtenido	Hallazgos
Coquelet y col [38]	1996	Polímero del ácido acrílico con cloruro de benzalconio.	Observaron la disminución del efecto irritante del antimicrobiano en las células de la superficie ocular sin alterar su actividad preservante en formulaciones oftálmicas.
Desai S y col [139]	1997	Preservante tipo amonio cuaternario polimérico y ácido bórico.	La patente reivindica un sistema tipo CPE como preservante para soluciones oftálmicas con principios activos ácidos. El complejo asegura formulaciones estables que cumplen con los requisitos mínimos de efectividad de preservantes exigidos por la USP y la Farmacopea Europea.
Ketelson y col [39]	2009	Interacción entre cloruro de benzalconio y un PE aniónico.	El Laboratorio Alcon Research Ltda, patentó a nivel internacional, un método en el que se obtuvo un complejo, que preserva soluciones de lentes de contacto. El sistema consta de polielectrolitos aniónicos que se unen de manera reversible a preservantes de carácter catiónico, esta unión permite reducir los efectos no deseados del biocida y asegurar su actividad.

Aunque la aplicación de los CPE como agentes preservantes, para la industria farmacéutica ha sido desarrollada escasamente, el par de estudios mencionados en la

Tabla 1-5 muestran el potencial de este tipo de investigación que permiten, por ejemplo, a partir de un compuesto tan conocido como el cloruro de benzalconio realizar una adecuación y obtener una nueva materia prima con propiedades mejoradas, para este caso relacionadas con menor efecto irritante. Lo anterior refuerza la teoría de que este tipo de investigación sirve como punto de partida para el desarrollo de nuevas materias primas con características ventajosas frente a sus precursores.

Los estudios relacionados con la caracterización y evaluación de propiedades fisicoquímicas de CPE son bastante numerosos, sin embargo, la mayoría de ellos hacen énfasis únicamente en el comportamiento de liberación, pues se trata de sistemas desarrollados precisamente para modificarla, asimismo, existe una mayor documentación de los complejos que son obtenidos a partir de PE de carácter aniónicos. Para los fines que se persiguen en el presente estudio, basta con mencionar las investigaciones incluidas en la Tabla 1-6 las cuales plantean un panorama claro de las técnicas de caracterización y las propiedades fisicoquímicas que usualmente son evaluadas.

**Tabla 1-6** Estudios de caracterización y evaluación de propiedades fisicoquímicas de CPE.

Autores	Año	CPE	Hallazgos
Jimenez-Kairuz y col [140]	2003	Carbómero y metoclopramida.	Realizaron un estudio de las propiedades de equilibrio y de la cinética de liberación del activo, para ello determinaron coeficiente de reparto, potencial electrocinético y perfil de liberación. Los resultados mostraron que el sistema se comportaba como un reservorio del fármaco que se caracterizaba por contener una alta concentración de metoclopramida en forma del par iónico, además se evidenció que el complejo permitía controlar la liberación del activo y que su cinética dependía de la naturaleza y pH del medio.
Quintero s y col [2]	2008	EuE y siete activos aniónicos.	Estudiaron la interacción entre el PE y los siete activos, entre los que figura el ácido benzoico. Los complejos obtenidos en el estado sólido fueron caracterizados por espectroscopia infrarroja y difracción de rayos X. Posterior a ello se realizó la evaluación de su solubilidad cualitativa y para algunos de los complejos se determinó además constante de afinidad/distribución de especies y comportamiento de liberación, mediante el ensayo de celdas de Franz. Los autores concluyen sobre la utilidad de este tipo de sistemas como reservorio de fármacos de carácter aniónico.
Ardusso y col [141]	2009	Complejos entre los PE: carbómero, EuL y EuS; y los IFA: lidocaína, atenolol y metoclopramida.	Evaluaron las propiedades de liberación y de equilibrio de los complejos, para ello determinaron coeficiente de reparto y perfil de liberación. Los resultados indicaron que las constantes de afinidad para los complejos de lidocaína con el carbómero disminuían a medida que aumentaba el porcentaje de condensación del contraión, mientras que para los otros PE permanecían constantes, adicionalmente se estableció que la liberación de los fármacos fue

Autores	Año	CPE	y	Hallazgos
				modulada por la formación del complejo y que dependía de la disociación del par iónico.
Baena Y y col [142]	2011	EuE diclofenaco.	y	Investigaron la formación de CPE entre el PE y el IFA, para ello prepararon sistemas de diferente composición que fueron caracterizados por IR y DRX, luego realizaron la evaluación de la solubilidad aparente de todos los complejos y encontraron que producto de la interacción iónica era posible obtener entidades químicas con mayor solubilidad que el diclofenaco.
Zoppi y col [143]	2012	Carbómero pilocarpina.	y	Evaluaron la interacción entre el activo y el PE, para ello se obtuvo un complejo tanto en estado sólido como en dispersión, que fue caracterizado mediante las técnicas de RMN, IR, DRX, DSC, potencial Z y SEM, adicionalmente se realizó un estudio de estabilidad que demostró que la formación del complejo protegía al fármaco de la degradación.
Guzmán M.L. y col [71]	2012	EuE dexametasona fosfato molécula modelo.	y	Complejos de diferente composición en cuanto al porcentaje de neutralización (de activo o de ácido clorhídrico) fueron obtenidos por evaporación del solvente. Para su caracterización se utilizó FTIR, DSC, TGA, <sup>1</sup> H NMR y liberación por celdas de Franz. Se encontró que la interacción del polímero con el grupo fosfato era bastante fuerte comparada con los activos que cuentan solo con el grupo carboxílico, para ello se hicieron algunos ensayos con complejos equivalentes de ácido benzoico, que demostró las particularidades de la interacción electrostática EuE – fosfato.
Quintero s A. D. y col [72]	2014	EuE flurbiprofeno.	y	Se desarrolló una formulación oftálmica a partir de un complejo obtenido entre los dos componentes mediante evaporación del solvente. Entre otras pruebas, se realizó la caracterización por coeficiente de partición, potencial electrocinético, tamaño de partícula, determinación de pH y liberación <i>in vitro</i> . Los resultados demuestran un uso prometedor para el complejo, por el aumento de la solubilidad aparente del activo y una mayor velocidad de liberación frente a una preparación comercial y a la solución del activo en agua.
Ramirez- Rigo M.V y col [144]	2014	EuE y enalapril maleato.	y	Empleando la técnica de evaporación de solvente, se obtuvieron tres complejos entre el polímero y el activo, estos fueron caracterizados en estado sólido por FTIR, DSC, DRX y sorción del vapor de agua en cámaras de humedad. En dispersión se evaluó pH, potencial electrocinético y liberación, entre otras pruebas biofarmacéuticas. Los autores encontraron que los sistemas obtenidos correspondían a nuevas entidades químicas con propiedades mejoradas del fármaco estudiado.
Salaman ca H. C. y col [145]	2017	EuE y ampicilina trihidrato molécula modelo.	y	Se obtuvo el ionómero (EuCl <sup>-</sup> ) del polímero mediante reacción con HCl, este fue caracterizado por titulación potenciométrica, FTIR y DSC, además se evaluó el efecto del pH, tiempo, concentración del polímero y carga del activo en el diámetro hidrodinámico y el potencial Z. Los resultados mostraron dos grupos poblacionales de nanopartículas, sin embargo la formación del complejo con ampicilina demostró reducir ligeramente la degradación hidrolítica del fármaco.

Los anteriores estudios, ejemplifican de manera sencilla las pruebas que suelen realizarse a este tipo de complejos y además permiten contar con un marco de referencia para el desarrollo e investigación en CPE. Dentro de los análisis más comunes se encontraron:

FTIR, DSC, DRX, determinación de pH, solubilidad, constante de afinidad, potencial Z y liberación; todos en conjunto permiten conocer la interacción iónica del complejo y las propiedades que se derivan de ésta, asimismo interpretar las aplicaciones que se le han dado tanto en la industria farmacéutica, como en la cosmética y alimenticia.

Finalmente, se presentan algunos estudios relacionados con la evaluación de actividad antimicótica. Para ello en la Tabla 1-7 se incluyeron investigaciones relacionadas directamente con el preservante seleccionado en este estudio, ácido benzoico (AB) y otras desarrolladas para los hongos elegidos en la evaluación de la actividad de los CPE obtenidos (*Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis* y *Penicillium rubens*).

**Tabla 1-7.** Estudios para la evaluación de actividad antimicótica.

<b>Autores</b>	<b>Año</b>	<b>Antimicótico</b>	<b>Hallazgos</b>
Adarme V y col [146]	2008	AB y ácido sórbico.	Estudiaron el desempeño de los preservantes como agentes de control de crecimiento de levaduras en un proceso de fermentación de ácido cítrico. La evaluación de la actividad se hizo sobre las levaduras <i>Cándida glabrata</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; como métodos de evaluación de actividad se emplearon difusión en agar y dilución en caldo. Se encontraron resultados consistentes únicamente con el segundo método y se determinó que el ácido sórbico contaba con mejores propiedades antimicóticas que, sumadas a otros parámetros como toxicidad y efecto sobre el producto, favorecieron su selección para el control de crecimiento de levaduras en el proceso.
Pundir RK y col [81]	2010	AB, acetato de sodio, ácido cítrico, ácido acético y ácido láctico.	Investigaron la actividad antifúngica de algunos agentes preservantes frente a ocho hongos típicos en la contaminación de productos de panadería, como método utilizaron dilución en agar. Para el AB se encontró inhibición del crecimiento micelial del 75 al 100% en todos los hongos evaluados, correspondiente al segundo mejor agente antimicótico evaluado.
Levinskai té L [147]	2012	AB, lactato de sodio, sorbato de potasio. Topax DD, Suma Bac D10, Biowash y F210 Hygisept.	Evaluó la susceptibilidad de tres hongos filamentosos a la acción de algunos preservantes y desinfectantes, para ello realizó ensayos de germinación de esporas y crecimiento micelial. Los resultados demostraron que dentro de los agentes preservantes el AB y el sorbato de potasio exhibieron los mejores porcentajes de inhibición y además que su acción fue más potente sobre el crecimiento micelial que sobre la germinación de esporas.
Wen L y col [148]	2011	Extractos etanólicos de cuatro plantas peruanas.	Evaluaron la actividad antimicótica de los extractos sobre varios hongos, entre los que se encontraba <i>Candida albicans</i> . Como métodos de evaluación se utilizaron difusión en agar y microdilución, los resultados mostraron buena actividad antifúngica <i>in vitro</i> de uno de los extractos, que permitió

Autores	Año	Antimicótico	Hallazgos
			además establecer un marco de referencia que avala el uso de estas plantas como medicinas tradicionales para infecciones micóticas de la piel.
Duque N y col [149]	2008	Extractos crudos de tres plantas pertenecientes a la familia <i>Rubiaceae</i> .	Investigaron la actividad antimicótica de los extractos, sobre el hongo <i>Aspergillus niger</i> y la levadura <i>Candida albicans</i> , para ello utilizaron los métodos de difusión en agar microdilución y macrodilución, determinando como mejor técnica esta última, en la que se demostró el efecto de los tres extractos sobre la levadura, sin embargo, no se observó ningún tipo de actividad sobre el hongo filamentoso.
Huamaní M y col [150]	2005	Diez plantas medicinales del Perú.	Determinaron la actividad antifúngica contra <i>Candida albicans</i> y <i>Aspergillus niger</i> de las diez plantas, utilizando como métodos difusión y dilución en agar y como control positivo nistatina. Los resultados mostraron actividad de los extractos provenientes de la mitad de las plantas sobre la levadura, mientras que para el hongo filamentoso no se observó ninguna actividad antimicótica para ninguno de los extractos.
Tequida- Meneses M y col [151]	2002	Extractos alcohólicos de catorce plantas silvestres.	Estudiaron la actividad antimicótica de los extractos sobre la inhibición de seis hongos filamentosos que incluían al <i>Aspergillus niger</i> y al <i>Penicillium chrysogenum</i> . El método utilizado fue dilución en agar. Los autores reportan mucha variación en el grado de inhibición de crecimiento de los hongos en el estudio: mientras algunas plantas mostraron actividad sobre todos los hongos, otras apenas ejercieron una mínima inhibición; el <i>Aspergillus niger</i> se caracterizó por ser uno de los más resistentes.
Viuda- Martos M y col [152]	2007	Aceites esenciales de limón, mandarina, toronja y naranja.	Investigaron el efecto de los aceites esenciales en el crecimiento de cuatro hongos filamentosos comúnmente asociados a la contaminación de alimentos, en los que se encontraban el <i>Aspergillus niger</i> y el <i>Penicillium chrysogenum</i> . Para ello se utilizó el método de dilución en agar y se encontró que todos los aceites esenciales mostraron actividad antimicótica; el de naranja fue el más activo sobre el <i>Aspergillus</i> mientras que el de toronja lo fue para el <i>Penicillium</i> . Finalmente se recomienda su uso como aditivo en la industria alimenticia .
Raju H y col [153]	2010	Ocho derivados del 1-(4-metoxibenzil)-3-ciclopropil-1 H- pirazol-5-amino.	Sintetizaron los derivados y les evaluaron su actividad antimicrobiana frente a tres bacterias Gram positivas, tres Gram negativas y cinco hongos filamentosos dentro de los que se encontraba el <i>Penicillium chrysogenum</i> . Los métodos evaluados en los hongos incluyeron la difusión en agar y macrodilución; estos resultados permitieron hacer la selección de tres de las moléculas más promisorias como nuevos agentes antimicrobianos

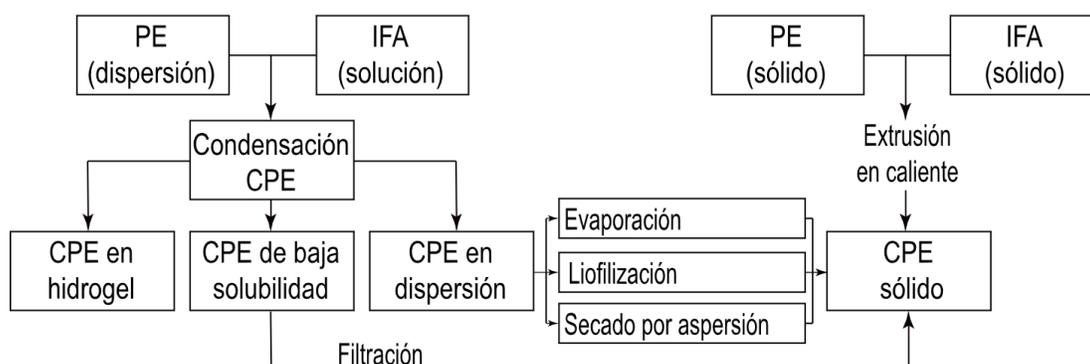
En la Tabla 1-7 no se encuentran estudios con cepas de *Aspergillus brasiliensis* o *Penicillium rubens*; en su lugar se mencionan algunos para *Aspergillus niger* y *Penicillium chrysogenum*; esto fue debido a que al iniciar la presente investigación, el laboratorio en que se desarrolló la metodología había adquirido cepas de los dos últimos hongos, sin

embargo, en los últimos años se realizó la reclasificación de estas y actualmente son reconocidas como *Aspergillus brasiliensis* ATCC®16404 y *Penicillium rubens* ATCC® 9179. A pesar de esto, las condiciones de análisis recomendadas no se invalidan porque corresponden a las mismas. Con base en los estudios mencionados se diseñó la metodología para la determinación de la actividad antimicótica de los complejos obtenidos, las condiciones seleccionadas se establecieron a partir de aquellas referenciadas en la Tabla 1-7 (Ver Capítulo 4).

## 2. Obtención de los complejos

Las investigaciones realizadas en CPE en el campo farmacéutico para sistemas entre un PE y una molécula de bajo peso molecular, comúnmente el IFA, han sido desarrolladas mediante diferentes metodologías de obtención. En la Figura 2-1 se representan las más utilizadas; en ésta se observa que básicamente existen dos procedimientos: uno en el que los dos componentes se encuentran en dispersión y el otro, extrusión por fusión, en el que los materiales de partida se encuentran en estado sólido.

**Figura 2-1** Procedimientos utilizados para obtención de complejos PE-IFA.



Fuente: Adaptado de Olivera M y col [154].

El medio utilizado para el primer procedimiento puede ser agua o un solvente como etanol o acetona. Dependiendo de la naturaleza química y de la solubilidad del CPE formado, se pueden presentar los tres escenarios incluidos en la figura: formación de un hidrogel [43,140], de un precipitado [52] o de la dispersión estable de complejo [155]. Esta última puede ser utilizada directamente como una formulación del IFA o ser sometida a algún método que elimine el solvente (evaporación, liofilización, secado por aspersion) para obtener el CPE en estado sólido.

La metodología de obtención elegida para la presente investigación fue la de los dos componentes en dispersión y posterior eliminación del solvente orgánico por evaporación.

Esta metodología fue seleccionada porque ya existían reportes de su uso con resultados satisfactorios para la formación de complejos entre EuE y AB [2,71,156], es una de las más sencillas de implementar, ya que no requiere de tecnología especial como lo exige el proceso de extrusión por fusión o los procesos de secado mediante aspersion o liofilización; metodologías que al momento de escalar la obtención de los CPE a nivel industrial son una buena opción, pero para los fines del presente estudio son innecesarios. Para la metodología seleccionada no existen reportes en los que se establezcan cuáles son los pasos críticos para la generación de la interacción entre moléculas, por ello se decidió evaluar algunas variables relacionadas al proceso de obtención con el propósito de reconocer aquellas que son de mayor relevancia.

La interacción entre el PE y el IFA suele generar altas tasas de condensación contraiónica y dispersiones coloidales estables, sin embargo, en algunos casos, la adición complementaria de contraiones inorgánicos contribuye a un grado de dispersabilidad mayor y a una mejor compatibilidad en agua [25,154]. Para PE catiónicos es común la inclusión de contraiones cloruro (Cl<sup>-</sup>) en la obtención de CPE, por ello para establecer la composición de los complejos de esta investigación entre EuE y AB se tuvo en cuenta la neutralización adicional de los grupos protonables del polímero —grupos DMAE (dimetilaminoetil metacrilato)— con ácido clorhídrico.

## **2.1 Metodología**

### **2.1.1 Materiales**

Ácido benzoico (99 % de pureza) fue obtenido de Sigma-Aldrich, Eudragit® E100 grado farmacéutico, marca Evonik Industries adquirido a Almapal-Bogotá-Colombia, etanol al 96% (grado analítico, Merck); ácido clorhídrico, ácido acético glacial, ácido perclórico 0,1N y ciclohexano (grado reactivo, Merck). En todos los experimentos se utilizó agua desionizada.

## 2.1.2 Métodos

### *i. Selección de las condiciones de obtención*

Como método de obtención se seleccionó la técnica de evaporación del solvente, para ello se utilizó el polímero y el ácido benzoico en estado sólido y como especies no disociadas. Se disolvió un peso preestablecido de EuE en un volumen específico del solvente orgánico volátil, haciendo uso de un mortero. Posteriormente se adicionó la cantidad de ácido benzoico requerida para neutralizar el porcentaje del polímero deseado, calculado con el valor de los equivalentes de grupos amino por gramo del PE. Una vez en solución los dos componentes, se dejaron interactuar por un tiempo establecido; hecho esto, se agitó de manera manual con el pistilo, hasta que la mayoría del solvente se volatilizara. Se secó a 20°C en estufa al vacío (Fisher Isotemp Vacuum Oven, 15 mmHg) o a 25°C en estufa de secado (Mettler) hasta peso constante y el sólido obtenido se trituró hasta tener un polvo fino, que se separó por tamices, seleccionando aquel que quedó entre mallas 40/80, (177-420  $\mu\text{m}$ ). Para los complejos con neutralización adicional con ácido inorgánico, se realizó la incorporación de un volumen de ácido clorhídrico de concentración conocida posterior a la interacción de EuE con AB, en una cantidad definida de acuerdo al grado de complejación deseado.

Para determinar el número de grupos amino ionizables por gramo de EuE se siguió el procedimiento reportado por la Farmacopea Europea [157] que consiste en una titulación con ácido perclórico 0.1 N, utilizando ácido acético glacial como solvente. Los ensayos se realizaron por triplicado y el resultado se expresó como el promedio y su coeficiente de variación.

Teniendo en cuenta los objetivos planteados, se definieron diez (10) composiciones diferentes para los complejos a obtener, estas se detallan en la Tabla 2-1, cuya nomenclatura hace referencia a los componentes y sus proporciones. **Eu** corresponde al Eudragit® E 100, **B** a los iones benzoato provenientes del ácido benzoico y **Cl** a los iones cloruro adicionados por el ácido clorhídrico. Los números en subíndice revelan el porcentaje del número de grupos DMAE del polielectrolito que se encuentran neutralizados con el respectivo contraión. En este sentido la nomenclatura “EuB<sub>50</sub>Cl<sub>25</sub>” denota que se trata de un complejo de EuE cuyos grupos amino ionizables están neutralizados en un 50%

con ácido benzoico y un 25% con ácido clorhídrico. En la tabla se detalla la composición para cada complejo.

**Tabla 2-1** Composición de los complejos obtenidos.

Complejo	% de grupos DMAE neutralizados con	
	AB	HCl
EuB <sub>25</sub>	25	-
EuB <sub>25</sub> Cl <sub>25</sub>	25	25
EuB <sub>25</sub> Cl <sub>50</sub>	25	50
EuB <sub>25</sub> Cl <sub>75</sub>	25	75
EuB <sub>50</sub>	50	-
EuB <sub>50</sub> Cl <sub>25</sub>	50	25
EuB <sub>50</sub> Cl <sub>50</sub>	50	50
EuB <sub>75</sub>	75	-
EuB <sub>75</sub> Cl <sub>25</sub>	75	25
EuB <sub>100</sub>	100	-

Para fijar las condiciones de obtención, se realizaron ensayos preliminares para dos de las composiciones: EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub> y EuB<sub>100</sub>, considerando las diferencias existentes entre complejos preparados únicamente con AB —como contraíón— y aquellos con neutralización adicional de ácido clorhídrico. En la Tabla 2-2 se incluyen las variables y los niveles evaluados en dichos estudios. La concentración de HCl solo aplica para EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub>, de acuerdo con lo explicado previamente.

**Tabla 2-2** Variables y niveles seleccionados para los ensayos preliminares de obtención de los complejos.

Variable	Nivel (-)	Nivel (+)
<b>A:</b> Tiempo de interacción componentes	5 min	30 min
<b>B:</b> Tipo de agitación manual	Mesurada*	Exhaustiva*
<b>C:</b> Secado	En el mortero y estufa de vacío a 18°C	Molde metálico y estufa a 25°C
<b>D:</b> Solvente	Acetona	Etanol
<b>E:</b> Volumen del solvente	15 ml x 3 g EuE	30 ml x 3 g de EuE
<b>F:</b> Cantidad a preparar	Equivalente a 3 g EuE	Equivalente a 6 g EuE
<b>G:</b> Concentración HCl	0,5 M	2,5 M

\*La agitación manual medida consistió en 1 min de agitación seguido de 5 min de descanso mientras que en el modo exhaustivo se agitó 5 min continuos, seguidos por 1 min de descanso.

En la Tabla 2-3 se presenta la información asociada a los niveles utilizados de las variables, para la obtención de los complejos en cuatro ensayos preliminares (I, II, III y IV). La selección se realizó de modo tal que las condiciones fueran lo más opuesto posible.

**Tabla 2-3** Variables seleccionadas para la obtención de los complejos en los ensayos preliminares.

Ensayo	Complejo	Variable						
		A	B	C	D	E	F	G
I	EuB <sub>100</sub>	+	+	+	+	+	+	N.A
II		-	-	-	-	-	-	N.A
III	EuB <sub>50</sub> Cl <sub>50</sub>	+	+	+	+	+	+	+
IV		-	-	-	-	-	-	-

*N.A: No aplica. Las condiciones y los niveles hacen referencia a lo descrito en la Tabla 2-2*

En todos los ensayos se aseguró la formación de la interacción iónica entre EuE y AB por la técnica de FTIR, siguiendo la metodología descrita más adelante (en la sección *Caracterización por espectroscopía infrarroja*). Como variable respuesta para el análisis de los resultados se eligió el “Porcentaje de activo retenido por el complejo”, para su determinación se evaluaron cuatro técnicas diferentes, en aras de seleccionar la más adecuada:

1. **Coeficiente de reparto:** Se siguió la metodología descrita por Quinteros y col [2]: dispersiones acuosas de cada uno de los complejos (al 0,055% del PE) fueron dispuestas en embudos de separación junto con el solvente apolar ciclohexano, en una proporción de 2 veces el volumen de la fase orgánica por el volumen de la fase acuosa. El pH de la dispersión fue determinado antes y después del equilibrio (Hanna HI 2221, sensibilidad 0,01 pH); el contenido de ácido benzoico en la fase orgánica fue cuantificado por espectrofotometría UV. Además, se realizó el mismo procedimiento para la solución acuosa de AB a concentración de  $8,28 \times 10^{-3}$  M.
2. **Ultrafiltración:** Dispersiones de los complejos en agua a una concentración de 0,5% del polímero fueron filtradas en una celda con agitación de 50 ml de capacidad (Amicon® Ultra modelo 8050, Millipore) provista de una membrana de celulosa con peso molecular de corte de 10000 Dalton en virtud del peso molecular polimérico, bajo una presión aproximada de 50 psi. La determinación de la cantidad de AB filtrado se cuantificó por espectrofotometría UV (espectrofotómetro UV-VIS 1800, Shimadzu) empleando una metodología validada previamente en el grupo de investigación, todos los días en los que se utilizó el equipo se realizó la medición

de soluciones control de AB a 3 y 10 µg/ml. Al filtrado se le determinó el valor de pH (Hanna HI 2221).

- 3. Ultracentrifugación:** Se utilizaron filtros para centrifuga tipo: "Amicon Ultra 0,5mL 10Kd". En el compartimento superior del sistema se adicionó 500 µL de la dispersión acuosa del complejo a una concentración del polímero de 0,5% y se procedió a centrifugar (Heraeus Megafuge 16, Thermo Scientific) a las condiciones recomendadas por el fabricante: un tiempo de 10 minutos a una velocidad de 14.000 G. Finalizado el proceso de centrifugación se cuantificó el contenido del activo filtrado por espectrofotometría UV (UV-VIS 1800, Shimadzu).
  
- 4. Diálisis:** Para esta prueba se siguió la metodología reportada por Battistini F.D. y *col* [158] con algunas modificaciones, empleando dispersiones acuosas de los complejos a una concentración de 0,5% del polímero. Se obtuvieron "bolsas de diálisis" hechas con tubos de membrana de acetato de celulosa con tamaño de poro de 12KDa (Sigma®) previamente hidratados en agua filtrada calidad HPLC (Milli-Q®, Millipore) por 30 minutos y sellados en los extremos con cinta de teflón y cierres extraídos de tubos de eppendorf. En el interior de cada bolsa de diálisis se adicionaron 10 ml de cada una de las dispersiones de los complejos a evaluar; luego el sistema obtenido fue introducido en un vaso de precipitado con 400 ml de agua Milli-Q desgasificada y dispuesto por 24 horas bajo agitación magnética de 400 rpm, a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de equilibrio se cuantificó el AB en el grueso de la solución externa por espectrofotometría UV (UV-VIS 1800, Shimadzu) y además se determinó el pH (Hanna HI 2221) tanto al interior como al exterior de la bolsa de diálisis.

En una segunda etapa del proceso de selección de las condiciones de obtención, se planteó un diseño estadístico experimental (DEE) del tipo factorial fraccionado [159] para los mismos complejos modelo seleccionados previamente. Los factores a evaluar se presentan en la Tabla 2-4 y las matrices correspondientes a los DEE en la Tabla 2-5 y la Tabla 2-6. Como variable respuesta se utilizó el porcentaje del activo retenido por el complejo determinado únicamente por la técnica de diálisis, en todos los casos se confirmó la interacción iónica por FTIR.

**Tabla 2-4** Factores seleccionados para el DEE factorial fraccionado para la obtención de los complejos.

Factor	Nivel (-)	Nivel (+)
A: Secado	En el mortero y estufa de vacío a 18°C	Molde metálico y estufa a 25°C
B: Solvente	Acetona	Etanol
C: Volumen del solvente	15 ml x 3 g EuE	30 ml x 3 g de EuE
D: Tiempo de interacción componentes	5 min	30 min
E: Concentración HCl	0,5 M	2,5 M

**Tabla 2-5** Matriz del DEE factorial fraccionado para la selección de las condiciones de elaboración del complejo EuB<sub>100</sub>.

Ensayo	Factores			
	A	B	C	D
1	-	-	-	-
2	+	-	+	-
3	+	+	-	-
4	-	+	+	-
5	+	-	-	+
6	-	-	+	+
7	-	+	-	+
8	+	+	+	+

**Tabla 2-6** Matriz del DEE factorial fraccionado para la selección de las condiciones de elaboración del complejo EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub>.

Ensayo	Factores				
	A	B	C	D	E
1	+	-	-	-	-
2	-	+	+	-	-
3	-	-	+	+	-
4	+	+	-	+	-
5	+	-	+	-	+
6	-	+	-	-	+
7	-	-	-	+	+
8	+	+	+	+	+

El efecto de los factores sobre la variable respuesta (porcentaje de AB retenido en el complejo) se calculó como la diferencia entre el promedio de las respuestas cuando el factor ensayado se encontraba en su nivel positivo y el promedio de las respuestas cuando se trabajó en su nivel negativo, además se consideraron las interacciones entre factores. Para establecer si los efectos eran significativos, se comparó el error experimental con los efectos, siendo “significativo” todo efecto cuyo valor estuviese por encima del error experimental. El error experimental fue calculado por la Ecuación 2-1

$$\text{Error}_{\text{experimental}} = K \cdot R_{\text{med}} \quad (2-1)$$

Donde  $R_{\text{med}}$  es el promedio de los rangos de cada ensayo realizado y  $K$  es determinado en función de los intervalos de confianza y del número de réplicas, que para el caso del presente estudio —un nivel de confianza del 95 % y dos réplicas— es de 3,5 [159].

### **ii. Reproducibilidad del método de obtención de los complejos**

Una vez definidas las condiciones de obtención se elaboraron tres lotes de cada uno de los diez complejos, cuya composición se detalló en la Tabla 2-1, luego se verificó la reproducibilidad del método de obtención mediante la determinación del contenido de AB expresado como porcentaje en masa. Con este fin, se prepararon dispersiones acuosas de los complejos a una concentración del polímero de 0,5%, y se cuantificó el contenido del activo mediante espectrofotometría UV a  $\lambda$  de 227 nm (UV-VIS 1800, Shimadzu), para ello se hicieron las respectivas diluciones que permitieran cuantificar el contenido de AB en el rango de la curva de calibración de la metodología validada. A los resultados se les determinó la diferencia entre valor experimental y teórico, para conceptuar acerca de la reproducibilidad entre los lotes obtenidos. En todos los casos se confirmó previamente la interacción iónica de los componentes del complejo por FTIR.

### **iii. Caracterización por espectroscopía infrarroja**

Los diez complejos obtenidos, AB, EuE y una mezcla física equivalente a la composición del complejo  $\text{EuB}_{100}$ , se caracterizaron mediante espectroscopía infrarrojo por transformada de Fourier (Espectrofotómetro IRPrestige-21/ATR, Shimadzu) empleando la técnica de muestreo de reflectancia total atenuada (ATR). Las condiciones de análisis utilizadas fueron:

- ☞ *Rango de longitud de onda:* entre  $4000 \text{ cm}^{-1}$  y  $400 \text{ cm}^{-1}$
- ☞ *Número de scans:* 62.
- ☞ *Resolución:*  $4 \text{ cm}^{-1}$
- ☞ *Apodización:* Happ-Genzel
- ☞ *Condiciones de temperatura:* entre  $15^\circ\text{C}$  y  $35^\circ\text{C}$

- ☞ *Condiciones de humedad relativa:* entre 15% y 60%.

Posteriormente los datos fueron analizados haciendo uso del programa espectral LabSolutions-IR®

## 2.2 Presentación y discusión de los resultados

### *i. Selección de las condiciones de obtención*

En primer lugar, se realizó la determinación del número de grupos amino ionizables por gramo de EuE, el cual fue calculado con éxito al seguir la metodología propuesta. El valor determinado para el lote de EuE utilizado en la presente investigación fue:  $3,01 \times 10^{-3}$  mol de grupos DMAE por gramo de EuE, con un CV de 0,44%. A partir de este dato se calcularon las cantidades de AB para neutralizar los porcentajes correspondientes para cada una de las diez composiciones de complejo, asimismo para determinar el volumen de las soluciones de HCl a utilizar, para la respectiva neutralización.

La preparación exitosa de complejos polielectrolito entre el polímero catiónico EuE y el activo aniónico AB, utilizando la metodología de evaporación de solvente se ha reportado en algunas publicaciones [2,71,156], sin embargo se desarrolló un DEE para establecer las condiciones más favorables para su obtención. La selección de los factores evaluados, incluidos en la Tabla 2-2, se realizó teniendo en cuenta su posible incidencia en la interacción iónica entre los precursores y la naturaleza propia de la metodología, es decir, de una técnica manual a escala laboratorio. A continuación, se describe el propósito por el cual se evaluó cada uno de los parámetros:

- ☞ **Tiempo de interacción:** se evaluó un lapso corto (5 min) y uno largo (30 min) con el objetivo de determinar si existe una limitante de tiempo para que ocurra la interacción iónica entre componentes.
- ☞ **Tipo de agitación:** se buscó establecer si la energía suministrada al sistema mediante agitación manual, ya sea exhaustiva o mesurada, se traducía en una mayor o menor condensación iónica.
- ☞ **Secado:** se evaluaron dos métodos distintos a temperaturas diferentes con el propósito de evaluar el efecto de esta variable en la estabilidad de la interacción del CPE obtenido.

- ☞ Solvente: reconocer el efecto de la constante dieléctrica del medio ( $\epsilon$ ) a pequeñas diferencias, como la que existe entre acetona y etanol.
- ☞ Volumen del solvente: establecer si la disponibilidad de un mayor volumen y en consecuencia la posible expansión de las cadenas del PE favorece la complejación.
- ☞ Cantidad a preparar: reconocer el posible efecto del tamaño del lote preparado.
- ☞ Concentración de HCl: determinar si al utilizar una solución más diluida y por tanto con mayor contenido de agua y  $\epsilon$  más alta aumenta la formación del par iónico.

Como se mencionó en la metodología, se realizaron ensayos preliminares para los complejos modelo  $\text{EuB}_{100}$  y  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$  que fueron obtenidos exitosamente y caracterizados mediante FTIR, sus espectros demostraron la formación del CPE (resultados no incluidos). El análisis riguroso de las bandas de absorción se presentará en la sección *iii*. *Caracterización por espectroscopía infrarroja*.

La elección de la variable respuesta fue crucial para el desarrollo de los estudios preliminares. Debido a que el objetivo era asegurar la interacción iónica entre los componentes, no se consideró importante el rendimiento del proceso, porque se trata de un ensayo manual y ninguno de los factores genera pérdidas significativas de los productos, además porque mayores porcentajes en rendimiento no representan valores más altos de la interacción entre el PE y el AB; es por ello que la variable respuesta debía reflejar la formación del enlace iónico; en este sentido se planteó utilizar el análisis del espectro de IR, específicamente la intensidad de las bandas relacionadas con los grupos DMAE no protonados del EuE, sin embargo los resultados de ensayos a diferentes condiciones —expresados como porcentaje de transmitancia— fueron muy semejantes y por este motivo se eligió el “*Porcentaje de activo retenido por el complejo*” como la variable respuesta más adecuada.

Cuatro técnicas fueron estudiadas para determinar esta variable respuesta seleccionada, a continuación, se describen los hallazgos relacionados con cada una de ellas y los motivos que llevaron a su rechazo o elección como metodología rutinaria para la aplicación de los DEE planteados.

1. **Coefficiente de reparto:** La ejecución de esta metodología no permitió determinar el porcentaje de AB retenido al complejo, lo anterior debido a dos razones

principales: la primera estuvo relacionada con el comportamiento observado al someter las dispersiones acuosas de los complejos modelo ( $\text{EuB}_{100}$  y  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$ ) al proceso de reparto con el solvente apolar ciclohexano, pues a pesar de utilizar una concentración baja, se encontró que la interfase no presentaba una clara separación de los dos solventes y se formaban pequeñas gotículas tipo emulsión. Estos hallazgos fueron atribuidos al carácter anfifílico del PE [77].

El segundo motivo fue la baja selectividad del método de espectrometría UV para cuantificar el AB en ciclohexano, ya que a las condiciones del ensayo se encontró que el solvente apolar facilitaba la extracción de diversos compuestos asociados a la técnica, es decir, el uso de elementos como tapas plásticas, Parafilm® o pipeteadores la fase orgánica se contaminaba y al realizar el espectro de barrido (UV-VIS, 1800) no se observaba el típico perfil de absorción para AB y en cambio se presentaba el correspondiente al de los contaminantes. Aunque se tomaron medidas para minimizar este efecto -como emplear solo material de vidrio y tapas de teflón- se consideró que la metodología no era práctica para ser utilizada de manera rutinaria, y aún más teniendo en cuenta que se deberían realizar para los ensayos preliminares, para el DEE y para cada uno de los diez complejos estudiados.

- 2. Ultrafiltración:** Al hacer uso de esta metodología se obtuvieron resultados preliminares con valores erráticos para la variable respuesta. Con el objetivo de descartar interferencias en el ensayo, se evaluó el porcentaje de principio activo retenido al utilizar una solución acuosa de AB y se encontró que, a una concentración equivalente a la empleada en la dispersión del complejo, cerca del 30% del activo no permeaba a través de la membrana y era retenido. Lo anterior fue atribuido a una posible saturación del sistema, sin embargo, no se evaluó un rango de concentración más bajo ya que los resultados correspondientes estarían por debajo de los valores cuantificables mediante la metodología validada.

En conclusión, la técnica de ultrafiltración fue descartada porque, a las condiciones del ensayo, presentaba un porcentaje de retención basal del AB de magnitud considerable. Además, vale la pena mencionar que —al igual que la metodología de coeficiente de reparto— su desarrollo no es considerado práctico si se tiene en

cuenta el número de ensayos a realizar y que su ejecución depende del uso constante de una bala de nitrógeno para asegurar la presión de trabajo.

- 3. Ultracentrifugación:** Esta metodología permitió realizar la determinación del porcentaje de AB retenido por el complejo, de manera sencilla y sin contratiempos. En la Tabla 2-7 se presentan los resultados para los cuatro ensayos preliminares de los complejos modelo.

**Tabla 2-7.** Porcentaje de AB retenido por el complejo, determinado por la metodología de ultracentrifugación para los ensayos preliminares con los complejos modelo.

EuB <sub>100</sub>			EuB <sub>50</sub> Cl <sub>50</sub>		
Ensayo preliminar	Réplica	% de AB retenido	Ensayo preliminar	Réplica	% de AB retenido
I	1	93,16 ± 0,96	III	1	94,95 ± 0,05
	2	92,99 ± 1,75		2	95,55 ± 0,16
II	1	94,66 ± 0,25	IV	1	95,40 ± 0,13
	2	94,57 ± 0,16		2	94,48 ± 0,06
CV		0,95 %	CV		0,51%

CV: Coeficiente de variación del % de AB retenido entre los cuatro ensayos de cada complejo. La identificación de los ensayos preliminares corresponde a la presentada en la Tabla 2-3.

- 4. Diálisis:** también permitió la determinación de la variable respuesta sin inconvenientes. Los resultados asociados a esta metodología se incluyen en la Tabla 2-8 e indican lo equivalente a lo previamente descrito para la Tabla 2-7. El paso a paso de los cálculos realizados para establecer la distribución de especies y el porcentaje relacionado con el par iónico se incluyen en el Capítulo 3.2, literal *iv. Distribución de especies y constante de afinidad.*

**Tabla 2-8** Porcentaje de AB retenido por el complejo, determinado por la metodología de diálisis para los ensayos preliminares con los complejos modelo.

EuB <sub>100</sub>			EuB <sub>50</sub> Cl <sub>50</sub>		
Ensayo preliminar	Réplica	% de AB en el par iónico	Ensayo preliminar	Réplica	% de AB en el par iónico
I	1	98,70 ± 0,01	III	1	98,95 ± 0,10
	2	98,78 ± 0,09		2	98,75 ± 0,01
II	1	98,84 ± 0,01	IV	1	99,06 ± 0,10
	2	97,86 ± 0,80		2	98,90 ± 0,12
CV		0,47 %	CV		0,13 %

CV: Coeficiente de variación del % de AB en el par iónico entre los cuatro ensayos de cada complejo. La identificación de los ensayos preliminares corresponde a la presentada en la Tabla 2-3.

Teniendo en cuenta que solo por ultracentrifugación y diálisis fue posible determinar la variable respuesta, se realizó la elección de la metodología de trabajo para los posteriores análisis. Para ello se consideraron las ventajas y desventajas asociadas a cada una de ellas y como resultado se eligió la metodología de diálisis, pues a diferencia de ultracentrifugación, esta permite discriminar las diferentes especies químicas presentes en la dispersión y calcular el porcentaje exacto de AB que ha sido complejado con el PE. Además, en función del costo de cada análisis también es de mayor ventaja la metodología de diálisis, pues solo supone el uso de la respectiva membrana de celulosa, mientras que para ultracentrifugación requiere de los filtros “Amicon Ultra 0,5mL 10Kd”. Debido a que la técnica de diálisis considera los equilibrios involucrados en la dispersión, es posible afirmar que la variable respuesta determinada puede renombrarse a “Porcentaje de AB complejado”.

Respecto a los resultados preliminares, se observó que los valores de la variable respuesta fueron muy similares, de hecho, el coeficiente de variación reportado en la Tabla 2-7 y la Tabla 2-8 no supera el 1% en ninguno de los casos, incluso para la metodología de diálisis fue inferior a 0,5%. De acuerdo con estos resultados, se decidió utilizar un DEE tipo factorial fraccionado (con ocho ensayos por matriz) y 5 factores, se seleccionaron aquellos con un posible mayor impacto en la interacción entre los componentes (Ver Tabla 2-4). En la Tabla 2-9 se presentan los resultados asociados a la aplicación del DEE de factorial fraccionado, se incluye el valor promedio, coeficiente de variación y rango; de modo resumido, todos los valores de la variable respuesta se encontraron entre 98 y 99 %. Asimismo, en la Tabla 2-10 se presentan los resultados de los efectos, demostrando que ninguno de los factores influencia en forma significativa la variable respuesta estudiada, pues en todos los casos el error experimental fue superior al valor calculado para los efectos.

**Tabla 2-9.** Selección de las condiciones de elaboración de los complejos aplicando DEE factorial fraccionado. Resultados consolidados para la variable respuesta.

Ensayo	Complejo EuB <sub>100</sub>		Complejo EuB <sub>50</sub> Cl <sub>50</sub>	
	% de AB complejoado		% de AB complejoado	
	Promedio	Rango	Promedio	Rango
1	98,61 (0,19)	0,26	98,66 (0,00)	0,01
2	98,47 (0,45)	0,63	98,79 (0,11)	0,15
3	98,47 (0,36)	0,51	98,40 (0,71)	0,98
4	98,51 (0,06)	0,08	98,83 (0,01)	0,01
5	98,36 (0,03)	0,05	98,89 (0,06)	0,08
6	98,55 (0,04)	0,06	98,79 (0,14)	0,19
7	98,51 (0,09)	0,13	98,83 (0,04)	0,05
8	98,52 (0,29)	0,41	98,81 (0,00)	0,01

**Tabla 2-10** Selección de las condiciones de elaboración de los complejos aplicando DEE factorial fraccionado. Resultados de los efectos y error experimental.

Complejo EUB <sub>100</sub>							
	Factores e interacciones						
	A/BCD	B/ACD	C/ABD	AB/CD	AC/BD	BC/AD	ABC/D
Media 2	98,45	98,50	98,51	98,54	98,53	98,50	98,48
Media 1	98,55	98,50	98,49	98,46	98,47	98,50	98,51
Efecto	-0,10	0	0,02	0,08	0,06	0	-0,03
Error experimental	0,93						

Complejo EuB <sub>50</sub> Cl <sub>50</sub>							
	Factores e interacciones						
	A/BD	B/AD	C/AE	AB/D	AC/E	BC	ABC
Media 2	98,80	98,81	98,72	98,72	98,83	98,77	98,67
Media 1	98,70	98,70	98,78	98,78	98,67	98,73	98,84
Efecto	0,10	0,11	-0,06	-0,06	0,16	0,04	-0,17
Error experimental	0,65						

El hecho de que ninguno de los factores estudiados contara con un efecto significativo sobre el porcentaje de ácido benzoico complejoado, demuestra que la metodología es muy robusta y que la interacción entre EuE y AB se favorece en las condiciones estudiadas. Es así, como la selección de las variables de obtención a utilizar en la elaboración de todos los complejos se realizó, teniendo en cuenta el impacto ambiental y la facilidad para el experimentador. En la Tabla 2-11 se presenta el valor elegido para cada uno de los factores: para el secado se tomó la técnica de molde metálico/estufa debido a que su ejecución era más rápida comparado con realizar la evaporación del solvente de manera manual en el mortero y posterior uso de estufa al vacío; como solvente se utilizó etanol

pues al comparar tanto su toxicidad –DL50 Rata– [160,161] como su costo son mucho menores que las correspondientes al solvente acetona; en cuanto al volumen del solvente se eligió el de 15 ml/3g de EuE para que el proceso de evaporación ocurriera a la mayor brevedad y además para reducir costos; para el tiempo de interacción de los componentes se seleccionó el nivel bajo también para disminuir el tiempo de la metodología, al igual que la concentración de ácido clorhídrico que fue el valor más alto, pues a menor cantidad de agua adicionada al sistema más rápidamente ocurrirá la evaporación.

**Tabla 2-11.** Condiciones para la obtención de los complejos elegidos.

<b>Factor</b>	<b>Valor elegido</b>
<b>A:</b> Secado	Molde metálico y en estufa a 25°C
<b>B:</b> Solvente	Etanol
<b>C:</b> Volumen del solvente	15 ml x 3 g EuE
<b>D:</b> Tiempo de interacción componentes	5 min
<b>E:</b> Concentración HCl	2,5 M

## **ii. Reproducibilidad del método de obtención de los complejos**

Utilizando las condiciones elegidas para la obtención de los complejos, se prepararon tres lotes de cada una de las diez composiciones, en la Tabla 2-12 se presentan los resultados asociados a la reproducibilidad del método, para ello se determinó el valor experimental del porcentaje en masa de AB presente para cada complejo y se comparó con el valor teórico.

**Tabla 2-12** Valores de AB experimentales y teóricos para tres lotes de cada uno de los CPE estudiados.

<b>Complejo</b>	<b>% de AB experimental</b>					<b>% AB teórico</b>	<b>Diferencia<sup>1</sup> %</b>
	<b>Lote1</b>	<b>Lote 2</b>	<b>Lote 3</b>	<b>Promedio</b>	<b>CV</b>		
EuB <sub>25</sub>	8,37	8,39	8,40	8,39	0,18	8,43	0,47
EuB <sub>25</sub> Cl <sub>25</sub>	8,19	8,20	8,19	8,19	0,07	8,22	0,36
EuB <sub>25</sub> Cl <sub>50</sub>	8,01	8,00	8,02	8,01	0,12	8,02	0,12
EuB <sub>25</sub> Cl <sub>75</sub>	7,80	7,81	7,81	7,80	0,07	7,83	0,38
EuB <sub>50</sub>	15,46	15,47	15,47	15,47	0,04	15,52	0,32
EuB <sub>50</sub> Cl <sub>25</sub>	15,08	15,09	15,14	15,10	0,21	15,17	0,46
EuB <sub>50</sub> Cl <sub>50</sub>	14,76	14,71	14,66	14,71	0,34	14,83	0,81
EuB <sub>75</sub>	21,49	21,46	21,53	21,49	0,16	21,61	0,56
EuB <sub>75</sub> Cl <sub>25</sub>	21,07	21,07	21,12	21,09	0,14	21,16	0,33
EuB <sub>100</sub>	26,75	26,79	26,79	26,78	0,09	26,86	0,30

<sup>1</sup>: Corresponde a la diferencia en porcentaje, entre el valor promedio experimental y el teórico.

Al observar los resultados de CV asociados a los resultados experimentales de cada composición, se puede asegurar que la metodología de obtención cuenta con la reproducibilidad requerida, pues en ninguno de los casos la variación de los resultados superó el 0,4 %; asimismo se concluye que no existen discrepancias sustanciales entre el valor teórico y el experimental pues el porcentaje de diferencia entre el valor promedio experimental y el teórico fue inferior al 1 %; demostrando la capacidad de la metodología desarrollada para obtener los CPE en estudio.

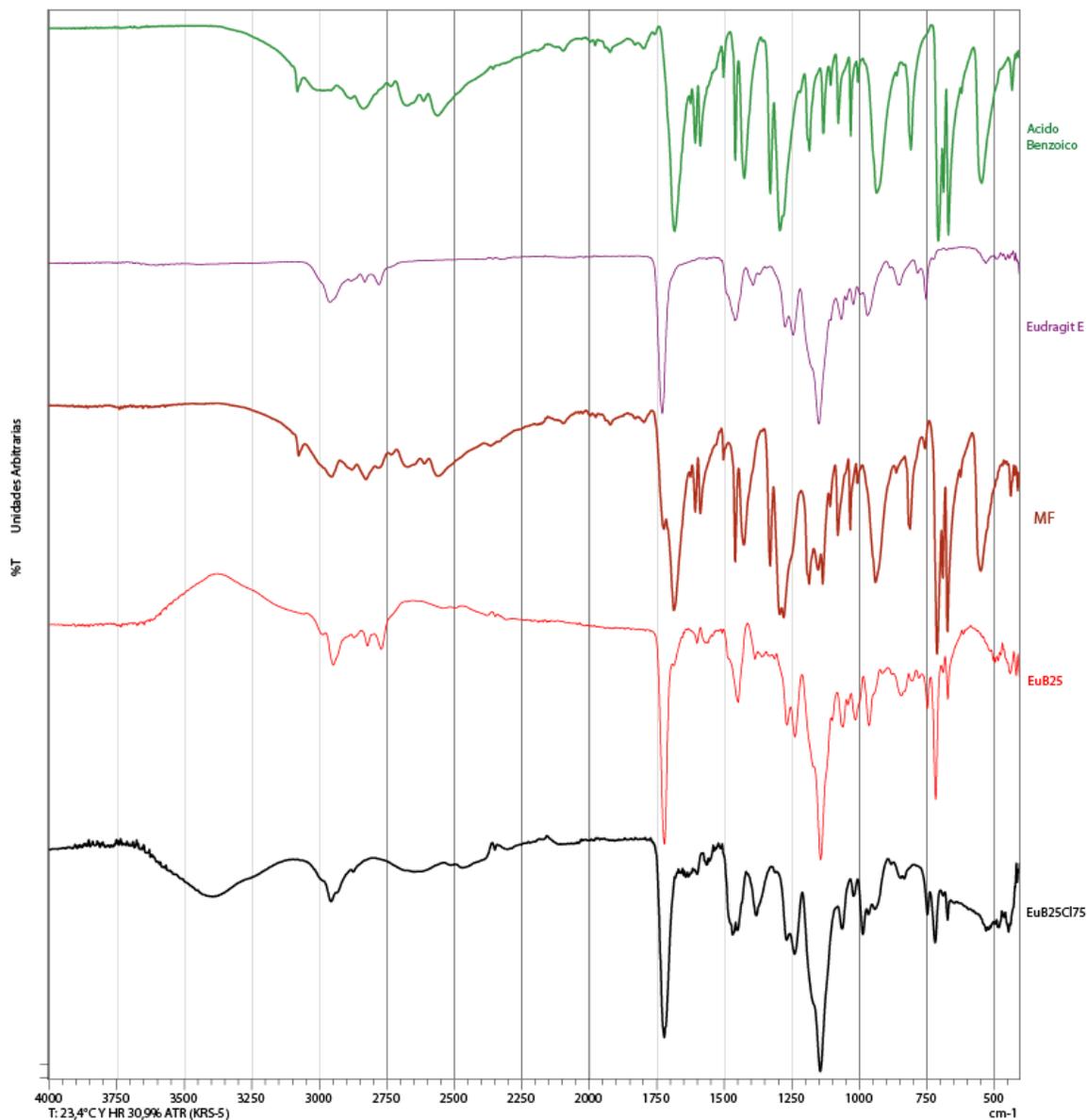
### **iii. Caracterización por espectroscopía infrarroja**

Los resultados de los espectros de infrarrojo se presentan en la Tabla 2-13, en esta se resumen las bandas de absorción de importancia para la formación del complejo: su presencia y/o longitud de onda. Adicionalmente, en la Figura 2-2 se observan, a manera de ejemplo, los espectros de absorción para dos de los complejos (EuB<sub>25</sub> y EuB<sub>25</sub>Cl<sub>75</sub>) cotejados con sus precursores y la mezcla física. En el anexo A se incluyen los espectros de FTIR para los ocho complejos restantes (Figura A 1).

**Tabla 2-13** Bandas de las transiciones vibracionales —de importancia en el proceso de complejación— de los espectros FTIR de los diez complejos obtenidos, reactivos de partida y mezcla física (MF).

	COO-H del AB (cm <sup>-1</sup> )	COO-H fuera del plano de AB (cm <sup>-1</sup> )	C=O (COOH) de AB (cm <sup>-1</sup> )	Dimetilamino de EuE (cm <sup>-1</sup> )	% T de las bandas Dimetilamino de EuE	
					2770 cm <sup>-1</sup>	2822 cm <sup>-1</sup>
<b>AB</b>	2554-3070	931	1676	---	---	---
<b>EuE</b>	---	---	---	2770-2822	92,53	93,36
<b>MF</b>	2556-3073	934	1682	2772-2822	82,49	79,95
<b>EuB<sub>25</sub></b>	N.O.	N.O.	N.O.	2772-2822	94,22	94,70
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>25</sub></b>	N.O.	N.O.	N.O.	2772-2824	96,25	96,43
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>50</sub></b>	N.O.	N.O.	N.O.	2772-2824	96,24	96,34
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>75</sub></b>	N.O.	N.O.	N.O.	N.O.	N.A.	NA
<b>EuB<sub>50</sub></b>	N.O.	N.O.	N.O.	2772-2822	95,05	95,13
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>25</sub></b>	N.O.	N.O.	N.O.	2772-2824	96,23	96,14
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub></b>	N.O.	N.O.	N.O.	N.O.	N.A.	N.A.
<b>EuB<sub>75</sub></b>	N.O.	N.O.	N.O.	2772-2824	98,03	97,90
<b>EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub></b>	N.O.	N.O.	N.O.	N.O.	N.A.	NA
<b>EuB<sub>100</sub></b>	N.O.	N.O.	N.O.	N.O.	N.A.	NA

N.O.: No se observa, N.A. No aplica.

**Figura 2-2** Espectros FTIR de los complejos  $\text{EuB}_{25}$  y  $\text{EuB}_{25}\text{Cl}_{75}$ , AB, EuE y MF.

En primer lugar, se encontró que los resultados de la caracterización por FTIR relacionados con los precursores de los complejos, EuE y AB, corresponden a lo reportado en la literatura especializada; en la Tabla 2-14 y la Tabla 2-15 se relacionan las señales de las transiciones vibracionales de las dos moléculas y el número de onda de sus respectivas bandas. Los resultados para el EuE están en línea con lo registrado por Lin S.Y y *col*[162], Juppo A. M. y *col* [163] y Villada J.D. [164]; de igual modo las señales observadas para

ácido benzoico concuerdan con lo reportado por Hayashi S y col [165,166] y Yariv S y col [167].

**Tabla 2-14.** Señales de FTIR asociadas a Eudragit® E100.

Número de onda de la banda (cm <sup>-1</sup> )	Transición vibracional asociada
2949 y 2874	Estiramiento asimétrico de CH <sub>3</sub> y de los grupos CH <sub>2</sub> de la cadena principal y del CH <sub>2</sub> -OR
2822-2770	Estiramiento simétrico de los grupos CH <sub>2</sub> de la cadena ramificada "CH <sub>2</sub> -N-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> "
1722	Estiramiento de C=O
1454 y 1487	Flexión de los grupos CH <sub>2</sub> de la cadena principal.
1387	Estiramiento del grupo CH <sub>3</sub> (posiblemente del promedio de las bandas C-CH <sub>3</sub> y N-CH <sub>3</sub> )
1269 y 1238	Estiramiento grupo ester C-O.
1144	Estiramiento grupo ester C-O y C-N

**Tabla 2-15.** Señales de FTIR asociadas a ácido benzoico.

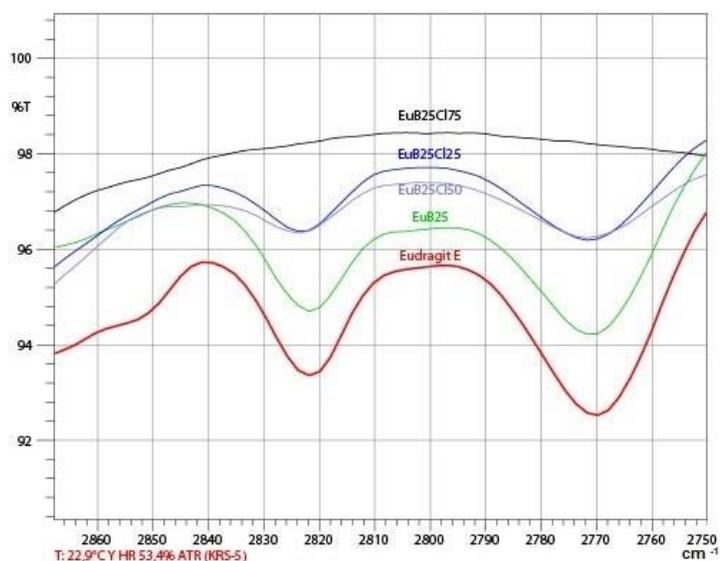
Número de onda de la banda (cm <sup>-1</sup> )	Transición vibracional asociada
2554-3070	Estiramiento O-H (Bandas C-H solapadas)
1676	Estiramiento C=O
1601 y 1582	Estiramiento C=C aromático.
1497 y 1452	C-H del anillo aromático
1419, 1288 y 1323	Acoplamiento del estiramiento C-O y flexión OH en el plano
931	Flexión O-H fuera del plano
804	Estiramiento C-C
704	Flexión O-H fuera del plano y anillo aromático
682 y 543	Flexión en movimiento de tijeras de "COO"

En cuanto a los espectros de FTIR de los complejos obtenidos, los resultados confirman la formación de la interacción iónica entre EuE y AB para las diez composiciones distintas. Lo anterior debido a tres fenómenos principales observados:

1. Desaparición de las bandas asociadas al enlace O-H del ácido benzoico (2557 cm<sup>-1</sup>, 3070 cm<sup>-1</sup>, 931 cm<sup>-1</sup> y 1685 cm<sup>-1</sup>), indicando la disociación de la molécula ácida a su equivalente iónico, necesario para la formación del CPE.
2. Cambios en la intensidad de las bandas de los grupos dimetilamino no protonados del EuE, revelando el efecto de la ionización de los mismos. Este comportamiento

es corroborado con la proporcionalidad entre el porcentaje de transmitancia (% T) de la banda y el grado de neutralización de los contraiones en cada complejo, puesto que a medida que aumenta el porcentaje de grupos del polielectrolito ionizados, mayor es el valor de % T, es decir la intensidad de la banda es menor. Es así como para los cuatro complejos que cuentan con la neutralización total de los grupos DMAE del EuE —EuB<sub>25</sub>Cl<sub>75</sub>, EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub>, EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub> y EuB<sub>100</sub>— no se observan las bandas mencionadas, mientras que, para aquellos complejos con menores porcentajes de interacción con los contraiones, ya sea benzoato o cloruro, sí son evidentes estas bandas (ubicadas en 2771 cm<sup>-1</sup> y 2821 cm<sup>-1</sup>). En la Figura 2-3 se presenta el fenómeno descrito para la serie de complejos con neutralización del 25 % de los grupos DMAE con AB, cotejados con el del polímero, en ésta se observa que, a mayor porcentaje de contraiones, las bandas son mucho menos pronunciadas.

**Figura 2-3** Espectro de FTIR en el rango de 2870 cm<sup>-1</sup> a 2750 cm<sup>-1</sup> para los complejos con neutralización de AB del 25%.

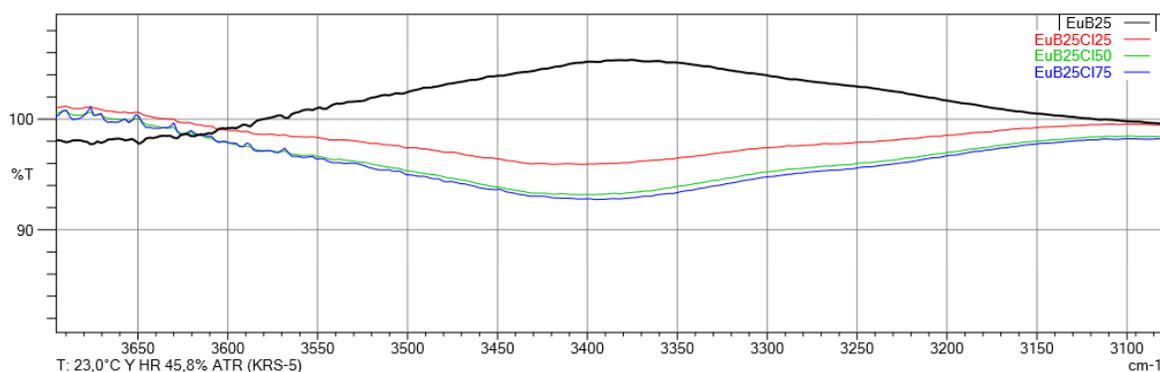


3. El espectro FTIR de la mezcla física equivalente a la composición del complejo EuB<sub>100</sub>, presenta la sumatoria de las bandas de los precursores, tanto las correspondientes al enlace O-H del AB, como las de los grupos dimetilamino no protonadas del EuE.

Los anteriores hallazgos se encuentran en línea con lo reportado en estudios previos para CPE con EuE como PE [2,71,142,144,145], en todos describen los tres fenómenos mencionados como evidencia inequívoca de la interacción.

Adicional a la comprobación de la formación de los complejos, los espectros FTIR permitieron observar un fenómeno relacionado con la formación de una banda ancha en  $3500\text{ cm}^{-1}$ , la cual fue atribuida por Villada J [164] a la aparición de grupos hidroxilo, como resultado de la hidrólisis de los esteres del polímero por el uso del ácido clorhídrico en el proceso de obtención. En la Figura 2-4 se presenta el fenómeno descrito, ejemplificado con los espectros FTIR de los cuatro complejos con neutralización del 25 % de los grupos DMAE con AB, en un rango de longitud de onda entre  $3700\text{ cm}^{-1}$  a  $3080\text{ cm}^{-1}$ , en esta se observa que a mayor porcentaje de neutralización con HCl, la banda se hace más pronunciada, lo cual corrobora la teoría de hidrólisis planteada.

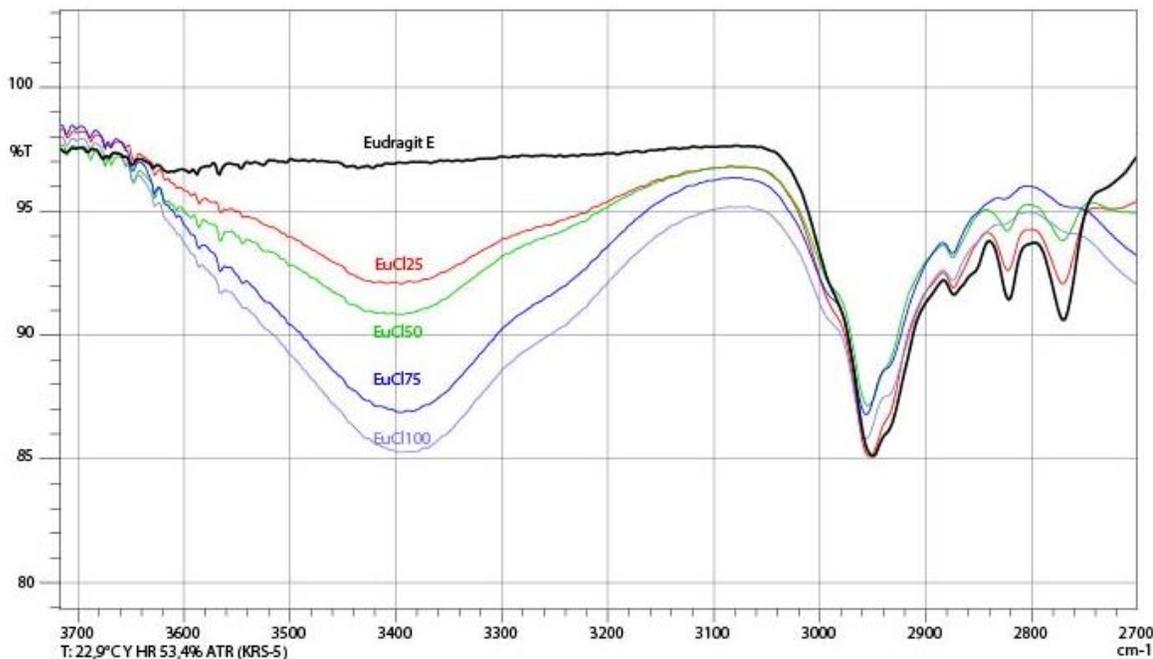
**Figura 2-4** Espectro de FTIR en el rango de  $3700\text{ cm}^{-1}$  a  $3080\text{ cm}^{-1}$  para los complejos con neutralización de AB del 25%.



Con el objetivo de comparar el fenómeno de hidrólisis reportado por Villada J. [164], se realizó la obtención de cuatro sistemas con neutralización única de ácido clorhídrico, en los porcentajes de 25, 50, 75 y 100 % de los grupos DMAE del EuE denominados, respectivamente, EuCl<sub>25</sub>, EuCl<sub>50</sub>, EuCl<sub>75</sub> y EuCl<sub>100</sub>. Los resultados de los espectros de FTIR se presentan en la Figura 2-5 y muestran un comportamiento semejante al reportado por Villada J, aun cuando los métodos de obtención son diferentes; en el estudio previo utilizan agua como solvente y liofilización como método de evaporación, este proceso se completa en aproximadamente una semana. Como ventajas de la metodología de obtención optimizada en la presente investigación se destacan la rapidez (ya que los complejos se

obtienen en alrededor de 24 horas) y la simplicidad de los elementos requeridos, pues para el procedimiento de secado basta con una estufa.

**Figura 2-5** Espectro FTIR en el rango de  $3700\text{ cm}^{-1}$  a  $2700\text{ cm}^{-1}$  para EuE y los ionómeros EuCl<sub>25</sub>, EuCl<sub>50</sub>, EuCl<sub>75</sub> y EuCl<sub>100</sub>.



En cuanto a la reducción de las bandas relacionadas con los grupos dimetilamino no protonados ubicadas en  $2771\text{ cm}^{-1}$  y  $2821\text{ cm}^{-1}$ , Villada plantea la hidrólisis de estos grupos como una posible causa para este fenómeno; sin embargo, al observar el espectro FTIR de los complejos EuB<sub>75</sub> o EuB<sub>100</sub> (Figura A 1), en los que no se adicionó HCl, se descarta esta teoría, pues las bandas en  $2771\text{ cm}^{-1}$  y  $2821\text{ cm}^{-1}$  también se reducen, aun cuando el AB no favorece la reacción de hidrólisis, como lo evidencia la ausencia de la banda ancha en  $3500\text{ cm}^{-1}$  en los espectros FTIR de EuB<sub>25</sub>, EuB<sub>50</sub>, EuB<sub>75</sub> y EuB<sub>100</sub>.

## 2.3 Conclusiones

Para la obtención de los CPE de la presente investigación se encontró que:

- ☞ De las cuatro técnicas evaluadas para determinar el “*Porcentaje de activo retenido por el complejo*”: coeficiente de reparto, ultrafiltración, ultracentrifugación y diálisis, esta última fue la más apropiada ya que discrimina las diferentes especies químicas

presentes en la dispersión y determina el porcentaje exacto de AB complejoado con el PE.

- ☞ Ninguno de los factores evaluados en el DEE factorial fraccionado, utilizado para definir las condiciones de obtención de los CPE mediante el método de evaporación del solvente (tipo de secado, solvente, volumen de solvente, tiempo de interacción de los componentes y concentración de HCl) contó con un efecto significativo sobre el grado de asociación de los complejos.
- ☞ Las condiciones de obtención de los CPE fueron seleccionadas en función de un menor impacto ambiental y una mayor facilidad para el experimentador. Correspondieron a: secado en estufa a 25°C; como solvente etanol en un volumen de 15 mililitros por cada 3 gramos de EuE; el tiempo de interacción de 5 minutos y como concentración de HCl la correspondiente a 2,5 M.
- ☞ Para cumplir con los demás objetivos de la investigación, era necesario la preparación de diez composiciones distintas de los CPE, la cuales fueron definidas en función del porcentaje de los grupos DMAE neutralizados con AB y/o HCl, abarcando todas las posibles combinaciones entre rangos de 25 % de neutralización. Las composiciones definidas fueron: EuB<sub>25</sub>, EuB<sub>25</sub>Cl<sub>25</sub>, EuB<sub>25</sub>Cl<sub>50</sub>, EuB<sub>25</sub>Cl<sub>75</sub>, EuB<sub>50</sub>, EuB<sub>50</sub>Cl<sub>25</sub>, EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub>, EuB<sub>75</sub>, EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub> y EuB<sub>100</sub>.
- ☞ EL método de obtención desarrollado demostró reproducibilidad para la preparación de los diez CPE.
- ☞ El análisis de FTIR de los CPE evidenció la formación de la interacción iónica entre EuE y AB; asimismo, manifestó la presencia de un proceso de hidrólisis de los grupos éster del PE debido a la adición de ácido clorhídrico.
- ☞ Los espectros FTIR de la presente investigación mostraron resultados comparables con los obtenidos en otro estudio, en el que la metodología de obtención de los sistemas se desarrolló en fase acuosa, con posterior liofilización.

## **3. Determinación de propiedades fisicoquímicas**

Los CPE, en estado sólido y en dispersión, exhiben un conjunto de propiedades que pueden ser explotadas favorablemente en diversas temáticas de investigación, como en el incremento de compatibilidad y estabilidad de activos, o en la modulación de liberación, entre otros. De hecho, se ha reportado ampliamente que el fenómeno de condensación iónica, imparte propiedades particulares a las dispersiones de complejos PE-activo, las cuales son de gran relevancia por su aplicación en sistemas de liberación de IFA [154]. Por lo anterior, la plena caracterización de los sistemas obtenidos en la presente investigación, es de suma importancia para el reconocimiento de aquellas propiedades, que producto de la formación de los CPE, hacen que las nuevas entidades químicas sean ventajosas sobre sus precursores.

### **3.1 Metodología**

#### **3.1.1 Materiales**

Fosfato monobásico de potasio (grado reactivo, J.T. Baker), hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, cloruro de sodio (grado reactivo, Merck), membrana de acetato de celulosa con peso molecular de corte de 12000 Dalton (Sigma®). Los diez CPE obtenidos en la sección anterior. En todos los experimentos se utilizó agua desionizada.

#### **3.1.2 Métodos.**

Para la determinación de algunas propiedades fisicoquímicas asociadas al estado sólido de los CPE, se realizó el análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC) y difracción de rayos X (DRX) de los diez complejos, que contienen, AB, EuE y la mezcla física (MF)

equivalente al complejo  $\text{EuB}_{100}$ . Para el estudio de las propiedades relacionadas con el comportamiento en dispersión acuosa, se estudiaron: solubilidad, distribución de especies y constante de afinidad; desplazamiento de AB por intercambio iónico, evaluación de la carga de superficie y liberación. En algunos de los ensayos se utilizó la nomenclatura “% de AB” para referirse de forma genérica a la concentración de la dispersión del CPE, en función del activo, sin embargo, NO hace referencia únicamente a la especie no disociada.

### **i. Difracción de rayos X (DRX)**

Los análisis de difracción de rayos X se realizaron en un rango de barrido entre  $10^\circ$  y  $70^\circ$  sobre la escala de  $2\theta$  a una velocidad de barrido de  $0,0260^\circ 2\theta/\text{s}$  (X Panalytical).

### **ii. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

Se evaluó el comportamiento térmico de las muestras mediante calorimetría diferencial de barrido (Analizador Mettler Toledo, DSC1-STARe System). El análisis se realizó bajo atmósfera de nitrógeno (flujo  $50 \text{ ml/min}$ ) en un rango de temperatura entre  $0^\circ\text{C}$  y  $180^\circ\text{C}$ , con un pretratamiento a  $-20^\circ\text{C}$  por 10 minutos. La rampa de calentamiento utilizada fue de  $10^\circ\text{C/min}$ . Aproximadamente  $7 \text{ mg}$  de cada muestra de polímero, complejo o mezcla física fueron pesados (Balanza Mettler Toledo ME204), mientras que para el ácido benzoico bastó con un peso de  $4 \text{ mg}$ . Todas las muestras fueron dispuestas en portamuestras de aluminio con tapa, cerradas herméticamente con la prensa (Mettler Toledo).

### **iii. Solubilidad**

Para realizar la determinación de solubilidad de los diez complejos se emplearon tres metodologías diferentes:

#### *A. Método tradicional.*

Se siguió lo descrito por Baena Y. y col [142], para ello se adicionó un exceso del soluto —complejo— a un tubo provisto de tapa que contenía  $10 \text{ ml}$  del solvente en estudio —agua—, posteriormente se taparon las muestras y fueron termostatadas a  $25^\circ\text{C} \pm 0,05^\circ\text{C}$  y mantenidas con agitación mecánica (Ind. Céntrico) durante el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio; luego de este, se cuantificó la concentración de AB en el sobrenadante de la solución saturada mediante espectrofotometría al ultravioleta (UV-VIS

1800, Shimadzu). Finalmente se determinó el pH (Hanna HI 2221) de cada una de las soluciones. Los ensayos se realizaron por triplicado.

#### *B. Determinación cualitativa*

Se analizó en tres etapas diferentes:

##### Etapa I

Se prepararon dispersiones acuosas de los complejos para volumen final 5 ml, a concentración de 3,3 % del CPE. Los tubos fueron mantenidos bajo agitación mecánica y temperatura  $25^{\circ}\text{C} \pm 0,05^{\circ}\text{C}$ . por un periodo de 24 horas (Ind. Céntrico) posterior a ello se observó la apariencia de la dispersión y se clasificó en soluble, parcialmente soluble e insoluble. Los ensayos se realizaron por triplicado.

##### Etapa II

Se procedió de manera semejante a la Etapa I pero a concentración de 0,5% de EuE. Adicionalmente se determinó el pH final (Hanna HI 2221) para cada una de las soluciones. Se realizaron tres réplicas por ensayo.

##### Etapa III

Se prepararon dispersiones de los complejos para un volumen final de 5 ml a una concentración equivalente de ácido benzoico de 0,6%; se agitó de manera mecánica por 24 horas a una temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 0,05^{\circ}\text{C}$  (Ind. Céntrico). Como solvente se utilizaron soluciones buffer de fosfatos a pH 5,8; 6,0; 6,3; 6,6; 6,9; 7,2; 7,6 y 8,0 [168]. Posterior al tiempo de equilibrio se verificó el pH (Hanna HI 2221), se observó la apariencia de la dispersión y se clasificó en soluble, parcialmente soluble e insoluble. En una segunda fase de análisis se repitieron los ensayos, pero utilizando como solvente agua y ajustando el pH mediante la adición de solución de NaOH al 2M. Los valores de pH estudiados fueron 5,8; 6,0; 6,3; 6,6; 6,9 y 7,2. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

#### *C. Cantidad máxima aceptada de complejo en agua*

Se desarrolló un método para establecer la capacidad que tenía un volumen fijo de agua para aceptar diferentes cantidades de cada uno de los complejos. Para ello, se dispusieron

2 ml de agua en tubos tapa rosca a una temperatura de  $25,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  (Ind. Céntrico) y mantenidas con agitación mecánica. Se adicionaron cantidades sucesivas de 150 mg de los complejos, cada 24 horas hasta que el sistema fuera incapaz de incorporar más sólido. En la Figura 3-1 se muestra el punto final para uno de los ensayos —y sus réplicas— característico por la presencia de sólido en la parte superior de la dispersión (**a**), aún después de las 24 horas de estudio.

**Figura 3-1.** Punto final del ensayo de solubilidad de “Cantidad máxima aceptada”



Los resultados fueron expresados como la cantidad de complejo aceptados por un mililitro de agua (en gramos) y el equivalente en masa de ácido benzoico para cada uno de los sistemas.

#### **iv. Distribución de especies y constante de afinidad**

Se siguió la metodología descrita en el capítulo 2 para la determinación del porcentaje de AB retenido en el complejo por la técnica de diálisis. Para las diez composiciones estudiadas se prepararon dispersiones acuosas al 0,5 % de polímero y se registraron los datos de pH (Hanna HI 2221) al interior y exterior de la bolsa de diálisis en el equilibrio, así como la concentración de ácido benzoico en la solución externa (UV-VIS 1800) al finalizar el estudio. El ensayo se realizó por triplicado.

#### **v. Desplazamiento de AB por intercambio iónico**

Para evaluar el efecto de la adición de cloruro de sodio sobre el equilibrio iónico de las dispersiones acuosas de los complejos —al 0,5 % de polímero—, se siguió la metodología descrita por Quinteros D y *col* [2] con algunas modificaciones, para ello se realizó una titulación potenciométrica (Hanna HI 2221) con una solución de NaCl 2 M sobre 25 ml de

cada una de las dispersiones. Los resultados se presentaron como gráficas de pH vs concentración de NaCl. El ensayo se realizó por triplicado.

#### **vi. Evaluación de la carga de superficie**

El potencial electrocinético ( $\zeta$ ) de las dispersiones de los complejos fue medido usando una técnica que combina la electroforesis y la velocimetría Doppler laser (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments) [169], para ello las dispersiones —al 0,5% del polímero— de los diez complejos fueron preparadas en solución de NaCl 1mM en agua y evaluadas después de 30 minutos. En una segunda etapa se repitieron los ensayos, a las mismas condiciones descritas, pero a concentración de 0,06 % de AB y con ajuste de pH a 6,0 con soluciones de NaOH y HCl 1 M.

Para el registro y análisis de los resultados se utilizó el Software “Zetasizer”, las condiciones del procedimiento operativo estándar para la realización de las mediciones fueron:

- ☞ Opciones Generales: Modelo de Smoluchowski,  $F(\kappa a)$ : 1,50.
- ☞ Dispersante: Agua (Mili-Q), Índice de refracción: 1,33
- ☞ Temperatura: 25°C
- ☞ Tiempo de equilibrio antes de la medición: 1 minuto
- ☞ Opciones de viscosidad de la muestra: Asumir viscosidad del dispersante como viscosidad de la muestra.
- ☞ Número de mediciones: 5.
- ☞ Duración de la medición: Manual; 20 corridas.
- ☞ Celda utilizada: “Universal Dip cell”

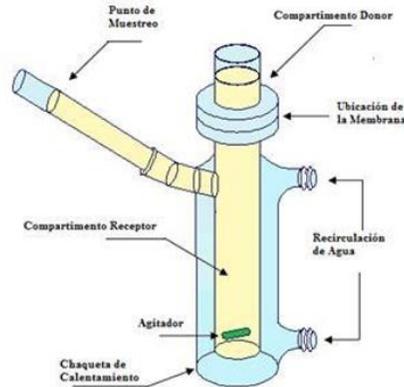
Los resultados se consideraron válidos, cuando el “Zeta quality report (M)” del software utilizado aseguró una buena calidad de la muestra (“Result meet quality criteria”). Los análisis se realizaron por triplicado.

#### **vii. Comportamiento de liberación del ácido benzoico.**

Para evaluar el comportamiento de liberación *in vitro* del ácido benzoico desde las dispersiones de los diez complejos obtenidos se utilizaron celdas de difusión

bicompartimentales tipo Franz (Elaboradas por Siliser SAS, 58 ml receptor y área  $3,51 \text{ cm}^2 \pm 0,21 \text{ cm}^2$ ) como la representada en la Figura 3-2.

**Figura 3-2:** Esquema de una celda de Franz y partes que la conforman.



Fuente: Elaboración propia.

Se siguió la metodología desarrollada y estandarizada por Baena y *col* [156] con algunas modificaciones, a continuación se presentan las condiciones de operación:

- ☞ Temperatura:  $25^{\circ}\text{C} \pm 0.05^{\circ}\text{C}$  ((Lauda Alpha A 24).
- ☞ Membrana utilizada: de acetato de celulosa con peso molecular de corte de 12000 Dalton en virtud del peso molecular polimérico.
- ☞ Volumen del compartimento receptor:  $58 \text{ ml} \pm 1 \text{ ml}$ .
- ☞ Velocidad de agitación: 400 rpm
- ☞ Volumen de muestreo: 2ml
- ☞ Cuantificación del ácido benzoico: Espectrofotometría UV (UV-VIS 1800).
- ☞ Réplicas: 3.
- ☞ Frecuencia de muestreo A: La primera hora cada 10 minutos; la segunda hora cada 15 minutos y posteriormente un muestreo por hora hasta tiempo final de 8 horas.
- ☞ Frecuencia de muestreo B: La primera hora cada 15 minutos; la segunda hora cada 30 minutos y posteriormente un muestreo por hora hasta tiempo final de 8 horas.

Los estudios de liberación se realizaron en cinco etapas en función de las variables incluidas en la **Tabla 3-1**.

**Tabla 3-1** Condiciones de volumen de compartimento donador, concentración, medio receptor y frecuencia de muestreo para las cinco etapas de estudios de liberación.

Etapa	Volumen C.D* (ml)	Concentración de la dispersión de complejo	Medio en C.R*	Frecuencia de muestreo
1	5	0,5 % EuE	Agua	A
2	1	0,5 % EuE	Agua	A
3	1	0,046 % AB	Agua	A
4	1	0,6 % AB	SBF pH 6,0	B
5	1	0,6 % AB	SBF pH 6,9	B

\*C.D: Compartimento donador; C.R: Compartimento receptor; SBF: Solución de buffer de fosfatos.

Con el objetivo de establecer si existen o no diferencias estadísticamente significativas entre algunos de los ensayos realizados, se utilizó la comparación mediante el factor de similitud,  $f_2$ , calculado por la ecuación (3-1), que evalúa el porcentaje liberado a cada tiempo de muestreo.  $R$  es el porcentaje liberado del ensayo que se establece como referencia y  $T$  el del ensayo a comparar,  $n$  indica el número de puntos comparados.

$$f_2 = 50 \cdot \text{Log} \left\{ \frac{100}{\left[ 1 + \left( \frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t) \right]^{0.5}} \right\} \quad (3-1)$$

Un valor  $f_2$  de 100 significa que los dos perfiles son idénticos; entre 50 y 100 que son similares, pero inferior a 50 indica que son estadísticamente diferentes.

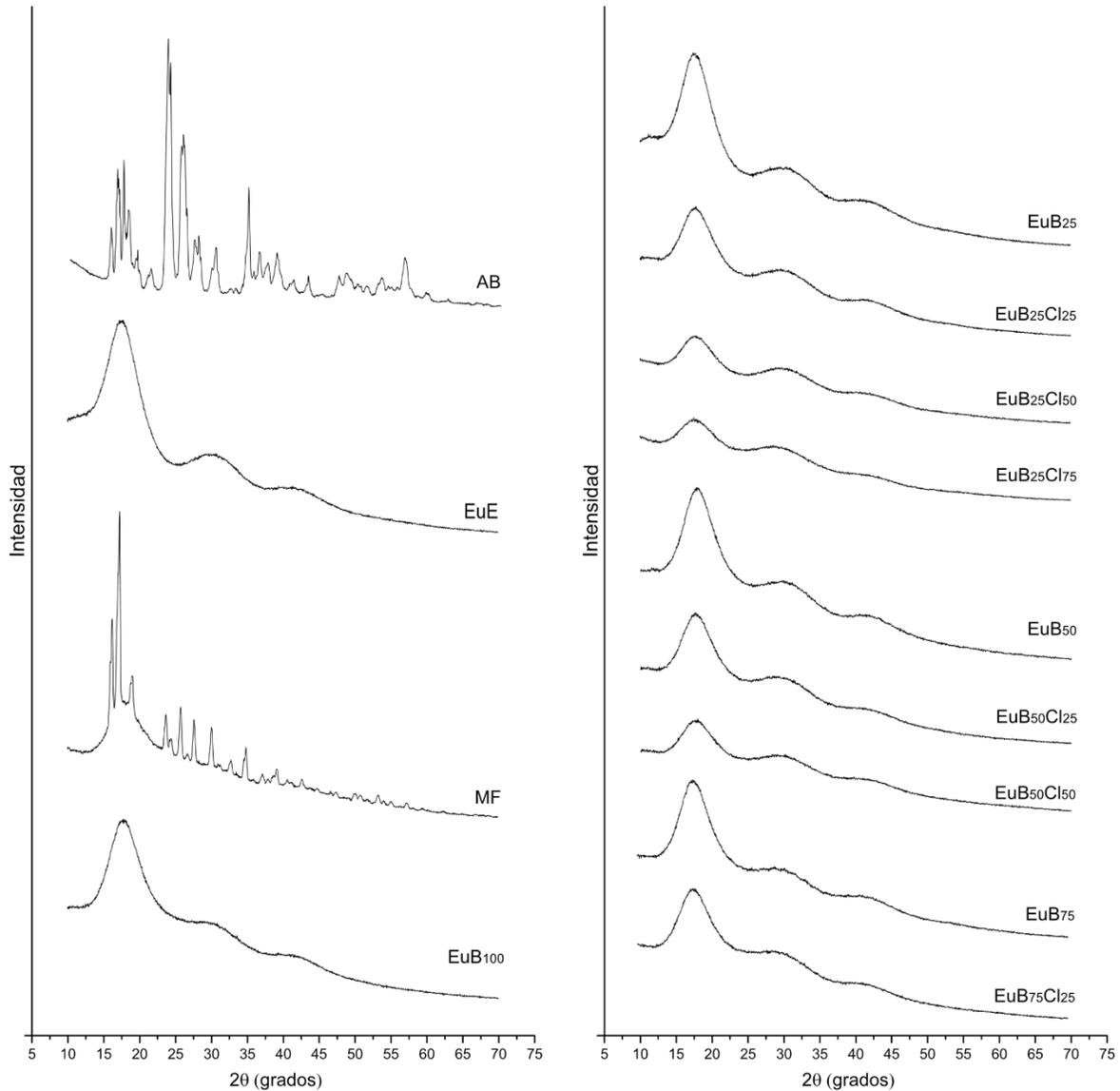
## 3.2 Presentación y discusión de los resultados

### i. Difracción de rayos X (DRX)

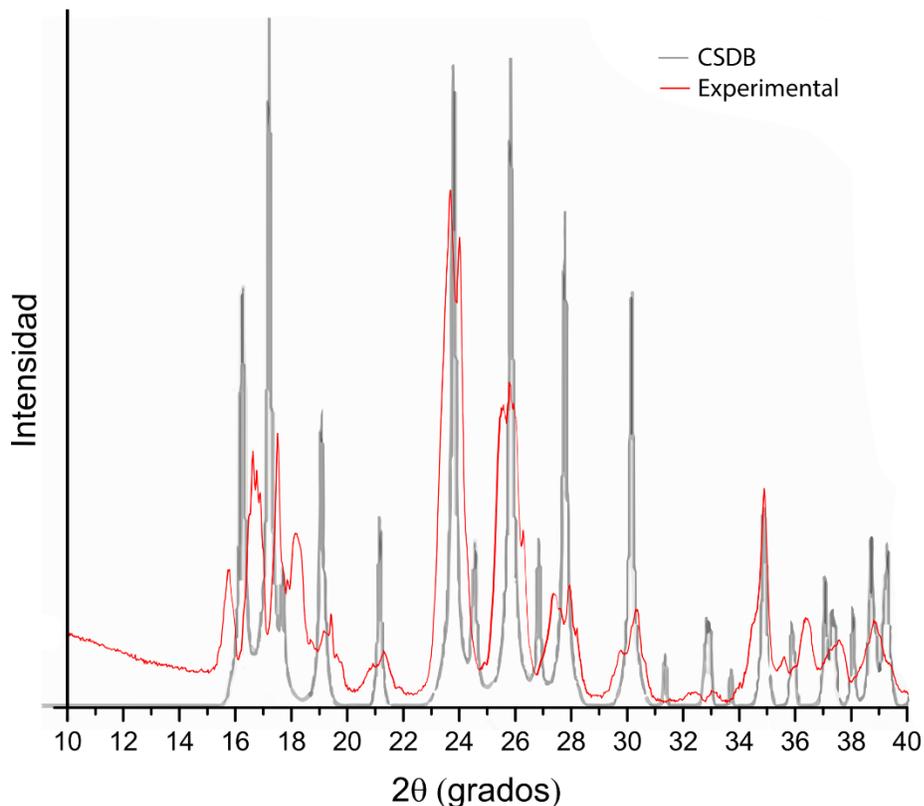
En la Figura 3-3 se presentan los patrones de difracción de rayos X de ácido benzoico, polímero, mezcla física y de los diez complejos obtenidos. Los resultados para AB corresponden al típico perfil de una sustancia cristalina, con señales claramente definidas en los ángulos de 16,6°, 17,4°, 18,1°, 23,6°, 24,0°, 25,9°, 27,3° y 34,9° que están en línea con los difractogramas reportados para este compuesto en estudios previos [170–174]. En la Figura 3-4 se compara el patrón de difracción de rayos X experimental con el reportado en la base de datos estructural de Cambridge o CSDB por sus siglas en inglés (Cambridge Structural Database) y que fue tomado del material suplementario de la publicación realizada por Pons Sieperman y *col* [171], para ello se solaparon los patrones en el rango

de  $10^\circ$  a  $40^\circ$  en la escala de  $2\theta$ , pues la mayoría de reportes encontrados fueron registrados hasta tal valor. La figura demuestra que las señales principales observadas en el patrón de difracción de rayos X experimental coinciden con aquellas presentes en la referencia de la CSBD.

**Figura 3-3** Patrones de DRX de los diez complejos obtenidos, reactivos de partida y mezcla física.



**Figura 3-4** Sobreposición de los difractogramas de ácido benzoico experimental y el reportado por Cambridge Structural Database..



El difractograma del polímero EuE es el característico de un compuesto amorfo, en el que se observan tres valores máximos —ubicados a  $17,6^\circ$ ,  $30,8^\circ$  y  $42,4^\circ$ — todos con anchos de base de al menos  $10^\circ$ , este tipo de picos suelen ser indicativos de la presencia de una estructura ordenada inmersa en una matriz amorfa [144]. El patrón de DRX de EuE registrado coincide con el reportado previamente para el polielectrolito [2,57,71,144,175–178], que corresponde al de una sustancia de carácter amorfo en el que se pueden diferenciar algunos picos anchos; siendo el registrado a menor valor de ángulo, el de mayor intensidad en todos los reportes; sin embargo se encontró que el valor exacto de pico fluctúa entre  $15^\circ$  y  $19^\circ$  ya que las condiciones de análisis no son exactamente las mismas en todos los estudios.

Para la mezcla física se obtuvo un patrón de DRX equivalente a la suma de los reactivos de partida: se observa el carácter cristalino del AB por la aparición de picos definidos en los ángulos de  $16,2^\circ$ ,  $17,3^\circ$ ,  $18,0^\circ$ ,  $23,7^\circ$ ,  $24,2^\circ$ ,  $25,8^\circ$ ,  $27,6^\circ$  y  $34,9^\circ$ , semejantes a los

presentados para el AB. Estos picos sobresalen de una línea base que cuenta con la forma amorfa de los picos anchos del EuE.

Los resultados asociados a los diez complejos presentan un difractograma parecido al arrojado por el polímero puro; en ninguno de ellos se presentan los picos particulares del compuesto de partida cristalino. Este hallazgo sugiere que, para todas las composiciones de complejo, el ácido benzoico se encuentra en forma amorfa y a nivel de dispersión molecular. Nótese que el grado de neutralización del polímero, con ácido clorhídrico, está directamente relacionado con la intensidad del patrón de DRX, es por ello que los difractogramas de los complejos EuB<sub>25</sub>, EuB<sub>50</sub>, EuB<sub>75</sub> y EuB<sub>100</sub> cuentan con una respuesta semejante, sin embargo, a medida que aumenta el porcentaje de grupos cloruro en la composición del complejo estudiado, el patrón DRX se hace más “achatado” y es así como el perfil de EuB<sub>25</sub>Cl<sub>75</sub> cuenta con la menor intensidad de todos los registros. Este comportamiento puede deberse al proceso de hidrólisis de los esteres del polímero descritos en el Capítulo 2 y cuyos grupos salientes pueden incidir en *“la estructura ordenada inmersa en la matriz amorfa”* del EuE; contribuyendo a la desestructuración de la organización del polímero y por tanto a la reducción de la intensidad de las señales.

El análisis de difracción de rayos X como técnica de caracterización para CPE, suele incluir el estudio independiente de los compuestos involucrados en su obtención y la mezcla física. Los hallazgos descritos para este estudio siguen la misma tendencia de los reportados previamente para la obtención de otros complejos [2,143,144], en todos ellos el polímero exhibe un carácter amorfo, el activo estudiado un perfil cristalino, la mezcla física la sumatoria de los dos y los complejos un difractograma típico de una sustancia amorfa. De manera excepcional se ha observado que los patrones de difracción de los complejos en algunas ocasiones presentan picos definidos a ángulos fijos, que no pueden ser atribuidos a ninguno de los reactivos de partida [2,71,144] y que fueron relacionados a puntos cristalinos de las muestras.

La técnica de difracción de rayos X no puede ser utilizada como herramienta única para comprobar la formación de complejos, pues los fenómenos que se observan también tienen lugar en el desarrollo de otros sistemas, como las denominadas *“dispersiones sólidas”*, en la Tabla 3-2 se resumen algunas investigaciones al respecto realizadas con el

polímero EuE; en todas ellas se obtienen resultados semejantes a los encontrados para complejos, sin que medie ningún tipo de interacción iónica entre componentes.

**Tabla 3-2** Estudios de DRX para dispersiones sólidas de EuE.

<b>Autores</b>	<b>Año</b>	<b>Dispersión sólida obtenida</b>	<b>Hallazgos del DRX de la dispersión</b>
Aitken N y <i>col</i> [176]	1996	Lidocaína - EuE por extrusión por fusión.	No se presentan los picos asociados a Lidocaína pura.
Jae-Young J.y <i>col</i> [179]	1999	Itraconazol - EuE (entre otros polímeros), con solvente cloruro de metileno y secado por aspersion	En todas las proporciones de polímero-fármaco estudiados no se observó el carácter cristalino del itraconazol.
Six K y <i>col</i> [180]	2002	Itraconazol - EuE, obtenido por extrusión por fusión.	Los picos cristalinos del itraconazol desaparecen cuando la carga del principio activo es inferior al 13 % p/p.
Haibing He y <i>col</i> [178]	2010	Fenofibrato - EuE, extrusión por fusión.	Se observan picos muy débiles del activo comparados con los de la mezcla física. Sugiere que la mayoría del fenofibrato se encuentra como forma amorfa y una pequeña proporción se encuentra como cristal.

Sin embargo, también se encuentran reportes de dispersiones sólidas, en las que el difractograma del sistema obtenido muestra los picos de carácter cristalino de los activos utilizados, entre ellos el realizado por Moneghini M y *col* para atenolol [181] y el de Valizadeh H y *col* para Indometacina [73], como elemento común se encontró que la metodología de los dos estudios empleaba solvente en mínima cantidad, factor que es de suma importancia para proporcionar las condiciones adecuadas para que la dispersión se lleve a cabo a nivel molecular, de hecho Guzmán y *col* [71] hacen mención especial a la importancia de asegurar la relajación de las cadenas del polímero cuando se dispersa en el solvente.

Para el uso de la técnica de DRX debe evitarse la presencia de interferentes, que pueden llevar a interpretaciones erróneas de los resultados, por ejemplo Li J y *col* [182] realizaron la obtención de una dispersión sólida de Eu y curcumina, mediante dispersión acuosa con buffer de acetatos y posterior liofilización. Los difractogramas de la dispersión sólida presentaron picos definidos a ángulos fijos, acordes con el de una sustancia cristalina, sin embargo, no correspondían a los hallados para el activo en el análisis individual, sino para acetato de sodio, componente de la solución reguladora utilizada. A partir de este resultado se visibiliza la importancia de utilizar una metodología como la desarrollada en esta

investigación, ya que reduce la presencia de interferentes, pues el único reactivo que se adiciona (diferente a los componentes intrínsecos del CPE), es eliminado por evaporación.

## ii. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los resultados de los análisis de calorimetría diferencial de barrido se presentan en la Figura 3-5 y la Figura 3-6. En el eje X se grafica la temperatura, en grados Celsius, y en el eje Y el flujo de calor en milivatios (mW), sin embargo, no se incluyeron los valores numéricos de este eje para facilitar la comparación de resultados entre muestras.

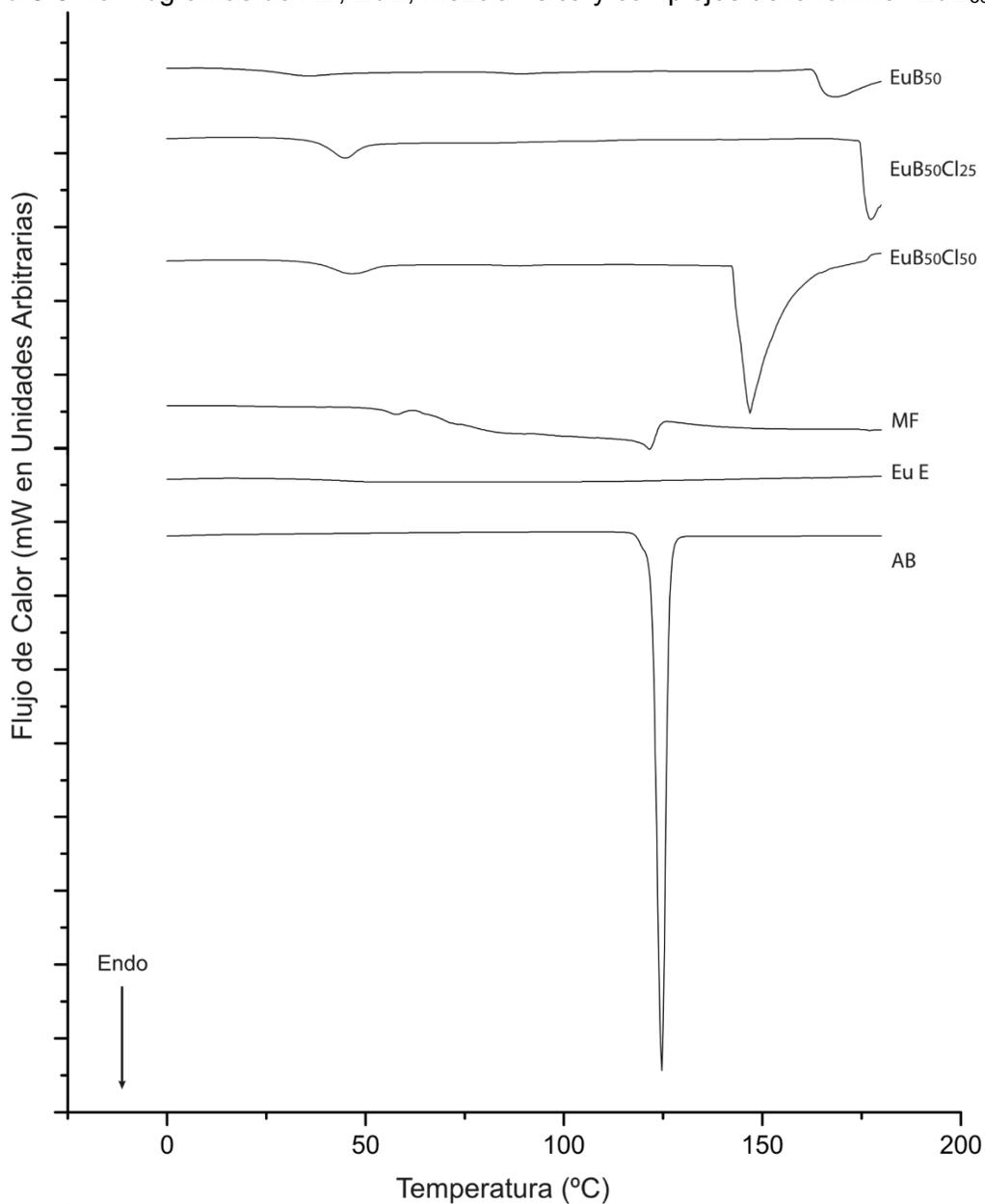
En el termograma del AB se observa un pico bien definido con temperatura de inicio en 118°C y un máximo de pico a 124,6°C correspondiente a la transición termodinámica de primer orden debida al proceso de fusión, este resultado está en línea con la temperatura de fusión reportada para AB (122°C) [67]. En el rango de temperatura evaluado no se observa ningún proceso de descomposición para el preservante [183].

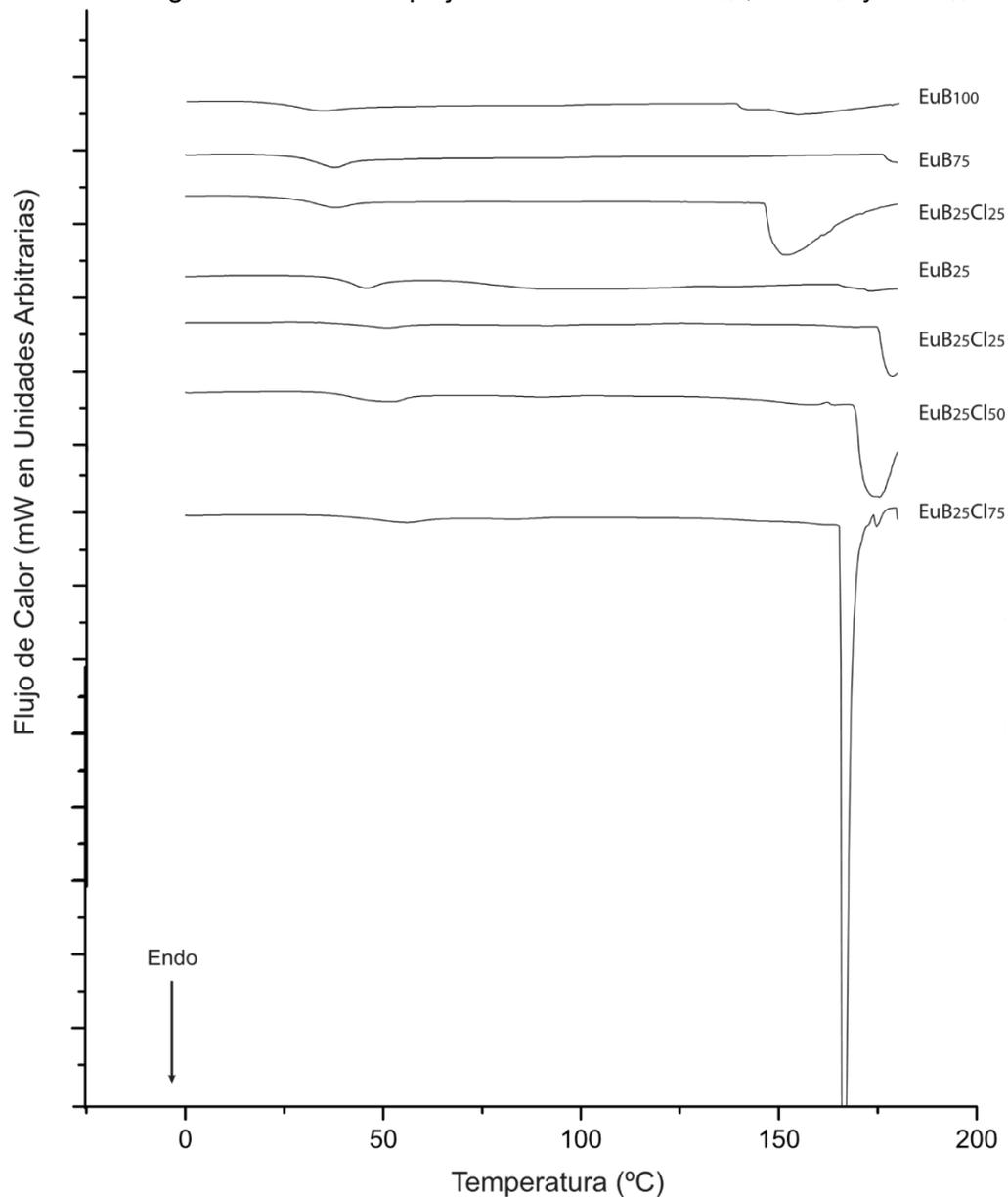
El resultado para el polímero EuE que se presenta en la Figura 3-5, corresponde al segundo ciclo de calentamiento de la muestra, ya que en el primer ciclo se observó un pico endotérmico debido a la entalpía de relajación del polímero (el cual se presenta más adelante en la Figura 3-7); fenómeno cinético que refleja el estado de las cadenas poliméricas a condiciones de almacenamiento inferiores a su temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), en específico para aquellos en los que el enfriamiento del polímero es tan rápido que las cadenas no tienen la oportunidad de encontrar orientaciones energéticamente favorables antes de solidificarse [184]. Para la determinación de la  $T_g$  del EuE se calculó la segunda derivada del flujo de calor (a partir del termograma del segundo ciclo de calentamiento) y se tomó la temperatura correspondiente al pico más prominente [185,186], en este caso 42,0°C, valor que se encuentra dentro del rango declarado por el fabricante (45 °C  $\pm$  5 °C) [69,187,188].

El perfil de DSC de la mezcla física presentó dos picos endotérmicos: el primero asociado a la  $T_g$  del EuE a una temperatura de 58,0°C —calculada mediante la segunda derivada del flujo de calor— y el segundo pico a 121,6°C, relacionado con el proceso de fusión del ácido benzoico ( $T_m$ ), que a diferencia del compuesto puro contó con una base de pico bastante amplia, incluso con temperatura de inicio en 62,0°C y con una intensidad mucho menor de la esperada, este fenómeno ha sido reportado para mezclas físicas de estudios

semejantes [57,71,144,182] en los que la señal endotérmica relativa a la del compuesto puro es mucho más ancha; tal efecto se puede atribuir a la interacción *in situ* que tiene lugar entre el polímero y el compuesto activo, que se favorece por las condiciones del análisis del DSC, que semejan las condiciones de obtención de CPE por el método de extrusión por fusión, el cual ha demostrado gran utilidad en la formación de la interacción iónica [57].

**Figura 3-5** Termogramas de AB, EuE, mezcla física y complejos de la familia “EuB<sub>50</sub>”.



**Figura 3-6** Termogramas de los complejos de la familia “EuB<sub>25</sub>”, “EuB<sub>75</sub>” y EuB<sub>100</sub>

En cuanto a los termogramas de los diez complejos, se observan resultados semejantes a los reportados por Liu H y *col* [57], en todos los casos se presenta un pico endotérmico de baja intensidad asociado a la temperatura de transición vítrea del EuE en el rango de temperatura de 33°C a 58°C; se destaca que la endoterma propia del proceso de fusión del AB desaparece totalmente evidenciando la distribución a nivel molecular del activo en el polímero, demostrando que el complejo es diferente en propiedades fisicoquímicas a la mezcla física, similar a lo ocurrido en estudios previos de sistemas tipo CPE

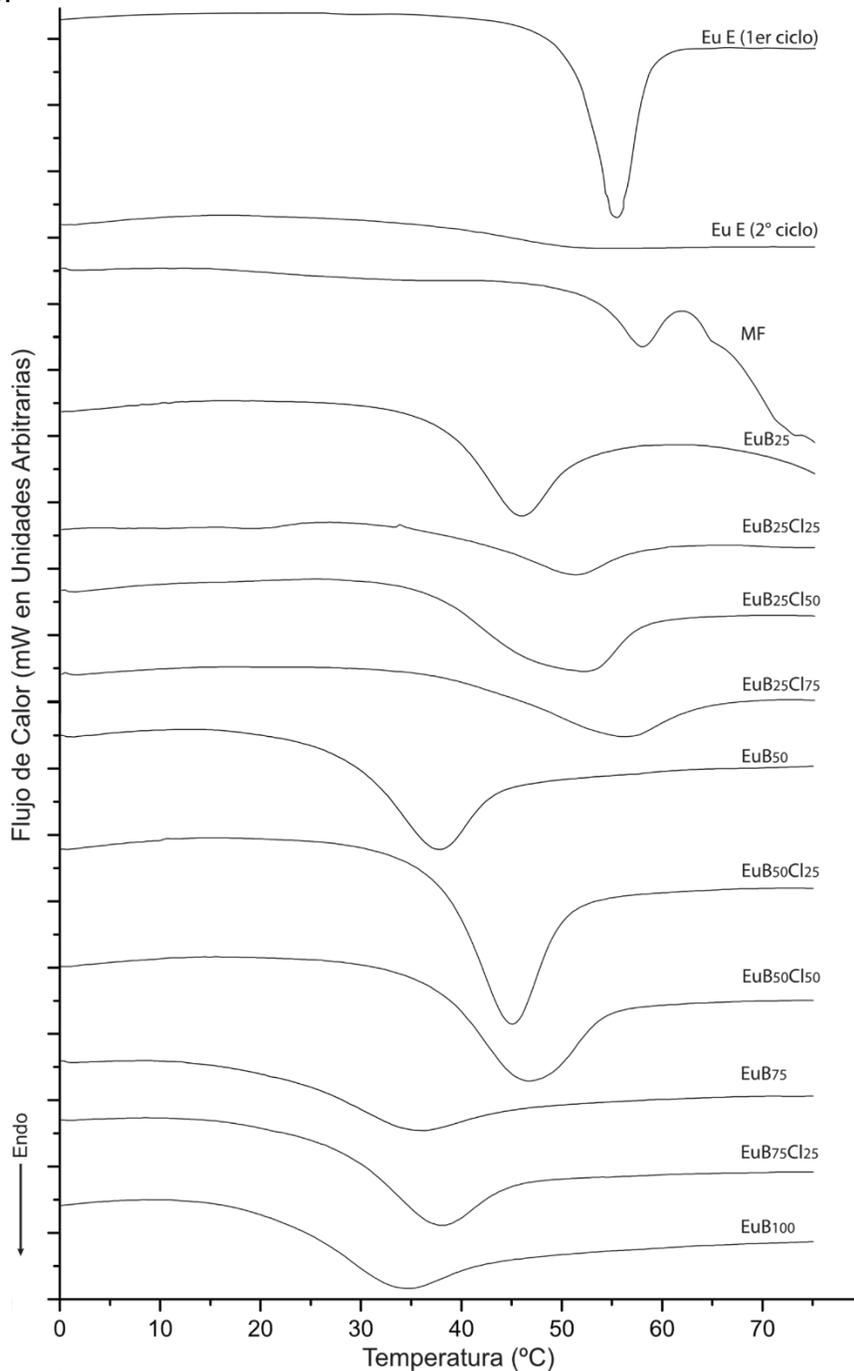
[57,71,143,144,189,190]. Al igual que en los estudios de DRX, este fenómeno también se presenta para algunos sistemas tipo *dispersión sólida* en los que la estructura química del polímero y el activo no cuentan con las características moleculares para la formación de un enlace de tipo iónico [177–179,181,182,191], tales resultados evidencian las desventajas del análisis de calorimetría diferencial de barrido para CPE, ya que permite corroborar la formación de una dispersión molecular entre polímero y activo, así como la existencia de una sola fase, sin embargo, no permiten establecer las interacciones bajo las cuales se rigen. Aunque las técnicas de DRX y DSC cuentan con las limitantes mencionadas, son herramientas complementarias bastante útiles, para el desarrollo de los CPE, puesto que permiten descartar la presencia de dos o más fases en el sistema estudiado.

Para una mejor visualización de los picos endotérmicos relacionados con la temperatura de transición vítrea de cada complejo en la Figura 3-7 se presentan los perfiles de DSC con valores de temperatura en el eje X hasta 75°C, en estos se observa la presencia concomitante de los eventos de relajación y de transición vítrea del polímero de un estado “vidrioso” (glassy) o rígido a uno “cauchoso” (rubbery) o viscoso; a pesar de ello no se consideró procedente determinar la  $T_g$  en un segundo ciclo de análisis térmico ya que, como se mencionó previamente, la formación de los CPE es favorecida con el aumento de temperatura y es probable que un termograma obtenido en un segundo ciclo de calentamiento refleje los procesos que se dieron lugar en el primero y no los resultados asociados a la obtención de cada complejo.

En la Figura 3-7 se observa para cada uno de los complejos el pico correspondiente a la entalpía de relajación, en todos los casos se evidencia un descenso en la línea base después del evento endotérmico, hecho que demuestra el solapamiento de la transición vítrea, proceso que se caracteriza por este cambio en la línea base. Para la determinación del valor de  $T_g$  en cada uno de los termogramas se plantearon dos métodos: el primero consistió en establecer el punto medio y su respectiva temperatura, entre el inicio y fin de cada pico, sin embargo, en algunos de los resultados era muy subjetivo definir el punto en el cual se estabilizaba la línea base, por ello se empleó un segundo método que consistió en calcular la segunda derivada y registrar el valor de temperatura correspondiente al máximo obtenido, vale la pena mencionar que la transición vítrea ocurre en un rango de temperatura estrecho y aunque se reporta un punto definido, el evento suele ocurrir un par

de grados Celsius antes y después de este. En la Tabla 3-3 se resumen los valores de  $T_g$  calculados por el método de la segunda derivada y además se incluye la información de  $T_m$  relacionada con el ácido benzoico.

**Figura 3-7** Termogramas de EuE, MF y los diez complejos en rango de temperatura de 0°C a 75°C.



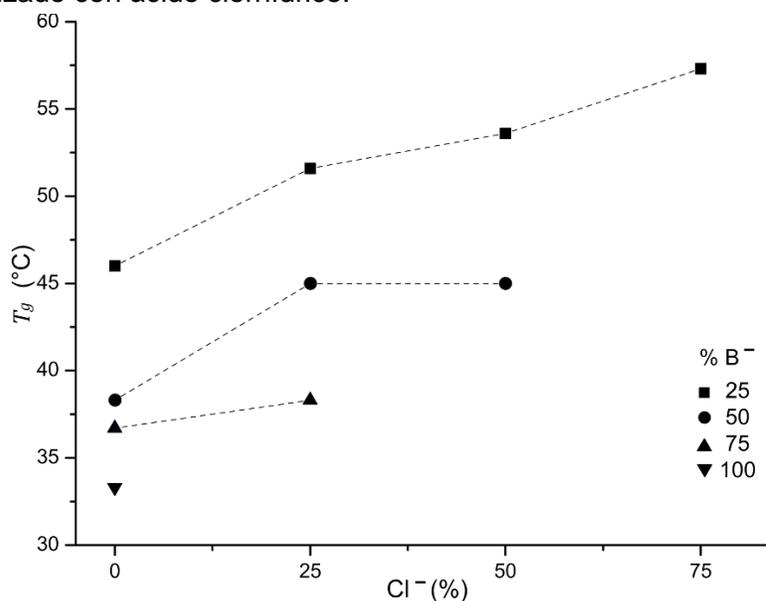
**Tabla 3-3** Valores de  $T_m$  y  $T_g$  asociados a los termogramas obtenidos, para los complejos, compuestos de partida y mezcla física.

	$T_m$ (°C)	$T_g$ (°C)
<b>AB</b>	124,6	--
<b>EuE</b>	--	42,0
<b>Mezcla Física</b>	121,6	58,0
<b>EuB<sub>25</sub></b>	--	46,0
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>25</sub></b>	--	51,6
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>50</sub></b>	--	53,6
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>75</sub></b>	--	57,3
<b>EuB<sub>50</sub></b>	--	38,3
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>25</sub></b>	--	45,0
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub></b>	--	45,0
<b>EuB<sub>75</sub></b>	--	36,7
<b>EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub></b>	--	38,3
<b>EuB<sub>100</sub></b>	--	33,3

$T_m$ : temperatura de fusión y  $T_g$ : temperatura de transición vítrea.

Como tendencia general se observa que el contraión benzoato genera una disminución del valor de la temperatura de transición vítrea, mientras que el contraión cloruro favorece su aumento; para analizar este hallazgo en la Figura 3-8 se graficó el valor de  $T_g$  en función del porcentaje de contraión Cl<sup>-</sup>, para todas las composiciones obtenidas.

**Figura 3-8** Temperaturas de transición vítrea  $T_g$  para los complejos EuB<sub>25</sub>Cl<sub>x</sub>(■), EuB<sub>50</sub>Cl<sub>x</sub>(●), EuB<sub>75</sub>Cl<sub>x</sub>(▲) y EuB<sub>100</sub>(▼). En el eje X se presenta el porcentaje de grupos DMAE neutralizado con ácido clorhídrico.



Para el valor 0 del eje X se presentan los resultados asociados a los cuatro complejos sin neutralización adicional de ácido clorhídrico, sus valores de  $T_g$  disminuyen a medida que aumenta el porcentaje de benzoato en su composición, esta tendencia corresponde a lo reportado en estudios previos, como los presentados en la Tabla 3-4. En ellos se evidencia que la adición de compuestos orgánicos a polímeros reduce el valor de su temperatura de transición vítrea, fenómeno atribuido a la ubicación de las moléculas del compuesto de bajo peso molecular en el polímero y al respectivo aumento del volumen libre, que conlleva a un incremento en la movilidad molecular que afecta la disposición “enredada” o “entanglement” de las cadenas y las fuerzas cohesivas entre ellas, de modo que se requiere una menor transferencia de energía para el paso del material de “vidrioso” a “cauchoso”.

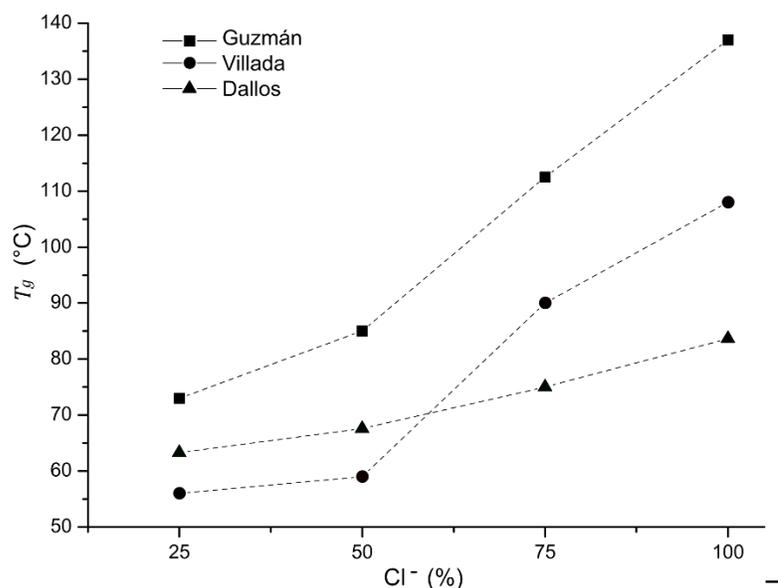
**Tabla 3-4** Estudios relacionados con el efecto de la adición de principios activos en la  $T_g$  de un polímero.

Autores	Año	Sistema Estudiado	Hallazgo
Jenquin M.R y col [192]	1989	Películas de Eudragit RL y RS, con ácido salicílico y clorfeniramina.	Se redujo la $T_g$ hasta en 13°C, fenómeno atribuido al aumento en la movilidad de las cadenas y a la reducción en la tortuosidad de la matriz.
Chuanbin W y McGinity J.W. [193]	1997	Películas de Eudragit RS 30 D, plastificadas con: metilparabeno, ibuprofeno, clorfeniramina o teofilina.	Para las películas preparadas con metilparabeno, ibuprofeno y clorfeniramina se observó la reducción de la $T_g$ , este hecho se relacionó con el debilitamiento de las atracciones intermoleculares del polímero.
Repka M.A y col [194]	1999	Películas de hidroxipropilcelulosa, clorfeniramina y hidrocortisona.	Los dos fármacos modelo exhibieron una reducción de la $T_g$ de las películas obtenidas por extrusión por fusión.
Qi S y col [191]	2008	Eudragit E 100 y acetaminofen	Los sistemas obtenidos por extrusión por fusión fueron plastificados por el activo que redujo la $T_g$ del polímero en hasta 20°C.
Zhang J y col [195]	2011	Dispersión sólida de felodipina en polivinilpirrolidona	Se observó que el valor de $T_g$ disminuyó al aumentar la fracción de peso correspondiente al principio activo; sugieren la miscibilidad de los dos componentes.
Ramirez-Rigo M.V y col	2014	Complejo Eudragit E 100 y enalapril.	A medida que aumentó el porcentaje de los grupos DMAE neutralizado con el activo, el valor de $T_g$ descendió, lo atribuyen a un efecto “plastificante” del activo que reduce las interacciones entre cadenas poliméricas.

Los valores de  $T_g$  presentados en la Figura 3-8 para los complejos restantes indican que la neutralización adicional con ácido clorhídrico genera el efecto opuesto al observado con ácido benzoico, en todos los casos se mantiene o aumenta la temperatura de transición vítrea; este comportamiento ha sido relacionado con el tamaño del contraión, en un estudio de indometacina en estado amorfo [196] se encontró que al aumentar el tamaño del contraión, la fuerza electrostática entre el catión y el grupo carboxilato del principio activo disminuía y a su vez el valor de la  $T_g$ . Para los complejos obtenidos, la neutralización con el ácido inorgánico genera aniones cloruro de bajo tamaño y por tanto con una interacción iónica de mayor fuerza con los grupos DMAE que la generada con los aniones benzoato, tales fuerzas heteromoleculares —de mayor magnitud a las interacciones homomoleculares presentes en el polímero puro— ocasionan un incremento en la densidad del material y reducción del volumen libre, que se reflejan en mayores temperaturas necesarias para superar la transición vítrea.

Para confirmar el efecto del contraión cloruro en la  $T_g$  de los complejos obtenidos se realizó el análisis de DSC a sistemas de EuE preparados bajo la neutralización única con HCl para el 25%, 50%, 75% y 100% de los grupos DMAE del polímero, en la Figura 3-9 se presentan los resultados obtenidos y además se incluyen los datos presentados en dos estudios previos en los que también se obtuvieron los complejos descritos.

**Figura 3-9** Temperaturas de transición vítrea  $T_g$  para los ionómeros  $\text{EuCl}_{(25-100)}$  reportadas por los autores: (■) Guzmán [71], (●) Villada [164] y los obtenidos en el presente estudio (▲) (Dallos).



En los tres estudios se observa el aumento del valor de  $T_g$  a medida que se incrementa el grado de neutralización del polímero con el ácido clorhídrico, pese a ello, hay diferencias de hasta 50°C —EuCl<sub>100</sub>— en los resultados. Villada y col atribuyeron la disminución de sus valores reportados -en comparación con los de Guzmán y col- a la hidrólisis de los grupos DMAE que disminuyen la cantidad de puentes salinos que pueden formar los materiales y sugieren utilizar otra metodología que no promueva la reacción de degradación del polímero, no obstante, en el presente estudio se utilizó la misma metodología empleada por Guzmán y como se demostró en la sección de caracterización por FTIR la hidrólisis de los grupos DMAE también tuvo lugar, por tanto, es muy probable que la reacción de hidrólisis igualmente se diera en los complejos obtenidos por Guzmán y col aunque no haya sido reportado, de modo que la hipótesis planteada por Villada y col para explicar las diferencias en el valor de la  $T_g$  queda descartada.

Cabe señalar que la transición vítrea, bien conocida por representar un “salto” en la capacidad calorífica ( $C_p$ ), es una transición que no va acompañada de una entalpia propia, por ello el fenómeno es similar a una transición termodinámica de segundo orden, pero no es una transición termodinámica verdadera, pues depende del tiempo [185], es así como algunos parámetros de análisis como la velocidad de calentamiento afectan drásticamente el valor de  $T_g$ , de hecho en un estudio desarrollado por Qi Sheng y col [191] se observó un aumento de hasta de 20°C en la temperatura de transición vítrea al pasar de 5°C/min a 100°C/min, dado que una mayor rampa de calentamiento no proporciona el tiempo suficiente para el movimiento de la cadenas poliméricas y desencadena en valores de  $T_g$  mayores. Asimismo la técnica de DSC utilizada, juega un papel fundamental en el estudio de la transición vítrea: en el reporte de Villada y col [164] inicialmente la determinan mediante DSC convencional y obtienen resultados muy similares a los graficados en la Figura 3-9 como “Dallos”, pero cuando reproducen los análisis en DSC modulado obtienen valores de mayor magnitud. En este sentido, puede explicarse las diferencias en los resultados como producto de las divergencias en los análisis, ya sea por la rampa de calentamiento, la técnica de análisis, el número de ciclos calentamiento-enfriamiento, entre otros.

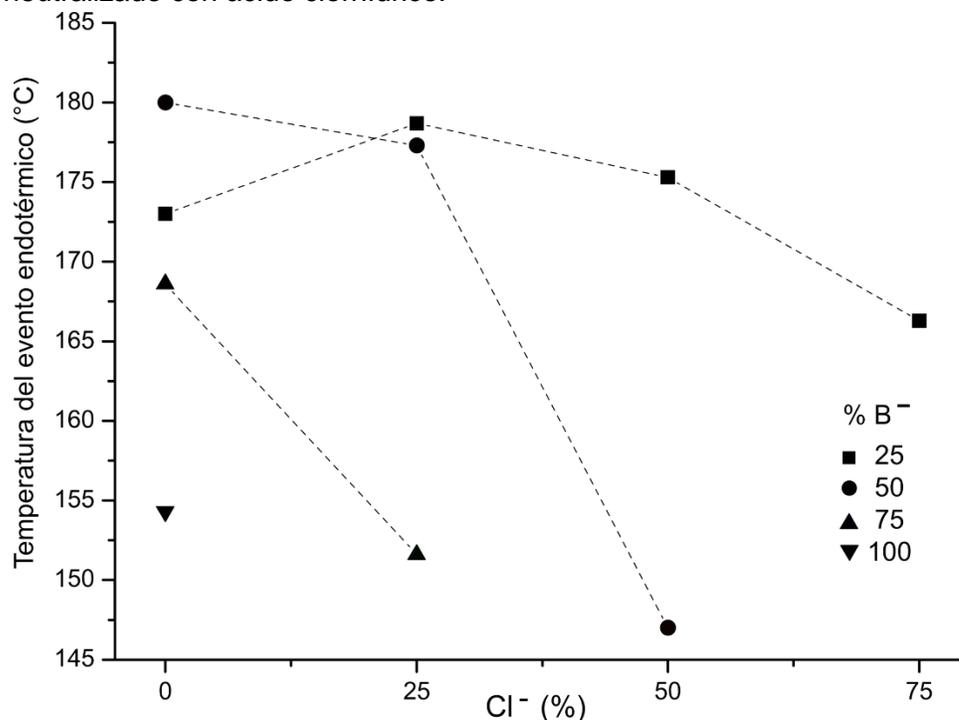
Finalmente, vale la pena señalar una particularidad observada en los termogramas de los complejos obtenidos. En la Figura 3-5 y la Figura 3-6 se presenta un pico endotérmico

hacia la parte final de cada análisis, este pico es menos evidente para aquellos complejos en los que la neutralización de los grupos DMAE fue realizada únicamente con ácido benzoico, pero para los termogramas de los sistemas que contaron con una neutralización adicional de HCl el fenómeno endotérmico ocurrió con una mayor intensidad, tal como se observa para el complejo  $\text{EuB}_{25}\text{Cl}_{75}$  en el que se presenta un pico bien definido y bastante pronunciado. En la Tabla 3-5 se resume la información de temperatura máxima a la que sucede el evento endotérmico descrito y el valor del flujo de calor registrado para tal temperatura, asimismo en la Figura 3-10 se representan tales resultados de temperatura en función de la composición del complejo, a partir de estos se puede afirmar que —con la única excepción del complejo  $\text{EuB}_{25}$  en el que el fenómeno descrito fue casi imperceptible— a mayor porcentaje de neutralización de los grupos DMAE del polímero el evento endotérmico tuvo lugar a una menor temperatura. Generalmente, el evento endotérmico descrito es adjudicado a la presencia de transiciones relacionadas con la mezcla de las diferentes especies del polímero: fracciones de cadena corta, cadenas largas, secciones entrecruzadas, entre otros [145]; en este sentido es posible que la hidrólisis del polímero descrita en el capítulo anterior de lugar a las especies químicas mencionadas y por ello el pico endotérmico es de mayor intensidad cuando hay una mayor cantidad de ácido clorhídrico involucrado en el proceso de obtención del complejo. Pese a ello, es viable que el fenómeno endotérmico esté relacionado con otra reacción de degradación del polímero como la ciclación; en estudios previos [162,197] se ha reportado para el EuE la formación de un anhídrido cíclico de seis miembros inducido térmicamente a temperaturas superiores a los  $180^{\circ}\text{C}$ , en la Figura 3-11 se presenta la reacción.

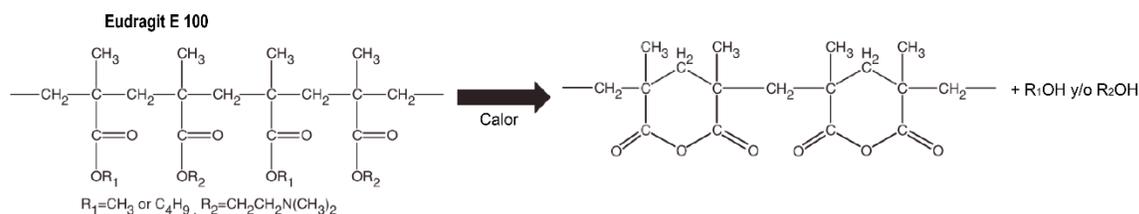
**Tabla 3-5** Valores de temperatura y flujo de calor asociados al evento endotérmico presente en la parte final de los termogramas.

	Temperatura del evento endotérmico ( $^{\circ}\text{C}$ )	Flujo de calor asociado (mW)
<b>EuB<sub>25</sub></b>	173,0	-2,26
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>25</sub></b>	178,7	-4,41
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>50</sub></b>	175,3	-9,09
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>75</sub></b>	166,3	-69,77
<b>EuB<sub>50</sub></b>	180,0	-2,73
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>25</sub></b>	177,3	-7,45
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub></b>	147,0	-12,06
<b>EuB<sub>75</sub></b>	168,6	-4,41
<b>EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub></b>	151,6	-5,75
<b>EuB<sub>100</sub></b>	154,3	-3,28

**Figura 3-10** Temperaturas del evento endotérmico para los complejos  $\text{EuB}_{25}\text{Cl}_x$ (■),  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_x$ (●),  $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_x$ (▲) y  $\text{EuB}_{100}$ (▼). En el eje X se presenta el porcentaje de grupos DMAE neutralizado con ácido clorhídrico.



**Figura 3-11.** Formación del anhídrido cíclico de seis miembros en Eudragit® E 100.

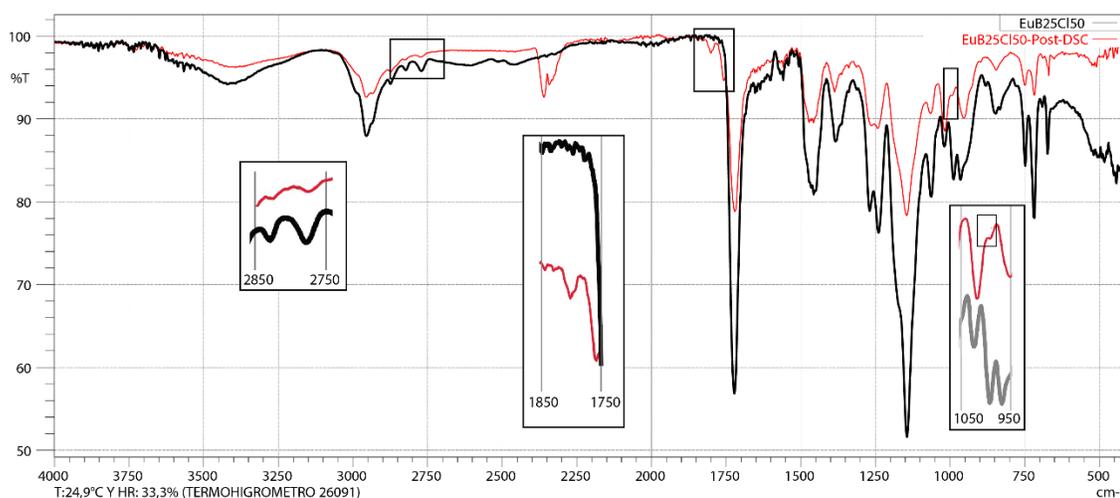


Fuente: Adaptado de Shan-Yang Lin, 2011 [197]

La reacción intramolecular reportada en los estudios de Lin S.Y y *col* ocurre vía condensación de ésteres sin adición de ningún iniciador o catalizador, únicamente requiere del proceso de calentamiento; su hallazgo fue realizado en un equipo de micro espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier acoplado a calorimetría diferencial de barrido (FTIR/DSC) y consistió en el rastreo de la desaparición de las bandas de infrarrojo de los grupos de DMAE y la aparición de bandas en  $1801 \text{ cm}^{-1}$  y  $1763 \text{ cm}^{-1}$  asociadas al grupo carbonilo y de la banda  $1007 \text{ cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento asimétrico C-O-C, todas ubicadas a la longitud de onda característica de compuestos anhídridos. El mecanismo de reacción bajo el cual se rige aún no ha sido caracterizado,

sin embargo, por tratarse de un proceso mediado por calor es bastante probable que la reacción sea favorecida si los sustituyentes  $R_1$  y  $R_2$  de la estructura del EuE son de menor tamaño, es decir para los complejos en los que se demostró mediante FTIR un mayor grado de hidrólisis y en los que algunos de los sustituyentes  $R_1$  y  $R_2$  han sido reemplazados por el grupo  $-OH$ . Para corroborar esta teoría se realizó el análisis de infrarrojo luego de realizado el estudio de DSC para las muestras de los complejos  $\text{EuB}_{25}\text{Cl}_{25}$ ,  $\text{EuB}_{25}\text{Cl}_{50}$  y  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{25}$ . La selección de estos complejos obedeció a la necesidad de rastrear las bandas en  $2822\text{ cm}^{-1}$  y  $2770\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a DMAE, pues en el espectro inicial de FTIR de estos complejos aún se observan estas bandas ya que en su composición no se realiza la neutralización del cien por ciento de los grupos protonables del polímero. El espectro de FTIR de los tres complejos arrojó resultados muy semejantes. En la Figura 3-12 se presentan los resultados para  $\text{EuB}_{25}\text{Cl}_{50}$ , en este se observan los cambios relacionados con la formación del anhídrido cíclico: por un lado, se desvanecen las bandas del DMAE y por otro aparecen aquellas en  $1801\text{ cm}^{-1}$ ,  $1757\text{ cm}^{-1}$  y  $996\text{ cm}^{-1}$ . En este sentido es posible adjudicar el evento endotérmico observado en la parte final de cada termograma a la reacción de ciclación intramolecular, que se favorece para aquellas composiciones en las que ha ocurrido el proceso de hidrólisis, de allí que los complejos con mayor porcentaje de grupos cloruros como contraión presentan el evento a una menor temperatura y con una mayor intensidad.

**Figura 3-12** Comparación del espectro de FTIR para el complejo  $\text{EuB}_{25}\text{Cl}_{50}$  antes y después del análisis de DSC.



### iii. Solubilidad

La solubilidad es definida en términos cuantitativos como la concentración de soluto en una solución saturada a una temperatura dada, o en términos cualitativos: la interacción espontánea de dos o más sustancias para formar una dispersión molecular homogénea [198]. Es una propiedad física de especial importancia para el desarrollo de formulaciones farmacéuticas, pese a ello, para los CPE y para dispersiones sólidas de PE no hay una técnica estandarizada para su medición, en gran parte debido a las complicaciones relacionadas con la alta viscosidad de los polímeros que dificultan alcanzar el equilibrio de solubilidad [199]. Por esto, es bastante común que los estudios de este tipo de sistemas omitan la determinación de la misma y hagan directamente una evaluación de desempeño ya sea de liberación o de disolución; en la mayoría de estas investigaciones llegan a conclusiones indirectas de la solubilidad del sistema a partir de estos resultados de desempeño [71,189,200–205].

En otros de los estudios reportados para este tipo de sistemas [175,193,206–209] se observa que la evaluación de solubilidad se realiza desde otro enfoque, en el que buscan establecer la cantidad máxima del principio activo que es compatible con el polímero, para ello adicionan cantidad en exceso del fármaco a dispersiones acuosas del PE ionizado y luego de alcanzar el estado de equilibrio cuantifican el activo en el sobrenadante. En la presente investigación no se determinó este tipo de solubilidad ya que la composición de los complejos obtenidos se fijó desde el inicio y en función de los grupos protonables de EuE, en ningún caso se adicionó el contraión en una proporción superior al 100% de estos, lo anterior porque se pretende estudiar principalmente la interacción de tipo iónico entre polímero - activo y la adición de ácido benzoico en cantidad superior a esta favorece su acumulación en fases pseudohidrofóbicas que se pueden formar en los grupos alquilo esterificados de la cadena del polímero.

Para la determinación de solubilidad de los complejos obtenidos se siguieron las tres metodologías descritas en la metodología:

#### A. Método tradicional.

Para esta se encontraron algunas dificultades, la primera relacionada con el peso de soluto a adicionar en exceso, en parte porque pocas referencias realizan esta determinación de

solubilidad [142,177,179,210], además porque la cantidad en exceso depende de la naturaleza química del CPE y su interacción con las moléculas de agua. Sin embargo, se realizó el análisis considerando las condiciones del estudio (entre los cuatro referenciados), en el cual agregaron una mayor cantidad de complejo para alcanzar el exceso, que fue de un gramo de CPE para diez mililitros de agua [177]. Contrario a lo esperado se observó –para las diez composiciones estudiadas– que luego de alcanzar el equilibrio no quedaba exceso de sólido en el tubo de ensayo y que todo el peso adicionado se incorporaba en la fase líquida, por ello se pasó a una segunda fase en la cual se hizo la adición de 2 gramos de muestra para los 10 ml de solvente, pero se presentaron problemas en la homogenización del sólido en el medio debido a que el peso seleccionado era bastante voluminoso y el solvente solo interactuaba con las zonas de contacto, causando un efecto de “bola”, el cual a pesar de la agitación mecánica no fue superado aún pasadas las 24 horas.

En vista de estos inconvenientes y de la imposibilidad de realizar una jerarquización de los resultados de solubilidad para cada uno de los diez complejos, se decidió proceder con las siguientes metodologías.

#### *B. Determinación cualitativa*

##### *Etapas I*

La solubilidad puede expresarse en diferentes modos, la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) hace una clasificación en siete categorías que van desde “Prácticamente insoluble” hasta “Muy soluble”, cada una descrita en términos de “partes de solvente requeridos para disolver una parte de soluto” [168]. Con el fin de establecer si los diez complejos entraban en la categoría de “soluble” según lo indicado en la USP, es decir “requiere de 10 a 30 partes de solvente por una parte de soluto” se estudiaron las dispersiones de cada complejo a concentración aproximada de 33 miligramos de CPE por mililitro, una vez alcanzado el equilibrio, a las 24 horas, se observó para todos los complejos apariencia traslúcida y sin presencia de sólido; por tanto bajo la clasificación de la USP los diez complejos obtenidos son solubles.

**Etapa II**

Los polielectrolitos normalmente poseen grupos polares que interactúan con las moléculas de agua, sin embargo, su comportamiento es controlado principalmente por el pH del medio y la fuerza iónica. El EuE cuenta con  $pK_a$  entre 7,0 y 7,3 [211], por tanto es soluble a pH ácido ya que favorece la protonación de los grupos amino, que se repelen y facilitan la interacción del polímero con las moléculas de solvente; a condiciones de pH alcalinas no hay repulsión entre cadenas y como resultado se da un proceso de agregación que conlleva a una disminución en la solubilidad del PE [25]. Dada la importancia del pH se realizó su medición, para las dispersiones de los diez complejos al 0,5% de EuE; se eligió esta concentración porque los análisis de constante de afinidad, desplazamiento de AB y potencial electrocinético suelen ser evaluados a este valor [212]. Para todos los casos se observó que los solutos eran solubles, puesto que estaban a una concentración menor que la evaluada en la sección anterior. En la Tabla 3-6 se presenta la concentración de complejo en la dispersión y los valores de pH, además se incluyó la concentración de AB calculada según proporción estequiométrica para cada complejo y el valor de la solubilidad de AB calculada al pH que registró cada dispersión.

**Tabla 3-6** Estudio de la solubilidad y pH para los diez complejos en dispersión al 0,5% de EuE

	[CPE] mg/ml	¿Soluble?	pH	[AB] <sup>a</sup> mg/ml	[AB] <sup>b</sup> mg/ml
<b>EuB<sub>25</sub></b>	5,46	Sí	6,39 (0,44)	0,46	530,00
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>25</sub></b>	5,60	Sí	6,17 (0,65)	0,46	323,15
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>50</sub></b>	5,73	Sí	5,84 (0,59)	0,46	151,82
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>75</sub></b>	5,87	Sí	4,82 (0,32)	0,46	17,68
<b>EuB<sub>50</sub></b>	5,92	Sí	6,18 (0,41)	0,92	325,61
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>25</sub></b>	6,06	Sí	5,71 (0,36)	0,92	112,58
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub></b>	6,19	Sí	4,95 (0,53)	0,92	22,52
<b>EuB<sub>75</sub></b>	6,38	Sí	5,80 (0,61)	1,38	137,72
<b>EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub></b>	6,52	Sí	5,05 (0,41)	1,38	27,29
<b>EuB<sub>100</sub></b>	6,84	Sí	5,20 (0,84)	1,84	37,40

Entre paréntesis: valores de coeficiente de variación (CV).

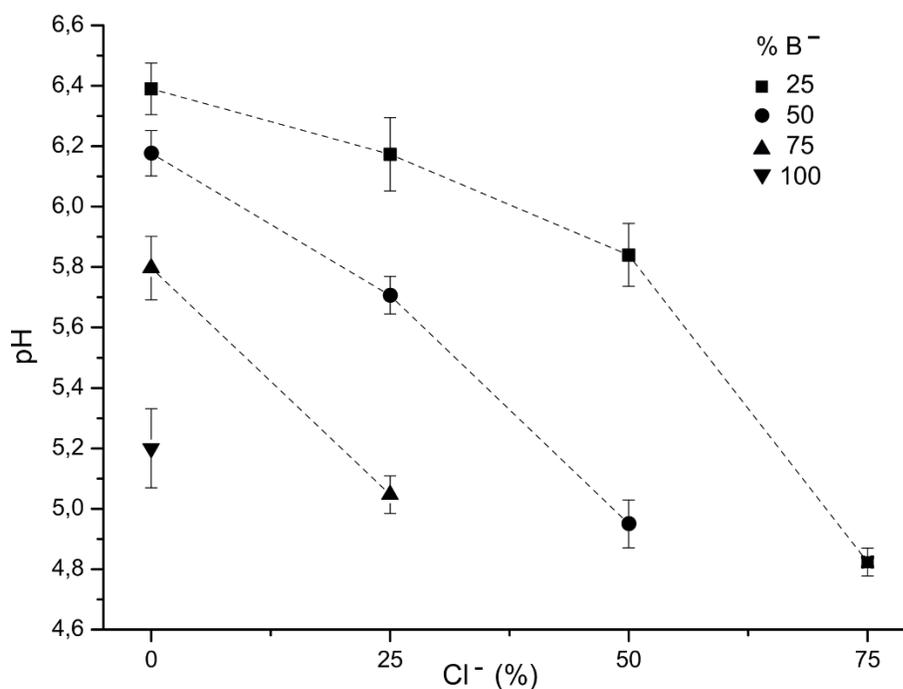
<sup>a</sup> Concentración estequiométrica de AB en la dispersión al 0,5% de EuE

<sup>b</sup> Solubilidad en agua de AB al pH medido para cada dispersión.

Se encontró que la tendencia de los resultados de pH fue la esperada: a mayor porcentaje de neutralización del contraión, más bajo el valor. En la Figura 3-13 se presentan de

manera gráfica los resultados. Para el valor del eje X en cero, se observan los datos de los cuatro complejos sin neutralización adicional de ácido clorhídrico, los cuales cumplen con la tendencia mencionada y demuestran la presencia del contraión, pues a mayor porcentaje de ácido benzoico menor fue el valor de pH, del mismo modo se presentó una reducción debido a la neutralización adicional con el ácido inorgánico, esta fue proporcional a su porcentaje en la composición del complejo. En la figura también se observa una tendencia a que los complejos con un mismo porcentaje de neutralización total de los grupos DMAE cuenten con valores de pH semejantes, por ejemplo, para el grupo “EuB<sub>50</sub> y EuB<sub>25</sub>Cl<sub>25</sub>” o entre los complejos “EuB<sub>75</sub>, EuB<sub>50</sub>Cl<sub>25</sub> y EuB<sub>25</sub>Cl<sub>50</sub>”, indicando para estos CPE que la neutralización con un ácido fuerte o un ácido débil no tiene incidencia, debido a que la magnitud de iones hidronio que se ceden al medio es similar. Para aquellos con el 100% de los grupos protonables del EuE neutralizados, se presenta un ligero efecto de disminución de pH a mayor adición de ácido clorhídrico en su obtención muy probablemente debido a que se trata de un ácido fuerte y es posible que a mayor porcentaje de este, las diferencias sean más evidentes.

**Figura 3-13** Valores de pH promedio de las dispersiones acuosas de los complejos EuB<sub>25</sub>Cl<sub>x</sub>(■), EuB<sub>50</sub>Cl<sub>x</sub>(●), EuB<sub>75</sub>Cl<sub>x</sub>(▲) y EuB<sub>100</sub>(▼), a concentración de 0,5% de EuE. En el eje X se presenta el porcentaje de grupos DMAE neutralizado con ácido clorhídrico.



Aprovechando la determinación de pH de las dispersiones de los complejos, se realizó un análisis de los resultados de solubilidad habitualmente incluido para este tipo de estudios, que consiste en comparar la concentración del activo en la dispersión preparada y en la solubilidad acuosa calculada al pH registrado para la dispersión. Los resultados se presentan en la Tabla 3-6, en estos se observa que para ninguno de los casos la cantidad de AB solubilizada por el complejo polielectrolito fue superior a la correspondiente de la solubilidad, mientras que, para los estudios previos [2,43,142,212,213], este tipo de análisis demostró capacidad para solubilizar un fármaco hasta en 1498 veces [142]; este hecho es debido a las diferencias en la solubilidad de los principios activos en agua, pues para la mayoría de las moléculas de los reportes el valor está en el orden de  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  mg/ml, mientras que la solubilidad de AB en agua a 25°C es de 3,4 mg/ml [80], asimismo, el pH de las dispersiones es bastante diferente, mientras que los registrados en la presente investigación oscilan entre 4,8 y 6,4 los reportados, por ejemplo, por Quinteros D.A. [212] para la misma concentración de PE no superan el valor de 4,8, en este sentido, el pH de las dispersiones no dista mucho del valor del  $pK_a$  de los fármacos y el efecto de la solubilidad de la molécula disociada no tiene mayor impacto en el resultado; sin embargo para los fines del presente estudio este hallazgo no es crítico.

En otros estudios también se encontró un efecto de disminución de la solubilidad del principio activo [145,190], en ellos se adjudicó este hecho a un efecto de salting-out debido al aumento de concentración de los solutos y a una mayor competencia por el solvente, también a la posible formación de otro tipo de complejos fármaco-polímero menos solubles.

### Etapa III

Debido a la necesidad de evaluar el desempeño de los complejos polielectrolitos como agentes antimicóticos a valores de pH superiores al  $pK_a$  del ácido benzoico, se realizó un análisis cualitativo de solubilidad utilizando diferentes soluciones reguladoras de pH (buffer de fosfatos a las concentraciones indicadas por la USP [168]) como solvente, para ello se prepararon dispersiones de los complejos al 0,6 % de ácido benzoico, concentración elegida por ser superior a los típicos valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) del ácido benzoico frente a levaduras y hongos filamentosos [67] y a la cual se espera observar el efecto antimicótico. En la Tabla 3-7 se presentan los resultados relacionados.

**Tabla 3-7** Solubilidad cualitativa de los diez complejos a concentración de 0,6 % de AB, en buffer de fosfatos a diferentes valores de pH.

	[CPE] mg/ml	5,8	6,0	6,3	6,6	6,9	7,2	7,6	8,0
<b>EuB<sub>25</sub></b>	71,2	S	S	S	S	S	S	S	P
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>25</sub></b>	73,0	S	S	S	S	S	S	S	P
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>50</sub></b>	74,8	S	S	S	S	S	S	S	P
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>75</sub></b>	76,6	S	S	S	S	S	S	S	P
<b>EuB<sub>50</sub></b>	38,7	S	S	S	S	S	S	S	P
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>25</sub></b>	39,6	S	S	S	S	S	S	S	P
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub></b>	40,5	S	S	S	S	S	S	S	P
<b>EuB<sub>75</sub></b>	27,8	S	S	S	S	S	S	S	P
<b>EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub></b>	28,4	S	S	S	S	S	S	S	P
<b>EuB<sub>100</sub></b>	22,3	S	S	S	S	S	S	S	P

S: Soluble; P: Parcialmente soluble.

Los resultados presentados suponen una mayor compatibilidad del polielectrolito EuE a condiciones de pH ligeramente alcalinas como consecuencia del proceso de complejación, sin embargo, al finalizar el ensayo, se realizó una verificación de pH y se encontró que el valor había disminuido en todos los casos, es decir que la capacidad amortiguadora de las soluciones buffer no había sido suficiente para regular el pH. Teniendo en cuenta los diferentes equilibrios que tienen lugar en la dispersión y con el objetivo de no incrementar el número de variables del estudio, se repitió el ensayo sin incluir soluciones buffer como solvente, en cambio se realizó el análisis en agua con ajuste de pH, utilizando para ello solución de hidróxido de sodio. En la Tabla 3-8 se incluyen los resultados de esta prueba, se observa para todos los complejos un comportamiento similar en el cual las dispersiones contaron con apariencia traslúcida hasta pH 6,9. Estos resultados indican que la formación del complejo favorece la solubilidad del PE a condiciones de pH superiores a las que se han reportado para el polímero sin complejar, ya que el EuE sólo es soluble en agua a valores de pH inferiores a 5 [69]. Este comportamiento de solubilidad de los complejos puede ser explicado por la presencia de los contraiones benzoato o cloruro que se encuentran unidos de forma iónica a los grupos ionizables DMAE del EuE y que podrían actuar como barrera, impidiendo que los grupos hidroxilo provenientes de la solución de NaOH neutralicen la carga del PE, además debe tenerse en cuenta que el comportamiento de CPE es diferente al de sus precursores y que no corresponde a la suma de propiedades de cada uno de ellos.

**Tabla 3-8** Solubilidad cualitativa de los diez complejos a concentración de 0,6 % de AB en agua, a diferentes valores de pH.

	[CPE] mg/ml	5,8	6,0	6,3	6,6	6,9	7,2
<b>EuB<sub>25</sub></b>	71,2	S	S	S	S	S	I
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>25</sub></b>	73,0	S	S	S	S	S	I
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>50</sub></b>	74,8	S	S	S	S	S	I
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>75</sub></b>	76,6	S	S	S	S	S	I
<b>EuB<sub>50</sub></b>	38,7	S	S	S	S	S	I
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>25</sub></b>	39,6	S	S	S	S	S	I
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub></b>	40,5	S	S	S	S	S	I
<b>EuB<sub>75</sub></b>	27,8	S	S	S	S	S	I
<b>EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub></b>	28,4	S	S	S	S	S	I
<b>EuB<sub>100</sub></b>	22,3	S	S	S	S	S	I

S: Soluble; I: Insoluble.

### C. Cantidad máxima de complejo aceptada en agua

Esta última metodología desarrollada para el estudio de la solubilidad de los complejos, surgió de la necesidad de evidenciar las diferencias existentes entre las diez composiciones obtenidas, ya que a las condiciones que se reportaron para la sección anterior “solubilidad cualitativa” todos los complejos arrojaron los mismos resultados en términos de “soluble”, “parcialmente soluble” o “insoluble”.

Este ensayo no es propiamente una determinación de solubilidad y cuenta con algunas limitantes, ya que por ejemplo no contempla el volumen de desplazamiento generado por la adición del sólido, sin embargo, otros estudios como el de Oriente I. [208] han utilizado metodologías semejantes basadas en el principio de adición sucesiva del sólido y evaluación de la saturación, opción que cobra relevancia al considerar la naturaleza de los complejos evaluados, pues se trata de sistemas tipo polielectrolito que debido a su composición tienen la capacidad de establecer diferentes tipos de interacción, eventos que indudablemente requieren de un lapso de tiempo determinado para alcanzar el equilibrio, de hecho para algunos de los ensayos de solubilidad cualitativa realizados a los complejos con menor porcentaje de contracción –como EuB<sub>25</sub>, EuB<sub>25</sub>Cl<sub>25</sub> y EuB<sub>50</sub>– se observó que una vez preparada la dispersión su apariencia era turbia, sin embargo a las 24 horas era totalmente traslúcida. En la Tabla 3-9 se presentan los resultados de la máxima cantidad

de complejo aceptada por mililitro de agua y la concentración de ácido benzoico equivalente, calculada por estequiometría.

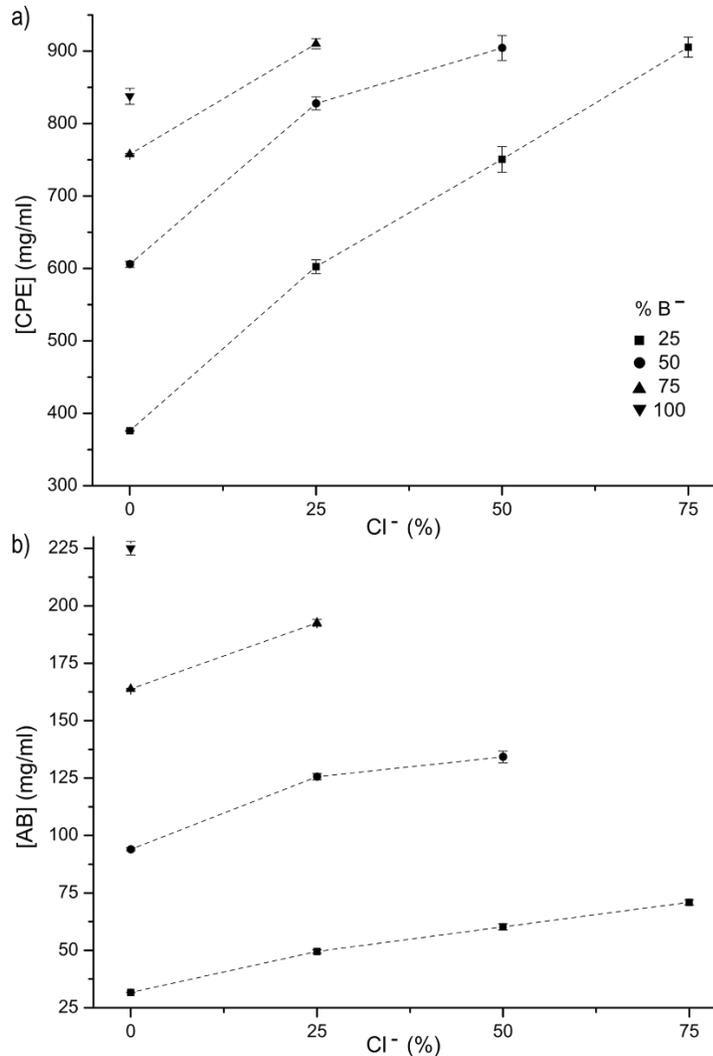
**Tabla 3-9** Cantidad máxima de complejo aceptada en agua.

	[CPE] mg/ml	[AB] mg/ml	[AB] %
<b>EuB<sub>25</sub></b>	375,8 (0,1)	31,7	3,2
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>25</sub></b>	602,5 (0,5)	49,5	5,0
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>50</sub></b>	750,6 (0,8)	60,2	6,0
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>75</sub></b>	905,5 (0,5)	70,9	7,1
<b>EuB<sub>50</sub></b>	605,7 (0,2)	94,0	9,4
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>25</sub></b>	827,8 (0,4)	125,6	12,6
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub></b>	904,5 (0,6)	134,2	13,4
<b>EuB<sub>75</sub></b>	757,8 (0,1)	163,8	16,4
<b>EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub></b>	910,2 (0,3)	192,6	19,3
<b>EuB<sub>100</sub></b>	837,8 (0,4)	225,1	22,5

Entre paréntesis valores de coeficiente de variación (CV).

Para analizar el efecto de la composición en este ensayo se realizó la Figura 3-14 con las secciones: **a)** para los datos en términos de concentración de complejo polielectrolito y **b)** para ácido benzoico. Los resultados de la primera sección mantienen una tendencia semejante a los reportados para pH (**Figura 3-13**) evidenciando el efecto de este en la solubilidad de los complejos en agua, pues aquellos con valores de pH más bajos presentaron los datos de concentración más altos y viceversa, también se observó que los CPE con un mismo porcentaje total de neutralización de los grupos DMAE contaban con resultados similares. Por medio de esta metodología indirecta de solubilidad es posible establecer que la compatibilidad de los complejos con el solvente agua está directamente relacionada con la solubilidad del polímero EuE y por ello aquellas composiciones que favorecen un pH ácido son las mismas con las cantidades mayores de complejo aceptadas en agua.

**Figura 3-14** Cantidad de **a)** complejo y **b)** ácido benzoico, por mililitro de agua para  $\text{EuB}_{25}\text{Cl}_x$  (■),  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_x$  (●),  $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_x$  (▲) y  $\text{EuB}_{100}$  (▼). En el eje X se presenta el porcentaje de grupos DMAE neutralizado con ácido clorhídrico.



En la sección b) de la figura se presentan los resultados del mismo ensayo desde una perspectiva interesante, pues más allá de establecer cuáles son los CPE más solubles en agua, es de suma importancia conocer cuáles son las composiciones que permiten una mayor carga o solubilización del activo. Si se tiene en cuenta los resultados ubicados en el valor cero del eje X ( $\text{EuB}_{25}$ ,  $\text{EuB}_{50}$ ,  $\text{EuB}_{75}$  y  $\text{EuB}_{100}$ ) se observa que a mayor porcentaje de AB en la composición del complejo, más alta es la cantidad solubilizada, de hecho,  $\text{EuB}_{100}$  fue el que permitió alcanzar una mayor de concentración de AB, puesto que para una misma cantidad de complejo es el que cuenta con más activo. Asimismo se observa

que la neutralización adicional con ácido clorhídrico genera un efecto positivo en los resultados, a medida que se incrementó la presencia del contraión cloruro también aumentó la concentración de benzoico, evidenciando el efecto del descenso de pH en la solubilidad del complejo como se había explicado para la primera sección; en la obtención de CPE entre EuE y fármacos aniónicos es bastante común la adición de un contraión inorgánico –como el cloruro– para obtener dispersiones acuosas traslúcidas e incrementar su compatibilidad con agua [2,142,212]. Llama la atención el efecto del *porcentaje de AB presente en la composición del complejo* en su solubilización, pues EuB<sub>25</sub>Cl<sub>75</sub> fue uno de los más “solubles” en términos de cantidad de complejo por mililitro de agua, sin embargo, para la concentración de AB no mantuvo esta tendencia, incluso EuB<sub>100</sub> lo superó en más de tres veces. Lo anterior sugiere que un mayor contenido del preservante en la composición del complejo favorece su solubilización.

A partir de los resultados registrados para las tres metodologías se encuentra que los complejos obtenidos cuentan con características de solubilidad favorables para el desarrollo de los análisis posteriores, incluso para el CPE con el porcentaje más bajo de neutralización de los grupos DMAE -EuB<sub>25</sub>. Resultado de gran interés si se tiene en cuenta que algunos complejos de composición similar como los obtenidos por Guzmán y *col* [71] para el principio activo fosfato de dexametasona (EuE100-Cl<sub>(25)</sub>DP<sub>(75)</sub> y EuE100-DP<sub>(25)</sub>) fueron muy poco solubles en agua a baja concentración del CPE (1% o 10 mg/ml).

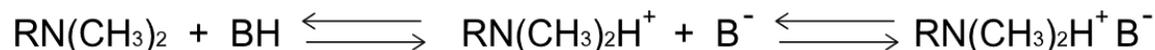
Finalmente, vale la pena mencionar algunas de las ventajas que supone la complejación de principios activos con polielectrolitos en lo que respecta a la solubilidad, pues mediante el uso de esta sencilla estrategia es posible hacer una reducción del tamaño de partícula hasta el nivel molecular, maximizar el área de superficie del compuesto que va en contacto con el solvente y asegurar la estabilización del estado amorfo del IFA, evitando su cristalización [199,210,214].

#### **iv. Distribución de especies y constante de afinidad.**

La interacción entre polielectrolitos de carácter básico y moléculas de naturaleza ácida conlleva a la condensación de pares iónicos, reacción gobernada por los equilibrios involucrados entre precursores y productos. En la Figura 3-15 se observa este fenómeno para los complejos en estudio, donde *RN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>* representa al Eudragit E y *BH* al ácido

benzoico en sus especies no disociadas, asimismo  $RN(CH_3)_2H^+$  equivale al PE protonado,  $B^-$  al activo disociado y  $RN(CH_3)_2H^+B^-$  al par iónico.

**Figura 3-15** Equilibrios asociados a la obtención de CPE entre EuE y AB.



La caracterización de la reacción se realiza mediante la determinación de la distribución de las especies en el equilibrio y de la constante de afinidad de condensación iónica “ $K_{cc}$ ”, (por sus siglas en inglés: “counterionic condensation”). Esta última es una medida cuantitativa de la formación del par iónico y para el equilibrio de la Figura 3-15 corresponde a la Ecuación 3-2, con unidades de  $M^{-1} (l \cdot mol^{-1})$ .

$$K_{cc} = \frac{[RN(CH_3)_2H^+B^-]}{[RN(CH_3)_2][BH]} \quad (3-2)$$

Metodologías como ultrafiltración, espectroscopía RMN, diálisis y extracción con solventes orgánicos han sido utilizadas para la determinación de la distribución de especies y  $K_{cc}$  [154], siendo las dos últimas las más reportadas en la actualidad. La técnica mediante extracción está basada en el estudio del coeficiente de reparto de una dispersión acuosa del complejo en un solvente orgánico y consiste en la separación del fármaco/activo no disociado en el solvente apolar [215], la metodología de diálisis, por su parte, estudia el equilibrio de la dispersión acuosa de complejo separada de un compartimento receptor de agua a través de una membrana semipermeable que impide la difusión del polímero. En la Tabla 3-10 se presentan a manera de ejemplo algunas de las investigaciones de CPE en las que se realizó la caracterización de los equilibrios asociados a la obtención del par iónico, en esta se observa que a partir del estudio de Battistini y *col*, 2014 [158], en el que se puso a punto la metodología de diálisis, su elección ha sido de mayor preferencia, debido a algunas ventajas como la posibilidad de realizar el análisis a moléculas con poca lipofilicidad; de hecho en el reporte de Palena M.C [189] no se realizó el estudio para ácido benzoico ni ácido salicílico debido a su alta hidrofiliicidad. Otra ventaja de la metodología de diálisis es que se lleva a cabo totalmente en medio acuoso, esto garantiza que la unión PE-activo no sea alterada por otro tipo de interacciones que se favorecen en solventes apolares y que pueden modificar la conformación estructural del complejo en la interfase, por ejemplo para los CPE con ADN como PE el contacto de la macromolécula con

solventes orgánicos causa su desnaturalización [213]. Cabe destacar que el uso de membranas de diálisis para la caracterización de la interacción entre macromoléculas y fármacos no es reciente, los primeros estudios datan de 1950 [216,217] y fueron de gran importancia para el desarrollo de CPE.

En cuanto a los valores de  $K_{cc}$  de la Tabla 3-10 se observan que la mayoría son bastante altos, incluso del orden de  $10^{14} \text{ M}^{-1}$  [72] demostrando la gran afinidad entre precursores del complejo. Destaca el hecho que los reportes de sistemas con PE básicos no acostumbran a determinar la constante de afinidad, mientras que los PE ácidos siempre lo hacen.

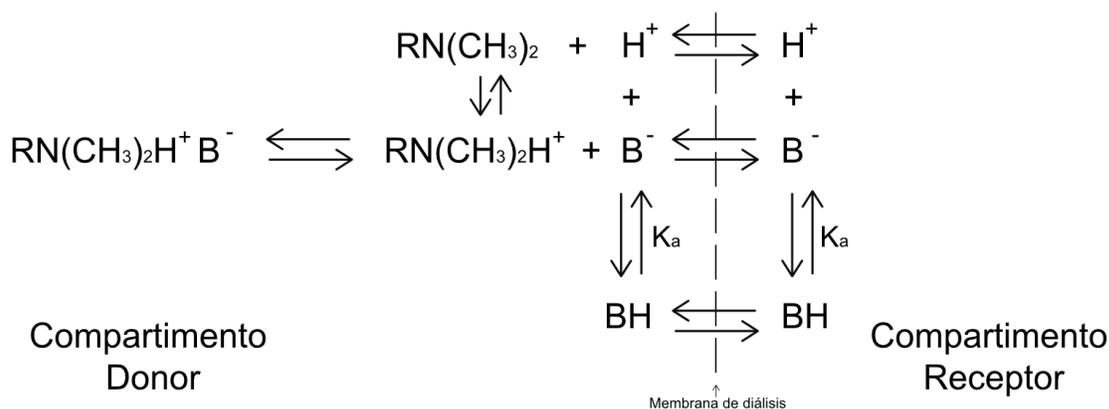
**Tabla 3-10.** Estudios de CPE relacionados con la determinación de la distribución de especies en el equilibrio y el cálculo de la constante de afinidad de condensación iónica.

Autores	Año	Sistema estudiado	Metodología	¿D.E.?	¿ $K_{cc}$ ?	Valores Log $K_{cc}$
Jimenez A.F [215]	2004	Carbómero (PE ácido) Lidocaína, metoclopramida y procaína.	Extracción con solventes orgánicos	Sí	Sí	3 a 9
Ramirez M.V y col [218]	2004	Carboximetilcelulosa (PE ácido) y nueve fármacos básicos.	Otra*	Sí	Sí	5 a 8
Quinteros D. A y col [2]	2008	EuE (PE básico) y siete activos ácidos.	Extracción con solventes orgánicos	Sí	No	No aplica
Arduso M.S y col [141]	2010	Carbómero, Eudragit L y Eudragit S (PE ácidos) y lidocaína, atenolol y metoclopramida.	Extracción con solventes orgánicos	Sí	Sí	3 a 5
Quinteros D. A y col [212]	2012	EuE (PE básico) y cinco fármacos ácidos.	Extracción con solventes orgánicos	Sí	No	No aplica
Battistini F. D. y col [219]	2013	Ácido hialurónico (PE ácido) y los activos: atenolol, propranolol y lidocaína.	Extracción con solventes orgánicos	Sí	Sí	4 a 6
Quinteros D. A y col [72]	2014	EuE (PE básico) y flurbiprofeno.	Extracción con solventes orgánicos	Sí	Sí	13 a 14
Battistini F. D. y col [158]	2014	Ácido hialurónico (PE ácido) y doxorubicina.	Diálisis	Sí	Sí	7 a 8
Palena M.C. y col [189]	2015	CIPEC, EuE y Eudragit L, con cuatro activos	Extracción con solventes orgánicos	Sí	No	No aplica
Guzman M.L y col [220]	2016	EuE (PE básico) y risedronato.	Diálisis	Sí	No	No aplica
Zhang F [221]	2016	Eudragit FS (PE ácido) y clorfeniramina.	Diálisis	No	Sí	3
Alarcón L.P. [213]	2017	ADN (PE ácido) y cinco fármacos básicos	Diálisis	Sí	Sí	4 a 7

¿D.E.?: ¿Se realizó la determinación de la distribución de especies?; ¿ $K_{cc}$ ?: ¿Se calculó la constante de afinidad de condensación del par iónico?, \* Estudio del equilibrio de la formación del CPE en dispersión acuosa.

Para el presente estudio se utilizó la metodología de diálisis debido a las ventajas descritas previamente y a las dificultades mencionadas en el capítulo 2 para la determinación del coeficiente de reparto. Los equilibrios que se establecen en este sistema se representan en la Figura 3-16.

**Figura 3-16** Representación de las especies y equilibrios establecidos en los complejos obtenidos en condiciones de diálisis.



La determinación de la distribución de las especies en el equilibrio se realizó teniendo en cuenta que:

- 1) La membrana de diálisis cuenta con un peso molecular de corte de 12000 Dalton en virtud del peso molecular polimérico y por tanto sólo el ácido benzoico ( $B^-$  y  $BH$ ) y los iones de bajo peso molecular ( $H^+$  y  $Cl^-$ ) son capaces de difundir libremente entre los dos compartimentos.
- 2) Al alcanzar el estado de equilibrio la concentración de las especies  $B^-$  y  $BH$  son iguales en el compartimento donador ( $C_d$ ) y en el receptor ( $C_r$ )
- 3) La cuantificación por espectrofotometría UV del contenido de ácido benzoico en el  $C_r$ , corresponde a la suma de  $B^-$  y  $BH$ , ya que la técnica no diferencia entre las dos especies.
- 4) A partir del valor de pH y de la concentración total de AB en el  $C_r$ , junto con el  $pK_a$  del activo (4,2) es posible determinar las concentraciones de  $[B^-]$  y  $[BH]$ .

- 5) Con la cuantificación del AB total en el *Cr* y su volumen (400 ml) se calculó la cantidad de benzoico en este compartimento.
- 6) La cantidad de AB en el *Cd* en el equilibrio fue determinada sustrayendo de la cantidad total, la hallada en el *Cr*. La cantidad total de AB se calculó por estequiometría de la masa de complejo utilizada.
- 7) La cantidad de las especies  $B^-$  y  $BH$  en el *Cd* fue hallada con la información de la concentración y volumen (10 ml).
- 8) La cantidad de AB que se encontraba haciendo parte del par iónico ( $RN(CH_3)_2H^+B^-$ ) fue determinada restando de la cantidad total de AB en *Cd*, las cantidades de  $B^-$  y  $BH$ .
- 9) Los porcentajes de las especies ( $RN(CH_3)_2H^+B^-$ ),  $B^-$  y  $BH$  fueron calculados según la proporción de sus cantidades en el *Cd*.

Para la determinación de  $K_{cc}$  se procedió de manera semejante a lo planteado para PE de carácter ácido por Jimenez A.F y Arduoso M.S [141,215], para ello se reemplazó en la ecuación 3-2 el termino  $[BH]$ , utilizando el equilibrio de disociación del AB (ecuación 3-3), para obtener la ecuación 3-4, reportada también por Quinteros D.A. [72]

$$K_a = \frac{[B^-][H^+]}{[BH]} \quad (3-3)$$

$$K_{cc} = \frac{[RN(CH_3)_2H^+B^-]K_a}{[RN(CH_3)_2][B^-][H^+]} \quad (3-4)$$

Para determinar la concentración del par iónico ( $RN(CH_3)_2H^+B^-$ ) se utilizó su porcentaje en la distribución de especies y la concentración total de AB en el *Cd* en el equilibrio, esta última se calcula después de descontar las moles de AB cuantificadas en el *Cr*.

El término  $[RN(CH_3)_2]$  corresponde a la concentración en el equilibrio de EuE como especie no disociada, y se determina con la ecuación 3-5

$$[RN(CH_3)_2] = [RN(CH_3)_2]_{total} - [RN(CH_3)_2H^+] - [RN(CH_3)_2H^+B^-] \quad (3-5)$$

Teniendo en cuenta que se trata de una dispersión acuosa y que el balance de carga debe ser igual a cero, entonces:

$$[RN(CH_3)_2H^+] + [H^+] = [B^-] + [OH^-] \quad (3-6)$$

Bajo las condiciones experimentales  $[RN(CH_3)_2H^+] \gg [H^+]$  y  $[B^-] \gg [OH^-]$ , por tanto:

$$[RN(CH_3)_2H^+] = [B^-] \quad (3-7)$$

Al reemplazar 3-7 en 3-5, se encuentra que:

$$[RN(CH_3)_2] = [RN(CH_3)_2]_{total} - [B^-] - [RN(CH_3)_2H^+B^-] \quad (3-8)$$

A partir de los resultados de la distribución de especies, del cálculo de la ecuación 3-8 y del pH en el equilibrio del *Cd* se determinó  $K_{cc}$  utilizando la ecuación 3-4 con unidades de concentración en molaridad (*M*) o en *eq/l* para el PE. Los resultados del estudio de diálisis se presentan en la Tabla 3-11 e incluyen los datos experimentales relevantes para la determinación de la distribución de especies y de la constante de afinidad, que fue incluida en términos del logaritmo en base diez. Algunos de los valores registrados en la tabla cuentan con coeficientes de variación superiores al 5 % sin embargo esto solo se dio para los casos en los que la magnitud reportada era bastante baja, de modo que la desviación estándar representaba una mayor proporción del valor promedio.

Los resultados de la distribución de especies muestran un alto grado de condensación del par iónico, de hecho, para todos los complejos el porcentaje fue superior al 98,7 %, valor que está en línea con lo reportado para CPE entre EuE y fármacos aniónicos [2,72,212]. Cabe destacar del estudio de Quinteros D.A y *col* (2012), la relación que existe entre la estructura química del activo y la tasa de condensación, ya que se encontró que aquellos fármacos con un grupo metilo en la posición alfa del ácido carboxílico contaban con menores porcentajes del par iónico, sugiriendo que la presencia de este grupo afecta el equilibrio, en este sentido es posible que la disposición estructural del AB favorezca la condensación del complejo. Respecto a las demás especies, se observó que la proporción de  $B^-$  siempre fue superior a la de  $BH$ , esto debido al pH del *Cd* en el equilibrio, que se mantuvo por encima del  $pK_a$  del AB.

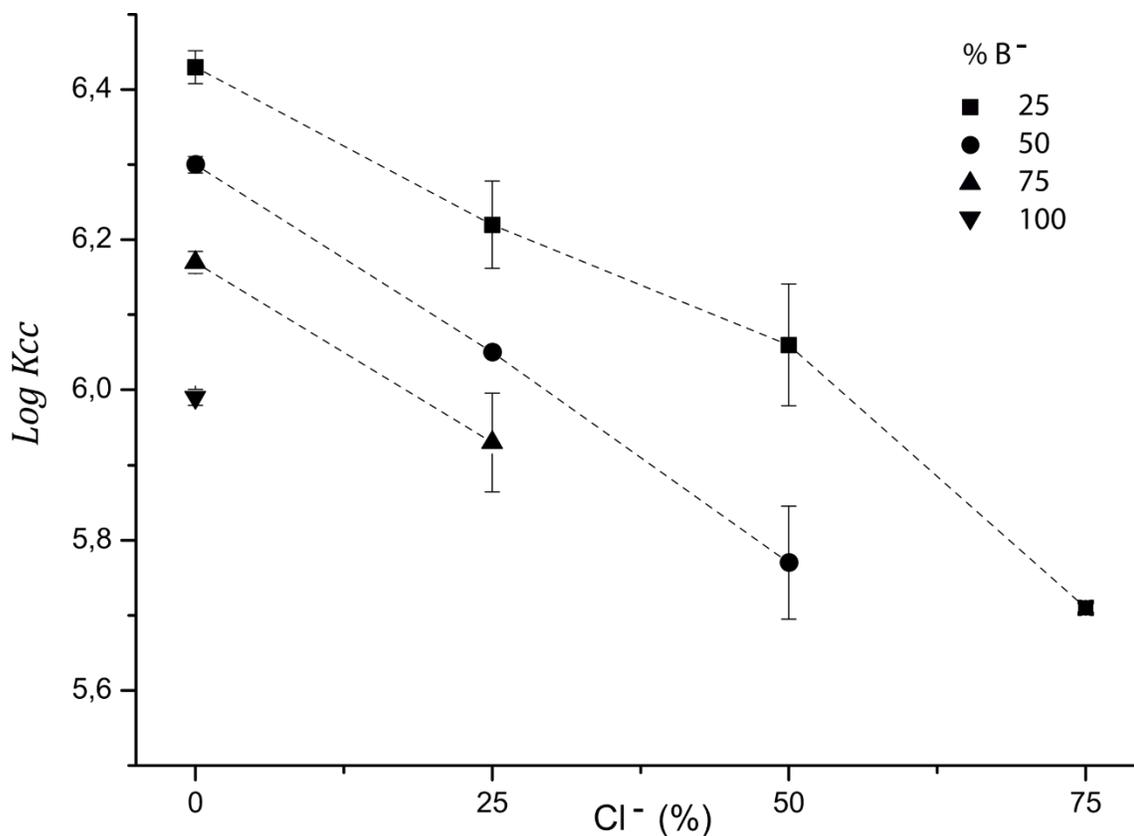
**Tabla 3-11** Distribución de especies en el equilibrio y  $\text{Log } K_{cc}$  obtenidas por diálisis a 25°C.

Complejo	Composición Inicial*		En el equilibrio						$\text{Log}_{10} K_{cc}$	
	$[\text{RN}(\text{CH}_3)_2]$	$[\text{AB}]$	pH		Distribución de especies en Cd (%)		$[\text{AB}]_{\text{total en Cd}}$			
	(eq/l)	(M)	Cd	Cr	$[\text{AB}]_{\text{total en Cr}}$	$\text{RN}(\text{CH}_3)_2\text{H}^+\text{B}^-$	$\text{B}^-$	BH		(M)
EuB <sub>25</sub>	$1,51 \times 10^{-2}$	$0,38 \times 10^{-2}$	6,40 (0,1)	5,35 (0,6)	$1,6 \times 10^{-5}$ (3,3)	99,47 (0,1)	0,49 (3,2)	0,04 (11,5)	$0,31 \times 10^{-2}$ (0,7)	6,43 (0,1)
EuB <sub>25</sub> Cl <sub>25</sub>	$1,51 \times 10^{-2}$	$0,38 \times 10^{-2}$	6,22 (0,2)	4,80 (0,6)	$1,9 \times 10^{-5}$ (4,6)	99,35 (0,1)	0,52 (4,5)	0,13 (9,8)	$0,30 \times 10^{-2}$ (1,2)	6,22 (0,3)
EuB <sub>25</sub> Cl <sub>50</sub>	$1,51 \times 10^{-2}$	$0,38 \times 10^{-2}$	5,99 (0,2)	4,51 (0,4)	$2,0 \times 10^{-5}$ (7,5)	99,34 (0,1)	0,44 (8,3)	0,22 (8,0)	$0,30 \times 10^{-2}$ (2,0)	6,06 (0,5)
EuB <sub>25</sub> Cl <sub>75</sub>	$1,51 \times 10^{-2}$	$0,38 \times 10^{-2}$	5,75 (0,1)	4,27 (0,1)	$2,8 \times 10^{-5}$ (1,1)	98,96 (0,1)	0,56 (1,4)	0,48 (1,9)	$0,27 \times 10^{-2}$ (0,3)	5,71 (0,1)
EuB <sub>50</sub>	$1,51 \times 10^{-2}$	$0,76 \times 10^{-2}$	6,36 (0,1)	4,87 (0,2)	$5,0 \times 10^{-5}$ (1,2)	99,10 (0,1)	0,75 (2,2)	0,16 (0,5)	$0,55 \times 10^{-2}$ (0,3)	6,30 (0,1)
EuB <sub>50</sub> Cl <sub>25</sub>	$1,51 \times 10^{-2}$	$0,76 \times 10^{-2}$	5,96 (0,4)	4,61 (0,6)	$4,4 \times 10^{-5}$ (5,1)	99,23 (0,1)	0,55 (5,6)	0,21 (1,6)	$0,58 \times 10^{-2}$ (1,6)	6,05 (0,1)
EuB <sub>50</sub> Cl <sub>50</sub>	$1,51 \times 10^{-2}$	$0,76 \times 10^{-2}$	5,73 (0,1)	4,31 (0,1)	$5,5 \times 10^{-5}$ (6,0)	98,95 (0,1)	0,59 (7,5)	0,46 (8,5)	$0,53 \times 10^{-2}$ (2,5)	5,77 (0,4)
EuB <sub>75</sub>	$1,51 \times 10^{-2}$	$1,13 \times 10^{-2}$	6,02 (0,2)	4,59 (0,5)	$7,7 \times 10^{-5}$ (2,7)	99,08 (0,1)	0,65 (2,6)	0,27 (0,1)	$0,82 \times 10^{-2}$ (0,5)	6,17 (0,1)
EuB <sub>75</sub> Cl <sub>25</sub>	$1,51 \times 10^{-2}$	$1,13 \times 10^{-2}$	5,87 (0,4)	4,36 (0,7)	$9,3 \times 10^{-5}$ (1,7)	98,77 (0,1)	0,73 (3,5)	0,51 (2,0)	$0,76 \times 10^{-2}$ (0,4)	5,93 (0,4)
EuB <sub>100</sub>	$1,51 \times 10^{-2}$	$1,51 \times 10^{-2}$	5,86 (0,1)	4,63 (0,7)	$12,7 \times 10^{-5}$ (1,0)	98,73 (0,1)	0,92 (1,7)	0,35 (6,4)	$1,00 \times 10^{-2}$ (0,2)	5,99 (0,1)

\* Entre paréntesis valores de coeficiente de variación (CV); Cd: Compartimento donador; Cr: Compartimento receptor; \* Calculada por estequiometría.

Los resultados de  $\text{Log } K_{cc}$  reportados se encuentran en un rango entre 5,7 y 6,4, valores razonables si se comparan con los encontrados en otras investigaciones (ver Tabla 3-10). Para reconocer el efecto de la composición del complejo en la constante de afinidad de condensación iónica se graficaron los resultados en la Figura 3-17. En esta se observa para el valor cero del eje X, es decir para los complejos sin neutralización adicional de ácido clorhídrico, que a medida que aumenta el porcentaje del contraión benzoato disminuye la afinidad entre PE y activo, efecto que también tiene lugar con el contraión cloruro. Como se mencionó previamente no existen muchos estudios de CPE con EuE en los que se reporte el valor de  $K_{cc}$  y el que se describió [72] sólo evaluó una composición de complejo, no obstante para la investigación de Arduzzo y col [222] en la que evaluaron tres diferentes PE ácidos se encontró que dependiendo de la estructura química del polímero es posible que el incremento en el porcentaje de carga con el contraión, cause tres escenarios: aumento, disminución o inalterabilidad de  $K_{cc}$ . El primero fue asociado a la hidrofobicidad de la cadena y al efecto progresivo de expansión del PE debido a la ionización, mientras que, la disminución fue relacionada con la proximidad entre grupos carboxílicos la cual puede actuar como un impedimento estérico, este fenómeno podría explicar la tendencia observada para los resultados del presente estudio y ya que la mitad de los monómeros del EuE [69] corresponden a los grupos amino (DMAE) es probable que también ocurra tal impedimento estérico; llama la atención que el efecto de descenso en el  $\text{Log } K_{cc}$  es diferente entre el contraión benzoato y cloruro siendo mayor el del inorgánico, a partir de este hecho se puede concluir que el polímero tiene mayor afinidad por los iones cloruro, esto debido a que provienen de un ácido fuerte, mientras que el AB es un ácido débil.

**Figura 3-17** Valores de  $\text{Log } K_{cc}$  promedio de las dispersiones acuosas de los complejos  $\text{EuB}_{25}\text{Cl}_x$  (■),  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_x$  (●),  $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_x$  (▲) y  $\text{EuB}_{100}$  (▼), a concentración de 0,5% de EuE. En el eje X se presenta el porcentaje de grupos DMAE neutralizado con ácido clorhídrico.



Vale la pena mencionar que para la determinación de la  $K_{cc}$  para CPE con polímeros de carácter básico Manzo y *col* [25,154] presentan en los capítulos de los libros referenciados otro método para realizar el despeje de la ecuación, sin embargo se decidió seguir lo reportado por Quinteros D.A. [72] ya que su estrategia tiene en cuenta otros parámetros del equilibrio como el pH en el  $Cd$  y el valor del  $pK_a$ , además porque la ecuación de Manzo y *col* está diseñada solo para complejos con neutralización adicional de HCl y fue planteada para la metodología de extracción de solventes, sin embargo para diálisis debe considerarse el paso de los contraiones cloruro al  $Cr$ .

Finalmente, se deben hacer algunas acotaciones para la interpretación del fenómeno de formación del par iónico que son necesarias para este tipo de estudios [25,141,154,212], que así como la descripción clásica de la interacción ión-ión reconoce dos regiones relativamente estables: una referida como los “pares iónicos separados por solvente” o “pares iónicos sueltos” y la otra reportada como “pares iónicos en contacto” o “pares iónicos

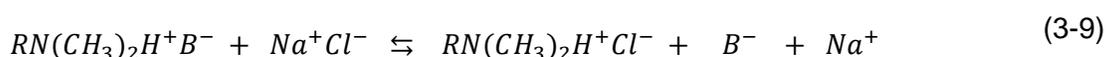
ajustados”, en este mismo marco, para la teoría de la condensación iónica de PE se ha propuesto reconocer dos modos extremos de asociación: “enlace suelto” y “enlace fuerte”, el primero incluye a los contraiones deslocalizados confinados en un volumen de condensación en la vecindad inmediata del PE unidos por las interacciones de largo alcance, mientras que el otro se debe a las de corto alcance y corresponde a la interacción específica del sitio [223,224]. Cabe señalar que las aproximaciones teóricas abordan principalmente la interacción de PE con contraiones inorgánicos, sin embargo, cuando se trata de moléculas orgánicas como el ácido benzoico, aunque la contribución principal surge de la atracción electrostática, otras contribuciones también juegan un papel importante en la asociación.

#### **v. Desplazamiento de AB por intercambio iónico.**

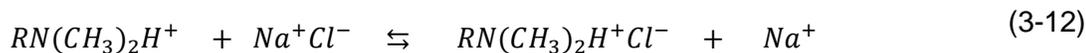
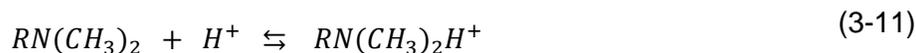
El campo de aplicación de los sistemas tipo complejo polielectrolito ha crecido rápidamente en las últimas décadas, esto debido a la alta sensibilidad que poseen frente a cambios en su ambiente y que les confieren propiedades que pueden ser controladas por las condiciones del medio, especialmente mediante la adición de sales [225]. Son bastante comunes los reportes en los que estudian el comportamiento de CPE y CIPE tras la adición de cloruro de sodio [2,34,35,71,213,225–230]; como elemento común de estas investigaciones se encuentra que la presencia de los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  alteran la interacción “PE–PE” o “PE–activo” generando la disociación del par iónico, por ejemplo, en los estudios desarrollados por Dautzenberg H. y *col* [225,227,228] para complejos interpolielectrolito se observó que la adición de la sal inducía diferentes procesos en el sistema, primero el hinchamiento, luego la agregación o floculación y finalmente la completa disolución o separación del CPE. Los investigadores caracterizaron a este tipo de reacciones como “lentas” ya que los cambios estructurales observados tardaban en completarse y eran tiempo dependientes.

Para varios CPE en los que el contraión es una molécula de bajo peso, la adición de cloruro de sodio ha sido utilizada como estrategia para evaluar la reversibilidad de la condensación iónica. Para ello se ha monitoreado el valor de pH tras la adición sucesiva de la sal ya que sus iones interfieren en el equilibrio alcanzado en la dispersión del complejo, por ejemplo, para sistemas entre PE ácido ( $\text{R-COO}^-$ ) y una molécula básica ( $\text{BH}^+$ ), el ión  $\text{Na}^+$  desplaza a  $\text{BH}^+$ , que posteriormente se disocia en B y  $\text{H}^+$  generando un descenso en el valor del pH

[34]. Para los complejos formados por un PE catiónico, como el de la presente investigación, la interferencia del equilibrio reportada es semejante y ha sido explicada mediante las ecuaciones 3-9 y 3-10 en las que se representa para el par iónico formado entre EuE y AB el efecto de la adición de la sal; la posibilidad del intercambio de aniones se favorece por la naturaleza débil del ácido benzoico. En la medida que el equilibrio de la ecuación 3-9 se desplaza hacia la derecha, la ecuación 3-10 favorece la regeneración de la especie no disociada, debido a la extracción de iones hidronio del medio, aumentando en consecuencia el pH.



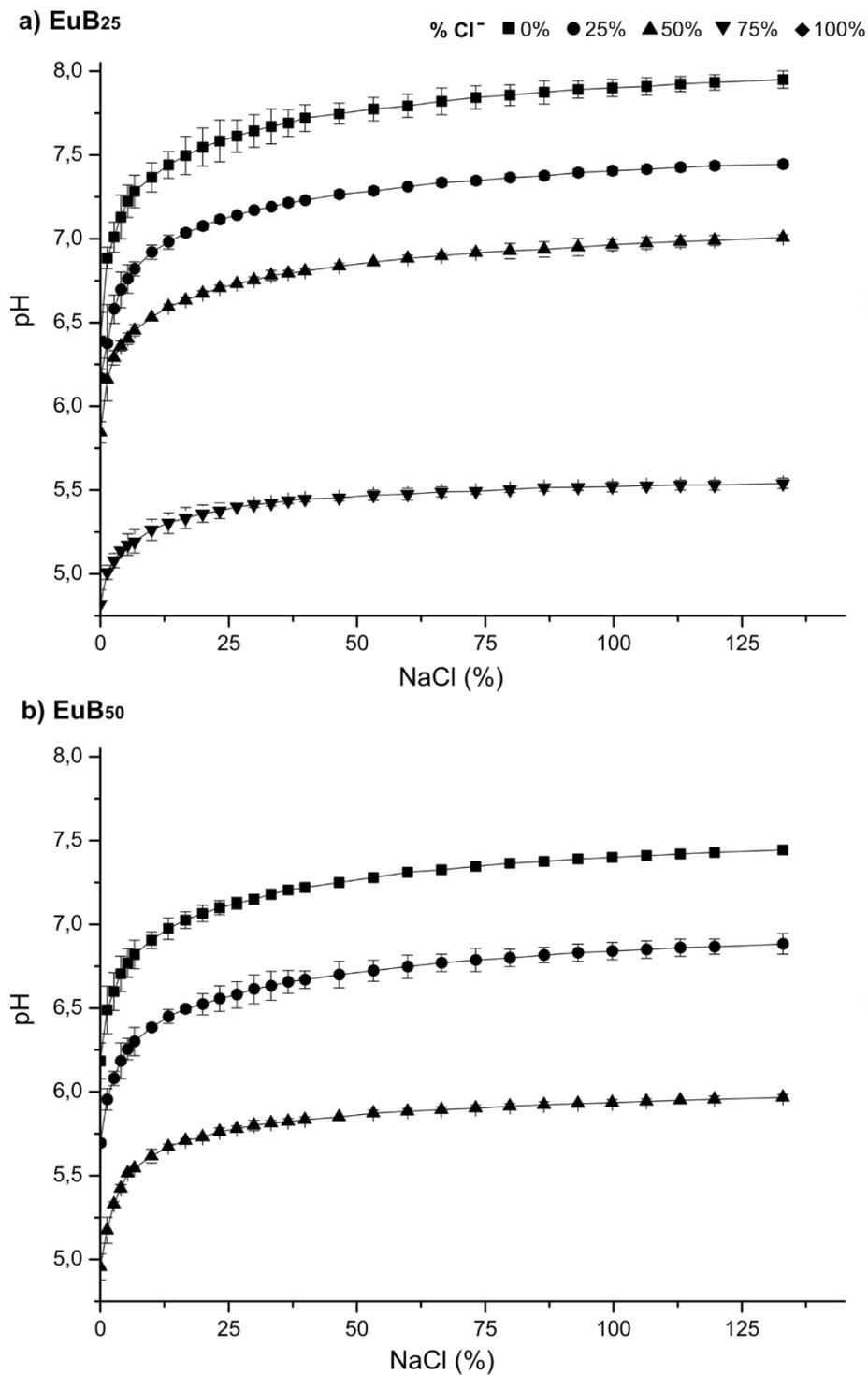
En los estudios reportados para complejos con EuE [2,71,231], adicionalmente se consideran los equilibrios asociados al PE (ecuaciones 3-11 y 3-12), en los que se observa que el ión cloruro también desempeña un papel importante en la extracción de iones hidronio del medio, esto debido al desplazamiento hacia la derecha del equilibrio en 3-12 y asimismo del equilibrio en 3-11; según las publicaciones mencionadas, este fenómeno contribuye de manera secundaria al aumento de pH pues los equilibrios en 3-9 y 3-10 son los que gobiernan el intercambio iónico.



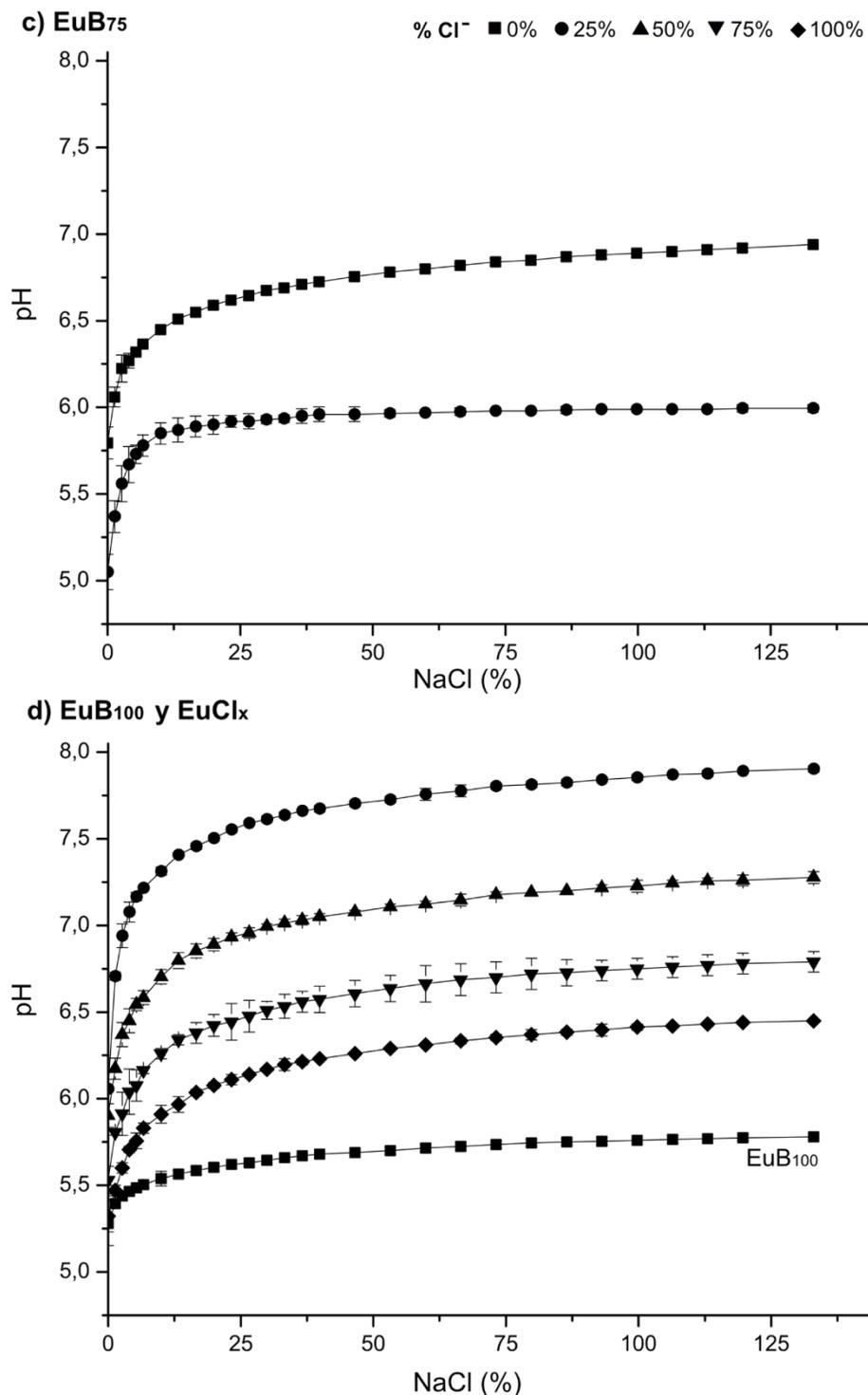
En la Figura 3-18 se presentan los resultados en cuatro gráficas de pH versus los equivalentes adicionados de NaCl expresados como porcentaje respecto a los grupos protonables del EuE; en estas se presentan los datos para los diez complejos en estudio y además se incluyen los perfiles para los ionómeros del polímero—únicamente neutralizados con HCl: EuCl<sub>25</sub>, EuCl<sub>50</sub>, EuCl<sub>75</sub> y EuCl<sub>100</sub>—. En las gráficas se observa el fenómeno explicado con antelación ya que, efectivamente la adición de cloruro de sodio conllevó al aumento del pH para todas las dispersiones en estudio.

Con el objetivo de analizar el efecto de la composición del complejo en los cambios de pH, en la Tabla 3-12 se registró para cada uno el valor de pH inicial, el final y su diferencia ( $\Delta\text{pH}$ ), adicionalmente los datos de  $\Delta\text{pH}$  fueron graficados en la Figura 3-19. ; de estas se concluye que a medida que aumenta el porcentaje del contraión benzoato, en la composición del complejo, disminuye la diferencia de pH tras la adición de NaCl, efecto que también tuvo lugar para el contraión cloruro. Llama la atención los resultados observados para la serie de sistemas  $\text{EuCl}_x$ , pues contrario a lo reportado por Quinteros D.A [2] y Baena Y. [231], en el presente estudio se encontró que los ionómeros en mención sí fueron sensibles a la adición de cloruro de sodio y de hecho su modificación del valor de pH superó a la unidad en los cuatro complejos. Los anteriores resultados se encuentran en contravía con lo planteado inicialmente, pues si los equilibrios que gobiernan el aumento de pH corresponden a los indicados en las ecuaciones 3-9 y 3-10 se esperaría que aquellos complejos con un mayor porcentaje de benzoato fueran los que contarán con la mayor variación del pH, esto no se reflejó en los resultados porque todas las dispersiones se encontraban desde el estado inicial en un pH superior al  $\text{pK}_a$  del ácido benzoico (4,2) y por tanto, aunque el equilibrio en 3-9 se desplace hacia la derecha por la mayor afinidad que existe entre la especie " $\text{RN}(\text{CH}_3)_2\text{H}^+$ " y el contraión cloruro, (como se explicó en la anterior sección), el equilibrio en 3-10 nunca favorecería la formación de la especie no disociada, de estos hallazgos se concluyó que para la presente investigación los equilibrios en 3-11 y 3-12 son los que contribuyen al aumento de pH y que la especie " $\text{RN}(\text{CH}_3)_2$ " en la ecuación 3-11 hace referencia a los grupos no protonados del EuE, es por ello que los complejos que con menor porcentaje de neutralización total, ya sea de contraiones cloruro o benzoato, presentaron los mayores valores de  $\Delta\text{pH}$  y por estos mismo motivos se explica porque los sistemas  $\text{EuCl}_x$  también fueron sensibles a la adición de NaCl.

**Figura 3-18** Variación del pH debida al intercambio iónico tras la adición de cloruro de sodio en los complejos de las familias **a)** "EuB<sub>25</sub>", **b)** "EuB<sub>50</sub>", **c)** "EuB<sub>75</sub>" y **d)** para EuB<sub>100</sub> y aquellos sin AB. El porcentaje de grupos DMAE neutralizado con ácido clorhídrico corresponde a: (■) 0%; (●) 25%; (▲) 50%; (▼) 75% y (◆) 100%.



**Figura 3-18 (Continuación)** Variación del pH debido al intercambio iónico tras la adición de cloruro de sodio en los complejos de las familias **a)** "EuB<sub>25</sub>", **b)** "EuB<sub>50</sub>", **c)** "EuB<sub>75</sub>" y **d)** para EuB<sub>100</sub> y aquellos sin AB. El porcentaje de grupos DMAE neutralizado con ácido clorhídrico corresponde a: (■) 0%; (●) 25%; (▲) 50%; (▼) 75% y (◆) 100%.

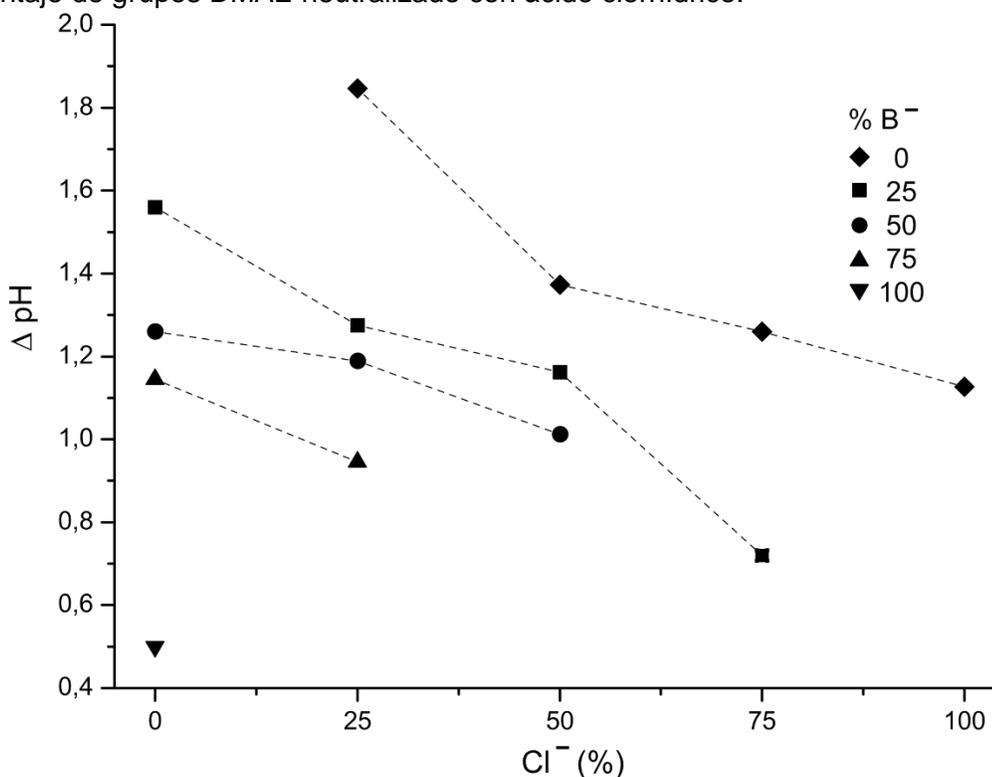


**Tabla 3-12** Cambios de pH debidos al intercambio iónico tras la adición de cloruro de sodio a las dispersiones de los complejos al 0,5 % de EuE.

Sistema	pH inicial	pH final	$\Delta$ pH
EuB <sub>25</sub>	6,39 (0,4)	7,95 (0,2)	1,56
EuB <sub>25</sub> Cl <sub>25</sub>	6,17 (0,7)	7,45 (0,1)	1,28
EuB <sub>25</sub> Cl <sub>50</sub>	5,85 (0,6)	7,01 (0,1)	1,16
EuB <sub>25</sub> Cl <sub>75</sub>	4,82 (0,3)	5,54 (0,2)	0,72
EuB <sub>50</sub>	6,19 (0,4)	7,45 (0,1)	1,26
EuB <sub>50</sub> Cl <sub>25</sub>	5,70 (0,3)	6,89 (0,3)	1,19
EuB <sub>50</sub> Cl <sub>50</sub>	4,96 (0,5)	5,97 (0,1)	1,01
EuB <sub>75</sub>	5,80 (0,6)	6,95 (0,1)	1,15
EuB <sub>75</sub> Cl <sub>25</sub>	5,05 (0,4)	6,00 (0,1)	0,95
EuB <sub>100</sub>	5,28 (0,8)	5,78 (0,1)	0,50
EuCl <sub>25</sub>	6,06 (0,1)	7,91 (0,1)	1,85
EuCl <sub>50</sub>	5,90 (0,9)	7,27 (0,1)	1,37
EuCl <sub>75</sub>	5,53 (0,5)	6,79 (0,3)	1,26
EuCl <sub>100</sub>	5,32 (0,6)	6,45 (0,1)	1,13

Entre paréntesis valores de coeficiente de variación (CV)

**Figura 3-19** Valores de  $\Delta$ pH debidos al intercambio iónico tras la adición de cloruro de sodio a las dispersiones acuosas de los sistemas EuB<sub>25</sub>Cl<sub>x</sub>(■), EuB<sub>50</sub>Cl<sub>x</sub>(●), EuB<sub>75</sub>Cl<sub>x</sub>(▲), EuB<sub>100</sub> (▼) y EuCl<sub>x</sub>(◆), a concentración de 0,5% de EuE. En el eje X se presenta el porcentaje de grupos DMAE neutralizado con ácido clorhídrico.



A partir de los resultados presentados por Kairuz A.F [215], se espera que de las dispersiones estudiadas, aquellas con un mayor cambio de pH correspondan a las de mayor disociación del par iónico, pues en la investigación reportada se encontró una relación directa entre  $\Delta\text{pH}$  y porcentaje de distribución de la especie “par iónico”. Debido a que todas contaron con un aumento de pH de al menos 0,5 se deduce que la formación del complejo es reversible para los diez complejos en estudio, por otra parte, de las gráficas incluidas en la Figura 3-18, también se puede concluir que la interacción que se establece entre el PE y el AB no es tan fuerte como la que se ha reportado para otros complejos [71], ya que para todas las dispersiones en estudio se encontró que el valor de pH ya era estable en el momento en el que la adición de los equivalentes de NaCl correspondía al 100% de los grupos protonables de EuE, resultados que se encuentran en línea con lo reportado por Guzmán M.L. y *col* [71], estudio en el que se analizó el complejo  $\text{EuB}_{40}\text{Cl}_{25}$  con el fin de compararlo con los resultados para complejos preparados entre EuE y fosfato de dexametasona, en los que se observó que para valores de 800% de NaCl aún se encontraba en ascenso el pH del sistema; incluso para un estudio en un CIPE [226] se observó que el cambio de pH continuaba después de valores de 400% de equivalentes de NaCl.

Por último, vale la pena enfatizar en las causas que llevan al aumento de pH para este tipo de análisis y que se limitan al intercambio iónico del cloruro de sodio, pues efectos paralelos como la dilución de la concentración de hidronios debido al aumento de volumen del sistema, de 25 a 35 mililitros, sólo generaría un aumento de pH de 0,15; además la investigación desarrollada por Kairuz A.F y *col* [34] demostró que la adición de no electrolitos como glicina no altera el pH de las dispersiones de los complejos en agua.

#### **vi. Evaluación de la carga de superficie**

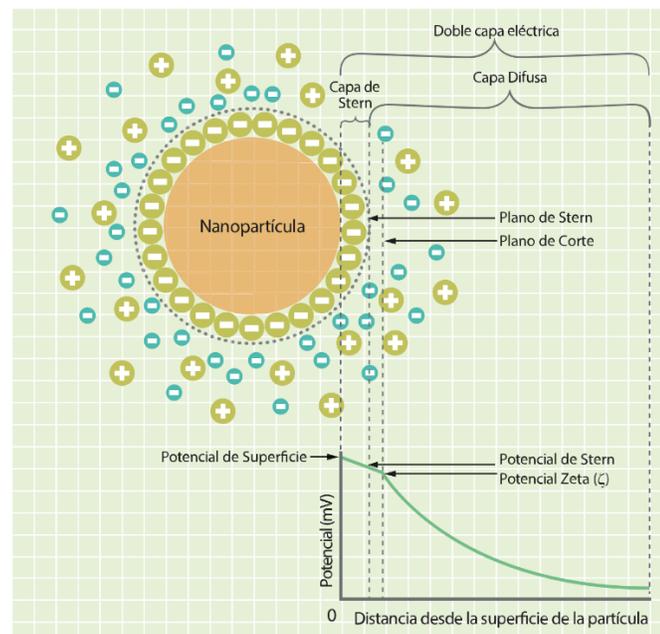
El potencial zeta o potencial electrocinético, representado universalmente con la letra griega zeta ( $\zeta$ ), se define como la diferencia del potencial eléctrico entre el medio de dispersión y la capa estacionaria de fluido unida a la partícula dispersa [232].

Bajo el modelo de la doble capa eléctrica, la superficie cargada de la partícula está rodeada por una capa de contraiones fuertemente unidos, correspondiente a la capa de Stern (Ver Figura 3-20) y por una capa difusa en la que los iones están menos firmemente unidos, con un balance entre los contraiones atraídos por la partícula y aquellos que repelen la

capa de Stern; a medida que aumenta la distancia respecto a la partícula disminuye el potencial eléctrico hasta llegar a cero. Dentro de la capa difusa existe un límite en el cual la partícula y los iones forman una entidad estable; cuando una partícula se mueve (por ejemplo, debido a la fuerza de gravedad) los iones dentro de tal límite se mueven con ella, sin embargo, los iones que se encuentran más allá no viajan con la partícula. Este límite es conocido como “la superficie de corte hidrodinámico”, “plano de deslizamiento” o “plano de corte” y su potencial eléctrico corresponde al potencial Zeta [169].

La experiencia general indica que el plano de corte está ubicado muy cerca del plano de Stern (Ver Figura 3-20); ambos son abstracciones de la realidad: el plano de Stern es el límite entre las secciones difusa y no difusa de la doble capa eléctrica, pero es difícil de localizar con exactitud; asimismo el plano de corte, es interpretado como el límite entre el fluido inmóvil y el hidrodinámicamente móvil. En la realidad ninguna de las dos transiciones es marcada, sin embargo el movimiento del líquido puede ser obstaculizado en la región donde los iones experimentan interacciones fuertes con la superficie de la partícula, por ello es posible que la inmovilización del fluido se extienda más allá de la capa de Stern y es por ello que en la práctica el potencial  $\zeta$ , es igual o inferior en magnitud al potencial de Stern [233].

**Figura 3-20** Representación del modelo de doble capa de sistemas coloidales.



Fuente: Adaptado de Malvern Instrument 2009 [169].

El concepto del plano de corte es generalmente aceptado a pesar de que no existe una forma inequívoca de ubicarlo, de hecho, el  $\zeta$  es una propiedad que no puede ser medida directamente; para su determinación es necesario medir una señal electrocinética y aplicar un modelo matemático apropiado que permita su conversión a potencial zeta. El nivel de sofisticación del modelo utilizado depende del fenómeno particular y la situación que se esté investigando [233].

Para la presente investigación se utilizó el equipo Zetasizer Malvern Nano ZS, el cual mide el  $\zeta$  a partir de la señal electrocinética correspondiente a movilidad electroforética ( $U_E$ ) y la aplicación de la ecuación de Henry. La  $U_E$  se obtiene por electroforesis, para ello se aplica un campo eléctrico a la solución de moléculas o a la dispersión de partículas, causando el movimiento de estas en función de su potencial zeta, a una velocidad que es determinada por la técnica de velocimetría láser Doppler. Adicionalmente se eligió la aproximación de Smoluchowski a la ecuación de Henry, pues es la ecuación de elección reportada en estudios previos de sistemas tipo complejo polielectrolito [141,144,145,189,213]; se utilizó un valor de  $F(\kappa a)$  de 1,5 ya que los análisis se realizaron en un medio polar [169,232,233].

Es importante destacar que el término “Potencial Zeta” fue desarrollado para partículas sólidas y hace referencia –como se mencionó previamente– a la interfase existente entre una superficie y el medio circundante; en este sentido la definición convencional de  $\zeta$  no aplica para polielectrolitos o CPE ya que tal interfase no existe, sin embargo, estos sistemas exhiben propiedades electrocinéticas como la  $U_E$  debida a la carga de los grupos ionizables. En consecuencia, el concepto de potencial Zeta para estos casos requiere el desarrollo de modelos que permitan la adecuada conversión de la señal electrocinética; de hecho para las denominadas partículas “blandas” —partículas coloidales convencionales con PE en su superficie— el doctor Hiroyuki Ohshima ha realizado aproximaciones analíticas para establecer una teoría que explique su movilidad electroforética [234–237]; en los estudios desarrollados ha tenido en consideración factores propios de los PE, por ejemplo, el flujo del líquido pues no sólo existe por fuera de la partícula, sino que además debe tenerse en cuenta el flujo al interior de las cadenas poliméricas; asimismo el potencial al interior de la capa de PE que es diferente, para estos casos muy similar a un potencial de Donnan y además incluyó un coeficiente de fricción, ya que los segmentos poliméricos pueden ser considerados como centros de resistencia distribuidos en la capa de PE, los

cuales ejercen fuerzas de fricción en el líquido que fluye a través de las cadenas del polímero.

En el estudio de la movilidad electroforética y del potencial zeta de polielectrolitos destaca la labor de algunos autores que han dedicado sus investigaciones al análisis de estos fenómenos electrocinéticos, como los realizados por Fujita H y Hermans J.J. [238] quienes establecieron una ecuación para determinar la  $U_E$  de PE esféricos con densidad de carga homogénea, la expresión planteada incluye el coeficiente de fricción del PE pero no involucra el potencial zeta; Overbeek J.Th.G. y Stiger D., encontraron que las principales contribuciones a la velocidad electrofóretica de este tipo de sistemas están dadas por el movimiento causado por la carga neta del PE, por los contraiones ubicados en la parte interna y aquellos en la parte externa de la esfera [239] y aunque los dos estudios son tratamientos teóricos desarrollados a partir del modelo de velocidad de sedimentación y viscosidad intrínseca de esferas porosas de Debye y Bueche [240], en el reporte de Overbeek aplican la teoría de Henry para la electroforesis de cilindros cargados uniformemente y por tanto incorporan el valor de  $\zeta$  en la expresión de velocidad, asimismo recomiendan la interpretación del potencial zeta como un potencial promedio a lo largo de la cadena del polímero, por tanto, a condiciones de fuerza iónica baja, su valor es independiente de la longitud de la cadena, como se demostró previamente en el estudio de Fitzgerald y Fouss [241].

En estudios posteriores se realizaron aportes a la interpretación del fenómeno de electroforesis para PE; en la Tabla 3-13 a manera de ejemplo se incluyen algunas de las contribuciones realizadas en este campo.

**Tabla 3-13** Estudios relacionados con el comportamiento electroforético de PE.

<b>Autores</b>	<b>Año</b>	<b>Hallazgos</b>
<b>Noda I. y col</b> [242].	1964	Despejaron la ecuación de Fujita-Hermans para condiciones de fuerza iónica alta (0,1 N de NaCl) y encontraron que la movilidad del PE es igual a la movilidad del segmento elemental del polímero (parte de la cadena que contiene una carga electrónica elemental) y es independiente del peso molecular.
<b>De Keizer A. y co</b> [243].	1975	Calcularon la movilidad para sistemas PE con conformación cilíndrica e incluyeron el efecto relacionado con la orientación que adquiere el cilindro al aplicar el campo eléctrico; para ello consideraron que la orientación era aleatoria (entre perpendicular y paralela al campo aplicado).
<b>Schellman J. y col</b> [244].	1977	Estudiaron la aplicación del modelo de doble capa eléctrica, del potencial Z y de la carga electrofóretica para el polímero ADN con el objetivo de realizar una apropiada interpretación de la electroforesis, para ello asumieron una simetría

Autores	Año	Hallazgos
		cilíndrica del PE y la distribución homogénea de la carga; introdujeron modificaciones a la teoría electrocinética del sistema relacionadas con la orientación promedio del cilindro, el efecto de relajación, los aspectos geométricos del ADN y la relación no lineal entre carga y potencial, debidos a que en la electroforesis el PE y sus contraiones se mueven en direcciones opuestas, causando la destrucción continua de la atmosfera iónica en la parte posterior del cilindro y su reconstrucción en la parte frontal, proceso que toma su tiempo y bajo el movimiento constante ocasiona atmosferas asimétricas que dan lugar a campos eléctricos adicionales que conllevan a un efecto de relajación y es por ello que no existe una relación lineal entre movilidad y potencial zeta.
<b>Terajima K. y col</b> [245]	1976	Desarrollaron un método para determinar la distribución de carga de un PE a partir de mediciones de velocidad electroforética.
<b>Van der Drift W.P.J.T y co</b> I [246]	1979	Interpretaron la movilidad para sistemas PE con alto potencial de superficie usando la ecuación completa de Poisson-Boltzmann y el tratamiento de Henry, para ello asumieron el comportamiento de cilindros orientados aleatoriamente e ignoraron el efecto de relajación. Demostraron que bajo algunas circunstancias los PE flexibles se encuentran tan abiertos que las interacciones eléctricas e hidrodinámicas entre partes distintas de la misma o de diferente cadena son tan bajas que el modelo cilíndrico es mucho mejor modelo que el de la esfera homogéneamente cargada.

A partir de los hallazgos incluidos en la tabla se infiere que el proceso de conversión de las mediciones electroforéticas a potencial  $\zeta$  para PE no es tan sencillo como para nanopartículas y que no basta con elegir una de las aproximaciones a la ecuación de Henry en el software del equipo utilizado; por lo anterior, es posible afirmar que en todos los estudios en los que no se haya incluido o desarrollado un modelo específico para el sistema evaluado, no se determinó propiamente lo que se define como “potencial  $\zeta$ ”, sin embargo, para efectos prácticos, los resultados reportados permiten reconocer tendencias y hacer comparaciones, pues dependiendo de su valor, pueden reflejar la presencia de una movilidad electroforética positiva o negativa y pueden confirmar la presencia de moléculas cargadas; no obstante, lo contrario no es necesariamente cierto, si el valor de “potencial zeta” reportado es cero para un determinado sistema tipo PE, puede que las moléculas si estén cargadas pero cuentan con una carga neta cero. En el reporte técnico de la IUPAC para la medición e interpretación de los fenómenos electrocinéticos elaborado por Delgado A.V. y col [233] se establece que la elección de la técnica y teoría para la medición del potencial zeta depende principalmente del propósito de la investigación, para algunos casos puede justificarse el uso de modelos simples aun cuando no permitan llegar al valor correcto del potencial zeta, como en el caso de herramienta de control de calidad

o para la obtención de CIPE estratificados por capas en los que para evitar las sobrecompensación de cargas se determina el potencial zeta después de la deposición de cada capa como monitoreo del crecimiento secuencial [25,247]; sin embargo, cuando el objetivo de la investigación es, por ejemplo, comparar los valores de  $\zeta$  de un sistema al utilizar diferentes técnicas electrocinéticas es esencial encontrar el potencial  $\zeta$  verdadero; igualmente, cuando el resultado es utilizado para realizar la determinación de otras propiedades físicas.

Teniendo en cuenta lo planteado, se encontró que para la presente investigación no se realizó la determinación del potencial  $\zeta$  verdadero, ya que no se desarrolló un modelo específico para la conversión de la movilidad de los sistemas PE obtenidos, por ello para fines prácticos se utilizó el término “pseudo-potencial zeta ( $p\text{-}\zeta$ )” para referirse a los valores arrojados por el software del equipo. Adicional a las consideraciones descritas, cabe señalar que la guía ASTM para la medición de movilidad electroforética y potencial zeta [232] indica que el reporte de los resultados siempre debe ir acompañado por el método y los parámetros de determinación, pues un valor de potencial zeta sin información de pH, composición iónica o concentración de electrolitos no tiene ningún significado.

Bajo las condiciones de análisis mencionadas en la metodología (vi. Evaluación de la carga de superficie) se realizaron las mediciones del  $p\text{-}\zeta$ ; la concentración del polímero utilizada fue 0,5 % y su elección se realizó para mantener las condiciones a las que se evaluaron las demás propiedades fisicoquímicas en dispersión y porque a este nivel se obtienen sistemas solubles de apariencia estable. En cuanto a la concentración del polímero reportada en investigaciones previas Olivera *y col* presentan en el capítulo del libro [154] la información de potencial zeta de diferentes estudios, en los que las dispersiones acuosas para veinte sustancias activas fueron evaluadas al 1,0 % del PE; por otro lado Salamanca *y col* [145] recomiendan emplear concentraciones entre 0,3 % y 0,4 % con base en los resultados observados para tamaño de partícula, no obstante la diferencia en el valor del  $\zeta$  con las mediciones al 0,5 % del polímero no fue significativa. Otro aspecto de gran relevancia para la determinación del  $p\text{-}\zeta$  y del cual no existen mucha información reportada es el tiempo entre la preparación de la dispersión y la medición. En ensayos previos (resultados no incluidos) se encontraron cambios de hasta 30 mV debidos exclusivamente a este factor, por ello se estableció un lapso de 30 minutos para hacer todas las determinaciones, el cual era suficiente para asegurar la homogenización de las

muestras; las investigaciones de Salamanca y Palacio [145,248] evidenciaron una disminución en los valores absolutos de potencial zeta relacionados con el tiempo transcurrido al analizar este tipo de sistemas, para el caso de los complejos con Eudragit E atribuyeron el efecto a los procesos de hidrólisis de los grupos DMAE expuestos en la superficie.

Los resultados de  $p-\zeta$  para las dispersiones de los complejos se presentan en la Tabla 3-14, en la que también se incluye la información de pH debido a la relevancia de este parámetro en el análisis. El rango de  $p-\zeta$  encontrado estuvo entre 32 y 65 mV, valores altos que indican estabilidad física en todas las dispersiones obtenidas y que se encuentra en línea con lo reportado previamente [25,35,72,119,141,143,154,210,212], de hecho en el estudio de Palena y *col* [189] registran un resultado de 42,4 mV para la dispersión al 0,5% de EuE del complejo  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$ , el cual coincide con el registrado en el presente estudio.

**Tabla 3-14** Valores del pseudo-potencial zeta ( $p-\zeta$ ) para los diez complejos en dispersión. Concentración: al 0,5 % de EuE; medio dispersante: solución de NaCl 1mM en agua.

	$p-\zeta$ (mV)	pH
<b>EuB<sub>25</sub></b>	61,6 (5,1)	6,39 (0,44)
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>25</sub></b>	51,9 (5,9)	6,17 (0,65)
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>50</sub></b>	45,6 (1,7)	5,84 (0,59)
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>75</sub></b>	64,3 (3,5)	4,82 (0,32)
<b>EuB<sub>50</sub></b>	54,8 (2,7)	6,18 (0,41)
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>25</sub></b>	49,8 (2,1)	5,71 (0,36)
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub></b>	42,6 (3,0)	4,95 (0,53)
<b>EuB<sub>75</sub></b>	45,0 (1,3)	5,80 (0,61)
<b>EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub></b>	32,7 (4,2)	5,05 (0,41)
<b>EuB<sub>100</sub></b>	42,0 (2,6)	5,20 (0,84)

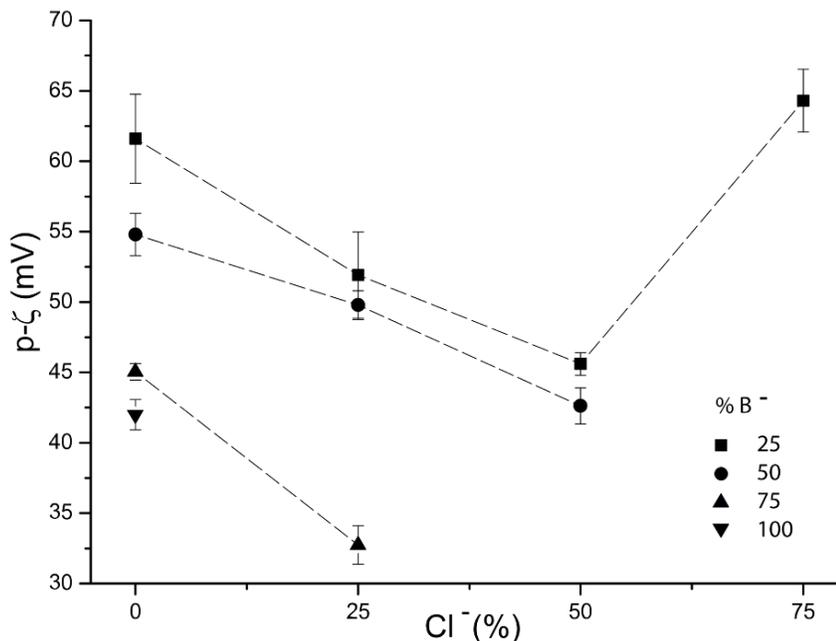
Entre paréntesis valores de coeficiente de variación (CV).

Ardusso y *col* [141] atribuyen los altos valores de los potenciales electrocinéticos a una teoría en la que una población significativa de los contraiones condensados mantienen algún grado de hidratación y que las cargas no están completamente neutralizadas; por lo tanto la condensación de los contraiones genera la expansión de las cadenas de los PE, haciendo que el complejo sea más hidrofílico que el polímero solo. La teoría de los dos modos de asociación para la condensación iónica, la “suelta” y la “fuerte” explicadas en la sección de distribución de especies, explica los altos valores de potencial electrocinético

aún cuando el porcentaje de condensación es del cien por ciento [155,222]. Jimenez-Kairuz [215] y Alarcón [213] explican el fenómeno del potencial zeta desde un modelo, que propone que en condiciones de equilibrio el PE interacciona con su contraión conformando un microentorno macromolecular donde la concentración de las especies de naturaleza opuesta al polímero es mayor que en el seno de la solución, de ésta manera el microentorno tendrá permanentemente cargas iónicas con capacidad de interactuar con el campo eléctrico. Derivado de lo planteado por los autores para PE ácidos, se puede afirmar para las dispersiones de los complejos en este estudio, que la concentración de iones  $H^+$  es mayor en el seno de la solución debido a las fuerzas de repulsión entre especies cargadas del mismo signo y a los requerimientos de electroneutralidad en el seno de la solución:  $[H^+] = [B^-] + [OH^-]$ , de acuerdo a este modelo el microentorno se caracteriza por un valor de pH mayor al del seno de la solución y por una alta proporción de  $B^-$  bajo la forma de pares iónicos.

Para observar la tendencia de los resultados se representaron los valores de p- $\zeta$  en la Figura 3-21, de manera semejante a como se han presentado otras de las determinaciones. En términos generales se evidencia la disminución del potencial con el aumento del porcentaje del contraión, ya sea orgánico o inorgánico. Para los complejos sin neutralización adicional con ácido clorhídrico representados en el valor cero del eje X se observa este claro comportamiento y el descenso de aproximadamente 20 mV entre el complejo  $EuB_{25}$  y  $EuB_{100}$ , asimismo para las composiciones con el 25 y el 50 por ciento de neutralización adicional con los contraiones cloruro, se presenta reducción en los valores de p- $\zeta$ . De estos resultados se corrobora la asociación entre el PE y los contraiones, además se deduce que la interacción electrostática es la que gobierna principalmente esta asociación; para ello vale la pena traer a consideración los resultados observados para un sistema de dispersión sólida entre EuE y Curcumina, en el que no existe interacción iónica entre componentes y en el precisamente las variaciones en el porcentaje de carga del activo no se reflejan en ningún cambio en el valor de potencial zeta [182].

**Figura 3-21** Valores de  $p\text{-}\zeta$  promedio de las dispersiones en NaCl 1mM de los complejos  $\text{EuB}_{25}\text{Cl}_x(\blacksquare)$ ,  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_x(\bullet)$ ,  $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_x(\blacktriangle)$  y  $\text{EuB}_{100}(\blacktriangledown)$ , a concentración de 0,5% de EuE. En el eje X se presenta el porcentaje de grupos DMAE neutralizado con ácido clorhídrico.

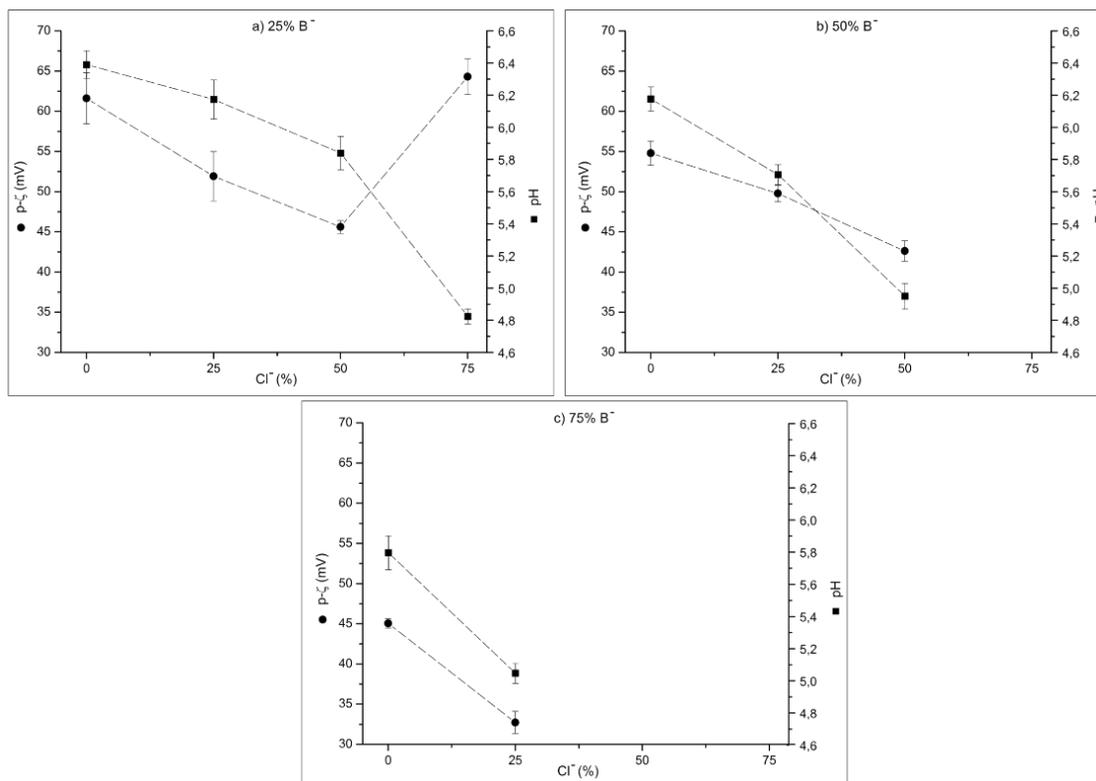


El descenso en el valor absoluto del potencial electrocinético cuando aumenta el porcentaje de condensación en el complejo es el comportamiento observado en la mayoría de este tipo de estudios [144,145,219,222] incluso para sistemas tipo CIPE [226], sin embargo la reducción no siempre es lineal, ya que depende en gran medida del polímero, como se observó en la investigación de Palena y Col [222] en el que los complejos obtenidos para los activos atenolol y lidocaína con el PE Eudragit® S100 presentaba una reducción lineal, mientras que los obtenidos con Eudragit® L100 no contaban con esta tendencia.

Para los resultados presentados en la Figura 3-21 se observa que la composición  $\text{EuB}_{25}\text{Cl}_{75}$  contó con un comportamiento diferente a lo esperado, esto se relaciona con el pH de la dispersión ya que es el de mayor acidez, por tanto, produce mayor protonación de los grupos DMAE del polímero, reflejado en un valor positivo y alto de  $p\text{-}\zeta$ ; lo que indica que para esta dispersión prima el efecto de la ionización del EuE sobre el efecto del apantallamiento de carga de los contraiones, especialmente de benzoato por su tamaño. Debido a la importancia de la variable pH en el estudio de la carga de superficie de CPE

en la Figura 3-22 se representaron en un mismo plano cartesiano, tanto los valores de  $p-\zeta$  como los de pH, para las series de complejos  $\text{EuB}_{25}$ ,  $\text{EuB}_{50}$  y  $\text{EuB}_{75}$ .

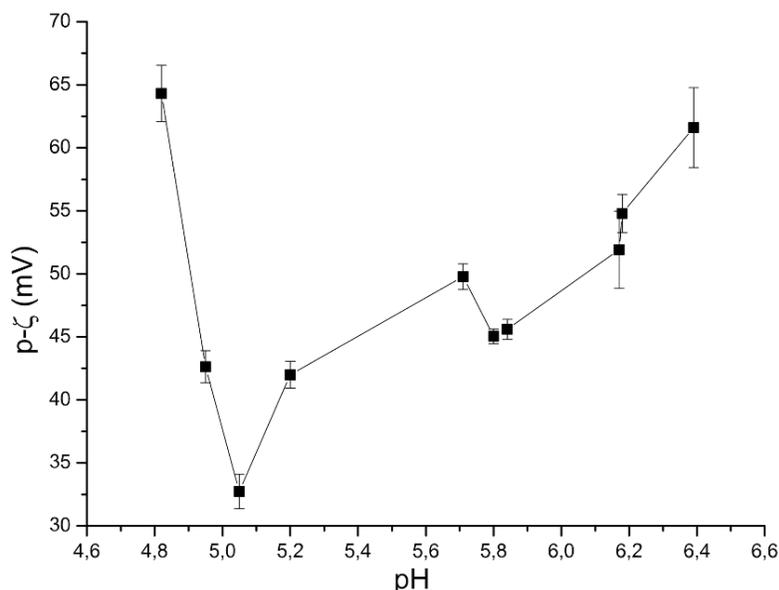
**Figura 3-22** Cambios en el  $p-\zeta$  y pH con el incremento de la proporción del contraión cloruro para las series de complejos: a)  $\text{B}_{25}$ , b)  $\text{B}_{50}$  y c)  $\text{B}_{75}$ .



En la figura se observa una tendencia general a la disminución de ambas variables  $-p-\zeta$  y  $\text{pH}$  con el aumento del porcentaje de grupos DMAE neutralizado con ácido clorhídrico, atribuida a la interacción iónica entre los iones cloruro y los grupos protonables del PE y a la acidez involucrada con la adición de ácido clorhídrico; sin embargo, el resultado de  $p-\zeta$  de  $\text{EuB}_{25}\text{Cl}_{75}$  fue atípico, aunque coincide con los hallazgos reportados por Salamanca y *col* [145] para el ionómero  $\text{EuCl}_{100}$  (utilizando la nomenclatura del presente estudio), en los que al evaluar el potencial zeta de la dispersión en un rango de pH entre 1,2 y 10 observaron cambios en la ionización de los grupos expuestos del ionómero y una posterior inversión en el potencial zeta correlacionado con el incremento en la aglomeración y agregación del sistema; para pH 5 registran un potencial de 60 mV, semejante a los resultados del complejo  $\text{EuB}_{25}\text{Cl}_{75}$ . Este mismo grupo de investigación encontró para el Eudragit E100, que el cambio en el potencial zeta es independiente del contraión que lo

acompaña pues obtuvieron perfiles “pot- $\zeta$  vs pH” muy parecidos para sistemas neutralizados con iones clorhidrato, formiato y acetato, lo que demostró que el pH influye en la naturaleza propia del polímero [249]. Teniendo en cuenta esta premisa se realizó la Figura 3-23 con el perfil “pot- $\zeta$  vs pH” a partir de los resultados de los 10 complejos diferentes, en la que se observa una reducción inicial del pseudo-potencial zeta hasta pH 5,05 y una posterior tendencia al aumento; sin embargo, el rango de pH abarcado fue bastante limitado (entre 4,8 y 6,4) y no permitió hacer deducciones generales sobre la influencia del pH en el p- $\zeta$ , más aún si se tiene en cuenta que este tipo de gráficas deben ser analizadas a la luz de la conformación del polímero, la carga de los grupos ionizables, las interacciones intramoleculares y con el solvente, los procesos de hidrólisis que pueden tener lugar, entre otros.

**Figura 3-23** Efecto del pH en el p- $\zeta$  para el EuE, a partir de los valores de las diez composiciones. Concentración del PE 0,5%, medio dispersante: NaCl 1mM en agua.



En función de los resultados asociados al Capítulo 4 (actividad antimicótica), se realizó la determinación de pseudo-potencial zeta para los diez CPE a condiciones de pH de 6,0 y concentración del 0,06 % de AB, los resultados se presentan en la Tabla 3-15, en esta se observa que los valores de p- $\zeta$  son semejantes entre complejos que tienen el mismo porcentaje de grupos DMAE neutralizado con AB y asimismo que, a medida que aumenta el AB en la composición, se incrementa el pseudo-potencial zeta. Para la apropiada interpretación de los resultados se realizó la Figura 3-24, en la que se graficó p- $\zeta$  vs % de

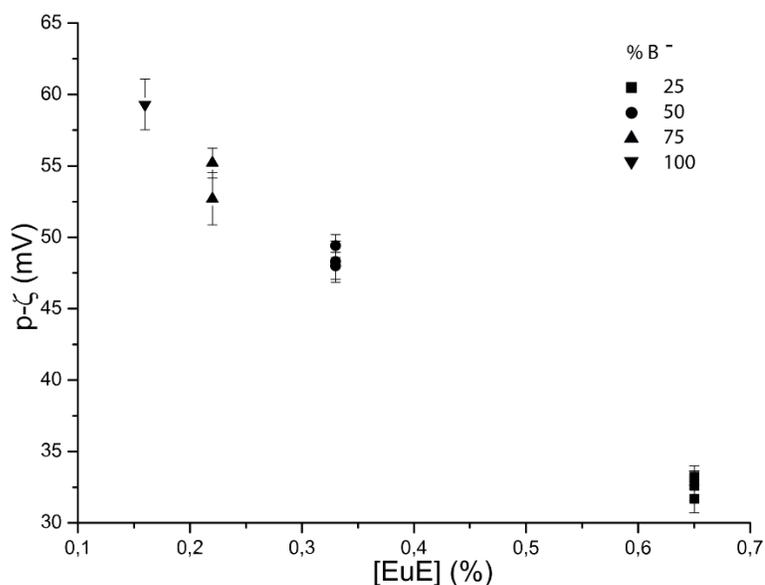
EuE, ya que a las condiciones de análisis las dispersiones contaban con concentraciones de polielectrolito diferentes. De la figura se deduce que a menor concentración de EuE, mayor es la carga de superficie, resultado que se encuentra en línea con lo reportado en otras investigaciones y que ha sido atribuido a que las concentraciones mayores incrementan la aglomeración y agregación del sistema [145].

**Tabla 3-15** Valores del pseudo-potencial zeta ( $p\text{-}\zeta$ ) para los diez complejos en dispersión (pH 6,0; concentración: al 0,06 % de AB; medio dispersante: solución de NaCl 1mM en agua) y concentración del PE a las condiciones del estudio.

	$p\text{-}\zeta$ (mV)	[EuE](%)
<b>EuB<sub>25</sub></b>	31,7 (3,1)	0,65
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>25</sub></b>	33,2 (2,4)	0,65
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>50</sub></b>	32,6 (3,2)	0,65
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>75</sub></b>	33,1 (1,5)	0,65
<b>EuB<sub>50</sub></b>	48,3 (3,0)	0,33
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>25</sub></b>	48,0 (2,0)	0,33
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub></b>	49,4 (1,6)	0,33
<b>EuB<sub>75</sub></b>	52,7 (3,5)	0,22
<b>EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub></b>	55,2 (1,9)	0,22
<b>EuB<sub>100</sub></b>	59,3 (3,0)	0,16

Entre paréntesis valores de coeficiente de variación (CV).

**Figura 3-24** Efecto de la concentración de EuE en el pot- $\zeta$ . Concentración: 0,06% AB, medio dispersante: NaCl 1mM en agua, ajuste de pH a 6,0.



Finalmente, merece la pena mencionar que la caracterización de la superficie de carga de los CPE puede ser útil para explicar fenómenos interesantes como su interacción con membranas biológicas tales como la mucosa gastrointestinal o la membrana celular de un microorganismo; en este sentido es una herramienta práctica para el diseño racional de sistemas bioadhesivos que direccionen un activo a un sitio específico de absorción o que incrementen su ingreso a nivel intracelular [119,144,154,226].

### **vii. Comportamiento de liberación del ácido benzoico**

La liberación de activos es evaluada tradicionalmente mediante el ensayo de disolución con los aparatos 1 —de canastilla— o 2 —de paleta—, sin embargo, para sistemas CPE en dispersión no es una opción apropiada por la dificultad que representa diferenciar el activo libre, del activo complejado utilizando técnicas de cuantificación sencillas como la espectrofotometría de ultravioleta. Por lo anterior, es frecuente la utilización de celdas bicompartimentales de difusión del tipo Franz, éstas fueron desarrolladas inicialmente como un modelo *in vitro* de absorción percutánea [250], pero debido a su simplicidad, confiabilidad y reproducibilidad fueron incorporadas en las metodologías de liberación de CPE en dispersión.

En la Figura 3-2 se representa una celda de Franz, la cual está compuesta por dos compartimentos: uno donador y otro receptor, separados por una membrana que permite evaluar la difusión de la molécula analito ya que solo permite su paso, mientras retiene el CPE. En la cámara superior se adiciona, la solución, dispersión o semisólido que contiene el activo en estudio y en el inferior se toman las muestras correspondientes (en periodos de tiempo establecidos), que luego son cuantificadas. Dentro de los parámetros a considerar para aplicar el método se encuentra la temperatura, el área de difusión, el tipo y naturaleza de la membrana, el medio del compartimento receptor y el aseguramiento de las condiciones sink, es decir condiciones alejadas de saturación del analito [156]. Los resultados suelen ser representados como perfiles de liberación, en los que se grafica la cantidad, concentración o porcentaje de activo “liberado” (aquel que pasa del compartimento donador al receptor) versus el tiempo analizado.

Para comprender los fenómenos que afectan la liberación de un activo se han desarrollado modelos matemáticos que permiten evaluar la cinética de difusión y establecer las variables dependientes o independientes del proceso, es así como el modelamiento del

perfil de liberación proporciona información sobre los mecanismos que lo gobiernan [251]. Aunque no existe un modelo que considere todos los eventos físicos y químicos que pueden ocurrir en un determinado sistema, algunos de los más comunes como: orden cero, primer orden, Higuchi y Korsmeyer-Peppas han logrado correlaciones interesantes; éstos fueron originariamente propuestos para el análisis de sistemas matriciales, sin embargo han sido aplicados exitosamente en sistemas dispersos [213]. En la Tabla 3-16 se presentan las ecuaciones asociadas a cada uno de éstos y las características que lo representan.

**Tabla 3-16** Modelos matemáticos comúnmente utilizados para analizar la cinética de liberación de activos.

Modelo	Ecuación	Características
<b>Orden cero</b>	$Q_t = Q_0 + k_0 t$	La liberación se da en función del tiempo a una velocidad constante, independiente de la concentración del activo.
<b>Orden uno</b>	$LnQ_t = LnQ_0 - k_1 t$	La cantidad liberada es proporcional a la cantidad de activo que permanece en el sistema matricial; por ello tiende a disminuir en función del tiempo
<b>Higuchi</b>	$Q_t = k_H t^{1/2}$	La liberación es directamente proporcional a la raíz cuadrada del tiempo
<b>Korsmeyer-Peppas</b>	$\frac{M_t}{M_\infty} = k_{kp} t^n$	Dependiendo del valor de n es posible establecer el mecanismo de liberación: <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ Difusión fickiano: <math>n = 0,5</math></li> <li>☞ Transporte anómalo: <math>0,5 &lt; n &lt; 1,0</math></li> <li>☞ Orden cero: <math>n = 1,0</math></li> <li>☞ Transporte tipo II: <math>n &gt; 1,0</math></li> </ul>

*Q<sub>t</sub>*: cantidad de activo liberado en tiempo *t*, *Q<sub>0</sub>*: cantidad inicial de activo (usualmente *Q<sub>0</sub>*=0), *k<sub>0</sub>*, *k<sub>1</sub>*, *k<sub>H</sub>* y *k<sub>kp</sub>*: constantes de liberación de cada modelo; *M<sub>t</sub>/M<sub>∞</sub>*: fracción de activo liberado en tiempo *t*, *n*: exponente de liberación [251].

Existen varios estudios de liberación de activos desde sistemas tipo CPE utilizando celdas de difusión bicompartimentales, en la Tabla 3-17 se presentan, a manera de ejemplo, veinte de ellos, en todos se utilizó membrana de diálisis de acetato de celulosa con peso molecular de corte de 12000 Dalton en virtud del peso molecular polimérico.

**Tabla 3-17.** Estudios de liberación de sistemas CPE en celdas de difusión bicompartimentales.

Autor	Año	Vol Donor (ml)	Vol Receptor (ml)	Vol Mues (ml)	Área difusión (cm <sup>2</sup> )	T (°C)	t <sub>final</sub> (h)	Técnica Analítica	Medio	Complejo estudiado	% Max liberado en agua	Modelo
Orienti <sup>1</sup> [252]	1996	3	50	N.R	12,57	37	48	UV	pH 2 y pH 8	Chi-Ind	N.R en agua	K-P
Jimenez Kairuz <sup>1</sup> [202]	2002	15	250	N.R	23,76	37	7	UV	H <sub>2</sub> O y NaCl	C-Li (HG)	33 %	<i>K</i> <sub>2y4h</sub>
Vilches <sup>1</sup> [43]	2002	20	500	3	23,76	37	6	UV	H <sub>2</sub> O y NaCl	C-Cip y C-Nor (HG)	7 %	Cero

<b>Jimenez Kairuz</b> <sup>1</sup> [140]	2003	15 g	250	5	23,76	37	8	UV	H <sub>2</sub> O y NaCl	C-Me (HG)	< 10 %	<i>K</i> <sub>2y4h</sub>
<b>Quinteros</b> [2]	2008	3	76	4	N.R.	37	6	UV	H <sub>2</sub> O y NaCl	EuE-B y EuE-S	20% B <5 % S	Higuchi
<b>Esteban</b> <sup>1</sup> [35]	2009	20	300	3	N.R.	37	8	HPLC	H <sub>2</sub> O y NaCl	C-Az (HG)	< 2%	N.R.
<b>Arduso</b> [141]	2010	4 g	75	4	4,52	37	6	UV	H <sub>2</sub> O y NaCl	At, Li y Me con C, EuL y EuS	< 10 %	K-P
<b>Baena</b> [156]	2011	3	75	1	6,50	37	6	UV	H <sub>2</sub> O	EuE-B	Entre 22 y 40 %	K-P
<b>Quinteros</b> [203]	2011	3	76	4	N. R.	37	7	UV	H <sub>2</sub> O y NaCl	EuE-Msz	60 %	N.R.
<b>Palena</b> [226]	2012	1 g	15	1	1,25	37	7	UV	H <sub>2</sub> O, NaCl, pH 6,8 pH 1,2	IPEC EuL-Fx-EuE (Fx: At, Pr y Me)	At: 18 % Pr: 12% Me: 24	K-P
<b>Quinteros</b> [212]	2012	3	76	4	N.R.	37	7	U.V	NaCl	EuE-Fx Fx: Flur, Nap, Ket, Ind, D.	N.R. en agua	Cero
<b>Guzmán</b> [71]	2012	4	70	4	N.R.	37	6	U.V	H <sub>2</sub> O, NaCl y FGS	EuE-Fx Fx: DP y B	DP y B < 10%	Cero
<b>Battistini</b> [219]	2013	1	17	0,9	N.R.	37	3	U.V	H <sub>2</sub> O	HiH-At	Entre 40 y 10%	N.R.
<b>Quinteros</b> [72]	2014	1	4	N.R.	0,79	35	2	UV	NaCl, FLS y pH 6,8	Eu-Flur	N.R en agua	K-P Higuchi Cero
<b>Ramirez-Rigo</b> [144]	2014	4	76	1,5	N.R.	37	7	HPLC-UV	H <sub>2</sub> O y NaCl	EuE-EnM	En: 26 % M: 20 %	Cero
<b>Battistini</b> [158]	2014	1	17	0,9	N.R.	37	3	UV	H <sub>2</sub> O y NaCl	HiH-Dx	20 %	N.R.
<b>Palena</b> [189]	2015	1	15	1	1,25	37	7	UV	H <sub>2</sub> O, NaCl, pH 6,8 pH 1,2	IPEC EuE-Fx50-EuL50 Fx: S, B, Ket y Nap	S: 4 % B: 11% Ket: 7% Nap: 7%	K-P
<b>Guzmán</b> [220]	2016	1	16	1	N.R.	37	5	UV	H <sub>2</sub> O, NaCl y FGS	EuE-Ris	<10%	N. R.
<b>García</b> [253]	2016	0,5 g	15	1	1,25	37	24	UV	H <sub>2</sub> O, NaCl y pH 6,8	DeP-Cip	< 10%	Higuchi
<b>Alarcón</b> [213]	2017	1	16	0,9	1,25	37	3	UV	H <sub>2</sub> O y NaCl	ADN-Fx Fx: Li, At, Pr	Li: 45 % At: 31% Pr: 21	Higuchi

<sup>1</sup>No son propiamente celdas de Franz, utilizaron un dispositivo de difusión bicompartimental que funciona bajo el mismo principio. **Convenciones:** **Vol Donor:** volumen en el compartimento donador; algunos estudios reportan el contenido en peso, estos fueron indicados en gramos (g). **Vol Receptor:** volumen en compartimento receptor; **Vol mues:** volumen tomado en los tiempos de muestreo; **Área difusión:** área de la membrana que separa los dos compartimentos; **T:** temperatura del ensayo; **Técnica analítica:** la utilizada para cuantificar el activo liberado; **Medio:** el empleado en el compartimento receptor Modelo: modelo cinético utilizado para estudiar la liberación. **N.R.:** no reportada; **pH 2:** buffer a pH 2; **pH 8:** buffer a pH 8; **H<sub>2</sub>O:** agua; **NaCl:** solución acuosa de NaCl al 0,9%; **pH 6,8:** buffer de fosfatos a pH 6,8; **pH 1,2:** solución de HCl a pH 1,2; **FGS:** fluido gástrico simulado; **FLS:** fluido lacrimal simulado; **Chi:** quitosano; **Ind:** indometacina; **HG:** hidrogel; **C:** carbómero; **Li:** lidocaína; **Cip:** ciprofloxacina; **Nor:** norfloxacina; **Me:** metoclopramida; **EuE:** Eudragit E; **B:** ácido benzoico; **S:** ácido salicílico; **Az:** azitromicina; **At:** atenolol; **EuS:** Eudragit S-100; **EuL:** Eudragit L-100; **Msz:** mesalazina; **IPEC:** complejo interpolielectrolito; **Fx:** fármaco o activo; **Pr:** propranolol; **Flur:** flurbiprofeno; **Nap:** naproxeno; **Ket:** ketoprofeno, **D:** diclofenaco; **DP:** dexametasona fosfato; **HiH:** ácido hialurónico; **EnM:** enalapril maleato; **Dx:** doxorubicina; **Ris:** risedronato; **DeP:** polímero dendronizado; K-P: Korsmeyer-Peppas; *K*<sub>2y4h</sub>: se determinó constante de velocidad entre 2 y 4 horas; **Cero:** cinética de orden cero.

A continuación, se presenta un análisis de las tendencias observadas para cada una de las variables incluidas en la tabla y las condiciones elegidas para los estudios de liberación realizados:

- ☞ Para los parámetros: volumen de compartimento donador, volumen de compartimento receptor, volumen de muestreo y área de difusión, se observa un amplio rango de valores, debido en parte a que los primeros estudios no fueron realizados propiamente en celdas de Franz sino en ensamblajes de naturaleza semejante y por ello registran valores de volumen receptor y área difusional especialmente mayores; en los demás estudios se encontraron los siguientes rangos: volumen donador: 0,5 ml a 4 ml; volumen receptor: 4 ml a 76 ml; volumen de muestreo: 0,9 ml a 4 ml y área difusional: 0,79 cm<sup>2</sup> a 6,50 cm<sup>2</sup> Para los análisis de liberación realizados a los complejos de la presente investigación se utilizaron celdas de Franz con volumen de compartimento receptor de 58 ml y área difusional de 3,51 cm<sup>2</sup>, su elección fue motivada por la alta solubilidad del ácido benzoico y su disponibilidad en el grupo de investigación. Para el volumen de muestreo se utilizó 1 ml y para el compartimento donador se estudiaron los valores de 5 ml, 0,5 ml y 1,0 ml.
- ☞ La temperatura utilizada fue de 37 °C para la mayoría de los estudios presentados, solo cambió, a 35 °C, en uno de ellos por tratarse de un sistema diseñado para liberación ocular; esto evidencia la importancia de la vía de administración y de la funcionalidad del sistema en la elección del valor de temperatura. Por lo anterior, en la presente investigación se seleccionó 25 °C, ya que el ácido benzoico cuenta con actividad antimicótica, la cual fue evaluada a 25 °C y a 35° C. Se eligió el menor valor porque es el peor caso, es decir en el que se alcanza un menor porcentaje de liberación del activo.
- ☞ En cuanto al tiempo final de análisis, se observa en la Tabla 3-17 un rango entre 2 y 48 horas, con una mayor preponderancia de estudios entre 6 y 8 horas, se eligió el de 8 horas por ser un valor intermedio y suficiente para estudiar la cinética de liberación.
- ☞ Respecto a la técnica de cuantificación del activo se empleó la de mayor uso en este tipo de estudios: espectrofotometría de ultravioleta, por su practicidad y

rapidez, especialmente útil para la cantidad de muestras generadas por cada análisis y sus triplicados; además porque ya se había reportado para complejos entre Eudragit E 100® y ácido benzoico con resultados óptimos [2,156,189].

- ☞ Para la sección relacionada con los medios utilizados en el compartimento receptor se encuentra que agua y solución de NaCl al 0,9 % son los de principal estudio, seguidos de algunas soluciones buffer —a pH biológicamente relevantes— y algunos fluidos simulados (gástrico o lacrimal). Para el presente estudio se evaluó agua y buffer de fosfatos a pH 6,0 y 6,9 para correlacionar los resultados con la actividad antimicótica determinada a este pH.
- ☞ Los modelos matemáticos más utilizados para analizar la cinética de liberación de activos desde CPE —según se observa en la tabla— son: orden cero, Higuchi y Korsmeyer-Peppas, debido a esto todos los perfiles fueron analizados a la luz de éstos tres, también se incluyó el de orden uno.

Los ensayos de liberación se realizaron en cinco etapas en función del volumen y de la concentración del complejo en el compartimento donador, asimismo del medio utilizado en el compartimento receptor. Los resultados se presentan a continuación:

**Etapa 1: Vol donador: 5 ml, concentración de complejo: 0,5 % de EuE y Medio: agua.**

Debido a la importancia de asegurar las condiciones “sink”, se realizaron los respectivos cálculos para establecer que tan alejados de la saturación se encontraban las celdas estudiadas. En la Tabla 3-18 se presenta la información relacionada con la máxima concentración que se podría alcanzar en el compartimento receptor si pasará el 100 % del activo y además se incluye la solubilidad del AB al pH que registraría esta solución; así se determinó a cuantas veces de la saturación estaba cada sistema, por ejemplo, para el complejo EuB<sub>25</sub> se encontró que estaba a 124 veces de la saturación o en otras palabras 124 veces diluido respecto a la solución saturada. La USP establece para el ensayo de disolución que las condiciones en exceso de medio se dan cuando el volumen es por lo menos tres veces el requerido para formar una solución saturada del fármaco [168], en este sentido se observa que para las diez composiciones de complejo se garantizaron las condiciones “sink” y que en el peor de los casos (EuB<sub>100</sub>) se contó con 26 veces más de solvente que el de la saturación.

**Tabla 3-18** Condiciones sink de los ensayos de liberación de la Etapa 1 (Vol donador: 5ml, concentración de complejo: 0,5 % de EuE y medio: agua).

Complejo	AB donador (mg) <sup>1</sup>	Conc t=∞ (mg/ml) <sup>2</sup>	pH <sup>3</sup>	So de AB (mg/ml) <sup>4</sup>	Veces saturación <sup>5</sup>
<b>EuB<sub>25</sub></b>	2,30	0,04	3,84	4,90	124
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>25</sub></b>	2,30	0,04	3,84	4,90	124
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>50</sub></b>	2,30	0,04	3,84	4,90	124
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>75</sub></b>	2,30	0,04	3,84	4,90	124
<b>EuB<sub>50</sub></b>	4,59	0,08	3,69	4,46	56
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>25</sub></b>	4,59	0,08	3,69	4,46	56
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub></b>	4,59	0,08	3,69	4,46	56
<b>EuB<sub>75</sub></b>	6,89	0,12	3,61	4,27	36
<b>EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub></b>	6,89	0,12	3,61	4,27	36
<b>EuB<sub>100</sub></b>	9,18	0,16	3,54	4,15	26

<sup>1</sup>Miligramos de ácido benzoico en el compartimento receptor en el t=0. <sup>2</sup>máxima concentración de ácido benzoico posible en el compartimento receptor asumiendo el 100% de la liberación, <sup>3</sup>pH de la solución de AB a la máxima concentración posible; <sup>4</sup>solubilidad del AB al pH calculado; <sup>5</sup>relación entre la solubilidad (concentración de saturación) y la concentración máxima posible.

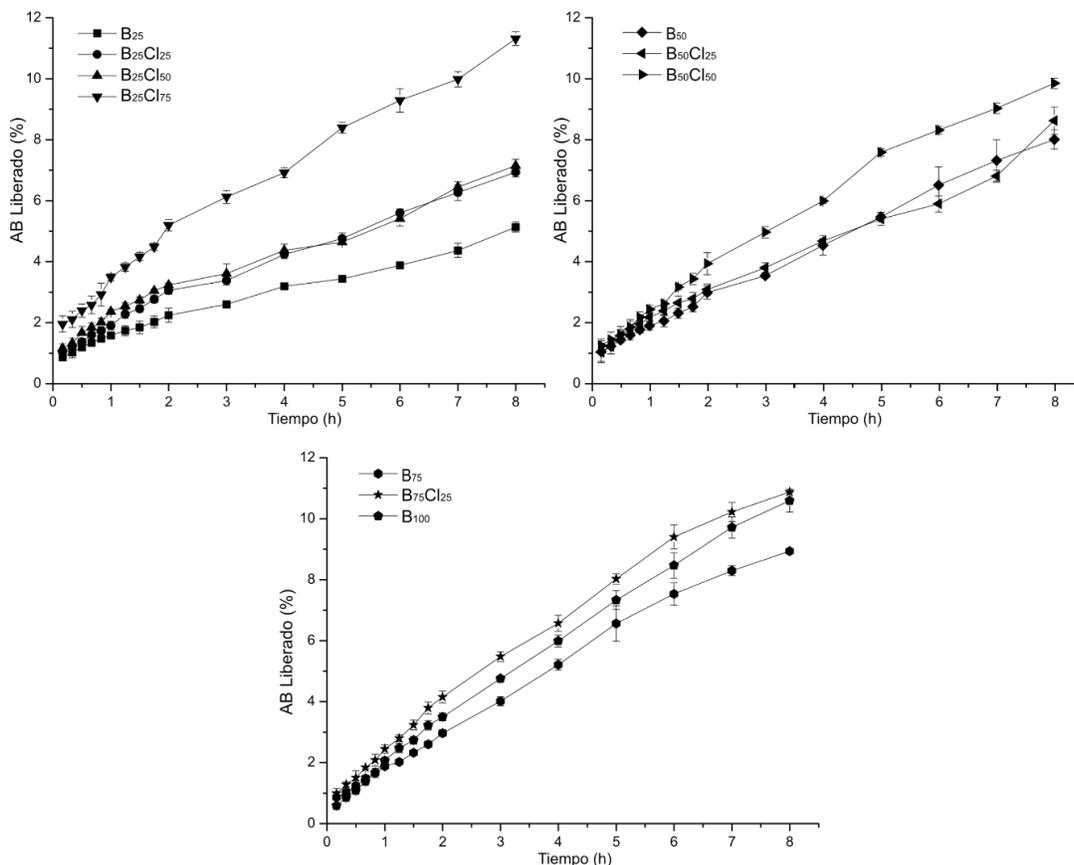
Los perfiles de liberación acumulativa de AB se presentan en la Figura 3-25, en donde se observa que los valores en porcentaje fueron bajos para las diez composiciones, de hecho ninguno superó el 12 %, resultados que están en línea con lo reportado por las investigaciones de Palena y Guzmán [71,189] para complejos entre EuE y AB, en los que el porcentaje fue de 11 y 9 respectivamente. La baja tasa de liberación de activos desde dispersiones de CPE en agua ha sido utilizada como evidencia de la fuerte interacción entre el polielectrolito y el activo [35,43].

Como se representó en la Figura 3-16 la membrana de diálisis utilizada en este tipo de estudios permite el paso de especies de bajo peso molecular entre compartimentos e impide la difusión del PE y del CPE hacia el medio receptor. En teoría la liberación del activo se da tanto por la especie disociada ( $A^-$  o  $AH^+$ ) como la no disociada ( $A$ ), sin embargo Jimenez-Kairuz y *col* [202] establecieron que el mecanismo de liberación ocurre principalmente por la difusión de la especie neutra del activo, ya que la ionizada es retenida mediante interacción electrostática por el PE, en consecuencia la velocidad de difusión de  $A$  es mayor que la de  $A^-$  o  $AH^+$ . Tan pronto como  $A$  difunde lejos del entorno del complejo, el equilibrio se reestablece y provee rápidamente de “nuevo  $A$ ”, por ello el CPE actúa como reservorio del activo.

La teoría de Jimenez-Kairuz y *col* se corrobora mediante el estudio de los resultados de liberación, del pH de las dispersiones estudiadas y del  $pK_a$  del activo; por ello para la

presente investigación se realizó la Tabla 3-19 en la que se resumen los valores de liberación de AB y de pH para las diez dispersiones de complejos. En la tabla se observa una estrecha relación entre el pH inicial del compartimento donador ( $t=0$ ) y el porcentaje liberado, pues aquellas dispersiones con valores de pH muy superior al  $pK_a$  de AB (4,2), como  $\text{EuB}_{25}$  y  $\text{EuB}_{25}\text{Cl}_{25}$ , son las que alcanzaron las menores tasas de liberación y viceversa; esto ocurre porque la proporción de la especie dissociada (benzoato o  $\text{B}^-$ ) aumenta a medida que el pH se aleja por encima del  $pK_a$ , de modo que no está disponible para difundir hacia el medio receptor porque es retenida por el PE mediante interacción iónica; bajo este mismo razonamiento se deduce por qué las dispersiones de complejos como  $\text{EuB}_{25}\text{Cl}_{75}$  o  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$  presentaron las liberaciones mayores, pues al contar con valores de pH más cercanos al  $pK_a$ , la proporción de la especie neutra (BH) aumenta y consigo su difusión al compartimento receptor.

**Figura 3-25** Perfiles de liberación acumulativa de ácido benzoico en agua, para las dispersiones de los diez complejos al 0,5 % de EuE, con volumen de compartimento donador de 5 ml.



**Tabla 3-19** Valores de porcentaje máximo liberado de AB (en  $t=8h$ ) y de pH relacionados con los ensayos de liberación de la etapa 1 (Vol donador: 5ml, concentración complejo: 0,5 % de EuE y medio: agua). El pH del medio receptor (agua miliq) en  $t=0$  fue 5,60 (0,21).

Complejo	% de AB liberado ( $t=8h$ )	pH donador ( $t=0$ )	pH donador ( $t=8h$ )	pH receptor ( $t=8h$ )
<b>EuB<sub>25</sub></b>	5,14 (3,21)	6,39 (0,44)	6,48 (0,62)	5,48 (0,57)
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>25</sub></b>	6,94 (2,33)	6,17 (0,65)	6,25 (0,24)	4,94 (0,35)
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>50</sub></b>	7,15 (2,90)	5,84 (0,59)	5,91 (0,35)	4,73 (0,49)
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>75</sub></b>	11,32 (1,99)	4,82 (0,32)	5,39 (0,57)	4,27 (0,71)
<b>EuB<sub>50</sub></b>	8,03 (3,97)	6,18 (0,41)	6,29 (0,48)	5,14 (0,30)
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>25</sub></b>	8,65 (5,23)	5,71 (0,36)	5,84 (0,40)	4,82 (0,41)
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub></b>	9,87 (1,73)	4,95 (0,53)	5,46 (0,28)	4,77 (0,93)
<b>EuB<sub>75</sub></b>	8,93 (0,80)	5,80 (0,61)	5,98 (0,49)	4,79 (0,91)
<b>EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub></b>	10,88 (0,14)	5,05 (0,41)	5,46 (0,46)	4,62 (0,57)
<b>EuB<sub>100</sub></b>	10,59 (3,57)	5,20 (0,84)	5,55 (0,81)	4,61 (0,25)

Entre paréntesis valores de coeficiente de variación (CV)

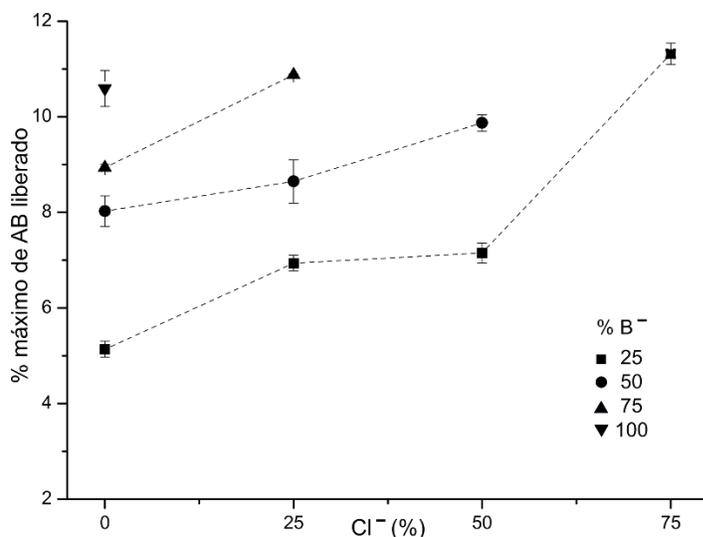
En cuanto a los valores de pH de compartimento donador y receptor en  $t=8h$ , se observó que fueron consecuentes con los resultados de liberación:

- ☞ Para el compartimento donador se presentó —en todos los casos— un aumento de pH, debido a la difusión de AB hacia el medio receptor, el cual fue de mayor magnitud para las dispersiones en las que ocurrió una mayor liberación como EuB<sub>25</sub>Cl<sub>75</sub>.
- ☞ Para el compartimento receptor se registró disminución en el valor de pH, debido —igualmente— al paso de AB hacia este medio, por ello las dispersiones con liberaciones más altas fueron las de menor pH.

Con el fin de analizar el efecto de la composición de los complejos en la liberación de AB se elaboró la Figura 3-26 donde se presentan los porcentajes alcanzados al finalizar el ensayo. Para las composiciones sin neutralización adicional con HCl, es decir los ubicados en el eje  $X = 0$  se observa que a medida que aumenta la proporción de iones benzoato, también aumenta el porcentaje liberado; esto es debido principalmente al efecto del pH de la dispersión descrito previamente y también a lo que Quinteros y *col* denominaron como “un cambio en el carácter hidrofílico del complejo”, como consecuencia del incremento en el porcentaje de neutralización y el cual demostraron mediante ensayos de absorción de agua [203]. Para las demás composiciones se observa que, al aumentar el porcentaje neutralizado con HCl, la liberación también se incrementó, tal comportamiento está en línea

con el pH de las dispersiones, pues la acidez relacionada con la adición del ácido inorgánico aumenta la proporción de la especie neutra del AB y su respectiva difusión.

**Figura 3-26** Valores de porcentaje máximo liberado de AB en agua (en  $t=8h$ ), para las dispersiones al 0,5 % de EuE, con volumen de compartimento donador de 5 ml de los complejos:  $\text{EuB}_{25}\text{Cl}_x$  (■),  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_x$  (●),  $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_x$  (▲) y  $\text{EuB}_{100}$  (▼). En el eje X se presenta el porcentaje de grupos DMAE neutralizado con ácido clorhídrico.



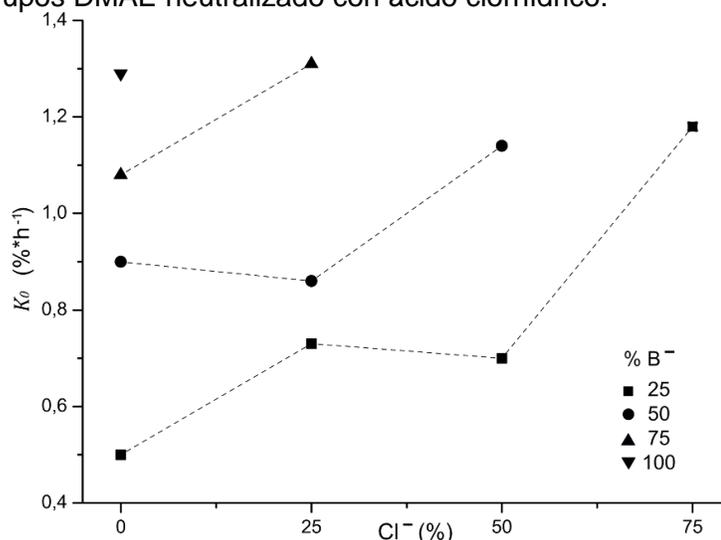
Finalmente, se evaluó el ajuste de los perfiles de liberación de esta etapa con los modelos matemáticos de orden cero, orden uno, Higuchi y Korsmeyer-Peppas, con el objetivo de identificar los mecanismos que gobiernan la cinética de liberación del AB desde las dispersiones de los complejos evaluados. Para ello se tuvieron en cuenta las ecuaciones planteadas en la Tabla 3-16 empleando unidades de porcentaje de liberación para orden cero, uno y Higuchi, mientras que, para Korsmeyer-Peppas se utilizaron unidades en fracción liberada, como lo establece su ecuación. En la Tabla 3-20 se registran las constantes de velocidad calculadas para cada modelo y sus respectivos coeficientes de determinación, a partir de estos últimos se encontró que el orden cero fue el de mayor ajuste a los perfiles obtenidos y en efecto las constantes de velocidad ( $K_0$ ) mantuvieron una tendencia semejante a la presentada para el “% máximo de AB liberado” como se observa en la Figura 3-27 la cual guarda bastante relación con la Figura 3-26 cuyos resultados fueron descritos previamente. Según el modelo matemático de orden cero la liberación del agente activo solo depende del tiempo, ya que el proceso toma lugar a una velocidad constante independiente de la concentración del activo [251]. Para CPE se ha reportado liberación de este orden en investigaciones de sistemas entre: carbómero y los

fármacos ciprofloxacina y norfloxacina [43] y entre EuE y los activos: ácido salicílico, ketoprofeno, naproxeno, diclofenaco, flurbiprofeno, indometacina, fosfato de dexametasona, enalapril maleato [35,71,144,212]; de estos estudios desatacan los hallazgos de Vilches y *col* en los que relacionan el modelo de liberación de orden cero con la mayor capacidad amortiguadora del sistema, que contribuye a mantener más estable el pH y los equilibrios involucrados [43].

**Tabla 3-20** Parámetros y coeficientes de determinación de varios modelos cinéticos de liberación para la dispersión de complejos entre EuE y AB, a las condiciones de la etapa 1 (al 0,5 % de EuE, con volumen de compartimento donador de 5 ml y medio receptor: agua).

	Orden cero		Orden uno		Higuchi		Korsmeyer-Peppas		
	$K_0$ %*h <sup>-1</sup>	R <sup>2</sup>	$K_1$ h <sup>-1</sup>	R <sup>2</sup>	$K_H$ %*h <sup>-0.5</sup>	R <sup>2</sup>	n	$K_{k-p}$ h <sup>-n</sup>	R <sup>2</sup>
<b>EuB<sub>25</sub></b>	0,50	0,989	-0,20	0,903	1,65	0,980	0,46	0,0166	0,980
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>25</sub></b>	0,73	0,990	-0,22	0,891	2,42	0,984	0,52	0,0209	0,979
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>50</sub></b>	0,70	0,981	-0,20	0,874	2,33	0,978	0,48	0,0233	0,984
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>75</sub></b>	1,18	0,986	-0,21	0,891	3,93	0,988	0,50	0,0360	0,971
<b>EuB<sub>50</sub></b>	0,90	0,998	-0,25	0,930	2,93	0,966	0,56	0,0213	0,962
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>25</sub></b>	0,86	0,987	-0,23	0,896	2,82	0,962	0,54	0,0226	0,982
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub></b>	1,14	0,990	-0,25	0,893	3,77	0,983	0,59	0,0266	0,973
<b>EuB<sub>75</sub></b>	1,08	0,996	-0,29	0,906	3,55	0,971	0,66	0,0204	0,973
<b>EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub></b>	1,31	0,990	-0,28	0,862	4,35	0,986	0,67	0,0260	0,989
<b>EuB<sub>100</sub></b>	1,29	0,996	-0,32	0,836	4,26	0,983	0,78	0,0204	0,996

**Figura 3-27** Valores de constante de velocidad de orden cero ( $K_0$ ) para las dispersiones al 0,5 % de EuE, medio receptor agua y volumen de compartimento donador de 5 ml de los complejos: EuB<sub>25</sub>Cl<sub>x</sub>(■), EuB<sub>50</sub>Cl<sub>x</sub>(●), EuB<sub>75</sub>Cl<sub>x</sub>(▲) y EuB<sub>100</sub>(▼). En el eje X se presenta el porcentaje de grupos DMAE neutralizado con ácido clorhídrico.



En cuanto a los demás modelos de liberación evaluados, se observa que el más alejado a los perfiles obtenidos fue el de orden uno, esto es debido a que este modelamiento matemático fue diseñado para la liberación de activos desde matrices sólidas porosas, de hecho para ninguna de las etapas posteriores de los estudios de liberación se obtuvieron coeficientes de determinación de mayor valor (resultados no incluidos), por eso los datos relacionados con orden uno fueron omitidos en el registro de los resultados del modelamiento matemático de las demás etapas.

Puesto que en la revisión de la literatura se encontraron porcentajes más altos de liberación del activo para complejos formados entre EuE y AB en las investigaciones de Quinteros y Baena [2,156], se analizaron los cambios entre estudios y se encontró que la diferencia principal radicaba en el volumen del compartimento donador, por ello se procedió a la etapa 2, ya que tasas más altas de liberación permiten obtener resultados con una interpretación más precisa de la cinética involucrada., además porque los coeficientes de determinación para los modelos de Higuchi y Korsmeyer-Peppas también fueron bastante altos.

**Etapa 2: Vol donador: 1 ml, concentración de complejo: 0,5 % de EuE y Medio: agua.**

Al reducir el volumen del compartimento donador —conservando las demás condiciones intactas— se encontró que la cantidad de ácido benzoico que difundía hacia el compartimento receptor no disminuía en proporción directa con la reducción de volumen; por ello, en términos de “porcentaje de liberación” se registró un aumento, ya que la cantidad de AB total introducida en el ensayo era menor; este comportamiento se presentó al evaluar volúmenes donadores de 0,5 ml y 1,0 ml en estudios preliminares, sin embargo se definió el volumen de 1 ml como el adecuado para realizar los estudios a las diez dispersiones de los complejos porque a 0,5 ml se presentó una variabilidad mayor en los resultados (gráficas no incluidas).

En primer lugar, se corroboró que los ensayos contaran con condiciones sink, para ello se hicieron los mismos cálculos que para la etapa 1, cuyos resultados se incluyen en la Tabla 3-21; como era de esperarse, se encontraban más alejados de la saturación que los primeros ensayos, ya que contaban con una quinta parte de la cantidad del activo. En la tabla se observa que los sistemas se encontraban entre 160 y 851 veces diluidos respecto a la solución saturada de AB.

**Tabla 3-21** Condiciones sink de los ensayos de liberación de la etapa 2 (Vol donador: 1ml, concentración de complejo: 0,5 % de EuE y medio: agua).

Complejo	AB donador (mg) <sup>1</sup>	Conc t=∞ (mg/ml) <sup>2</sup>	pH <sup>3</sup>	So de AB (mg/ml) <sup>4</sup>	Veces saturación <sup>5</sup>
<b>EuB<sub>25</sub></b>	0,46	0,01	4,19	6,75	851
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>25</sub></b>	0,46	0,01	4,19	6,75	851
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>50</sub></b>	0,46	0,01	4,19	6,75	851
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>75</sub></b>	0,46	0,01	4,19	6,75	851
<b>EuB<sub>50</sub></b>	0,92	0,02	4,04	5,77	365
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>25</sub></b>	0,92	0,02	4,04	5,77	365
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub></b>	0,92	0,02	4,04	5,77	365
<b>EuB<sub>75</sub></b>	1,38	0,02	3,96	5,34	225
<b>EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub></b>	1,38	0,02	3,96	5,34	225
<b>EuB<sub>100</sub></b>	1,84	0,03	3,89	5,08	160

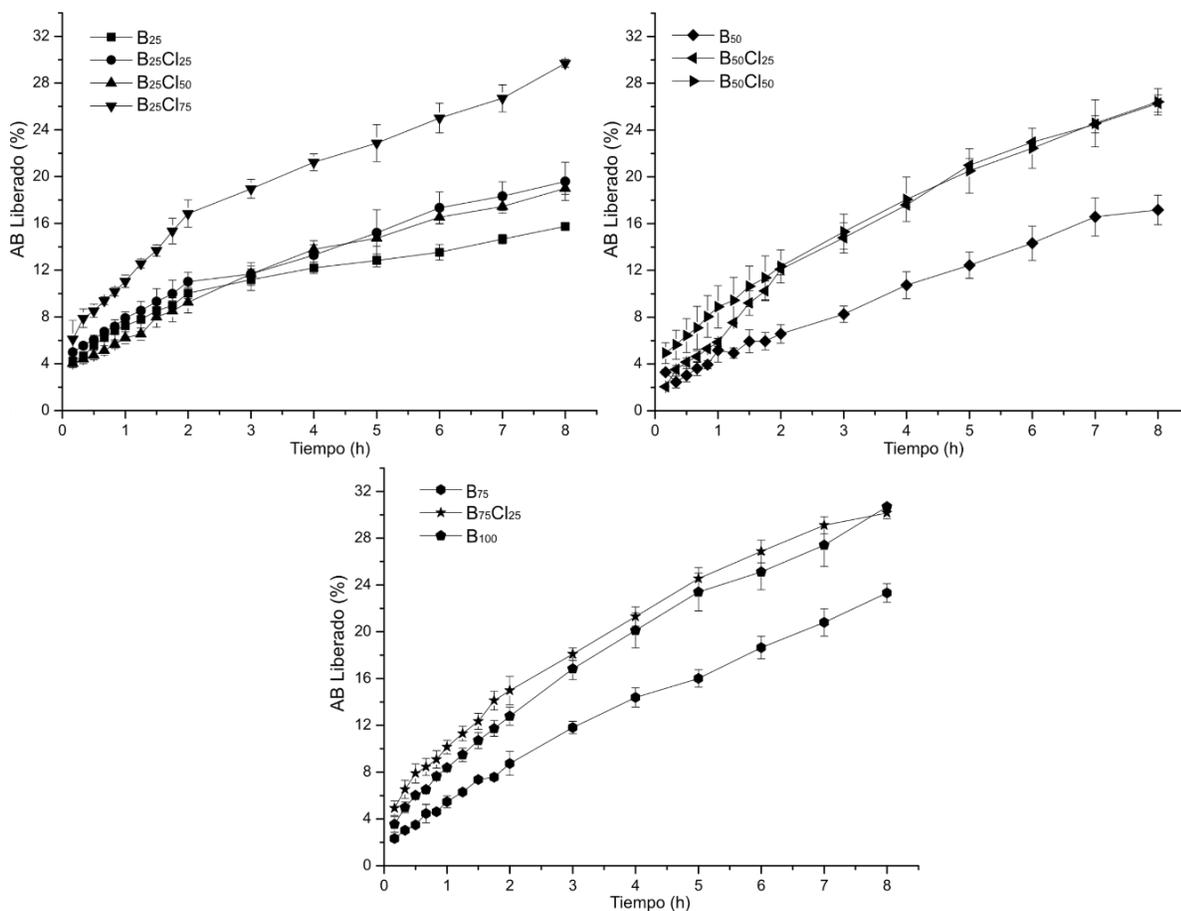
<sup>1</sup>Miligramos de ácido benzoico en el compartimento receptor en el t=0. <sup>2</sup>máxima concentración de ácido benzoico posible en el compartimento receptor asumiendo el 100% de la liberación, <sup>3</sup>pH de la solución de AB a la máxima concentración posible; <sup>4</sup>solubilidad del AB al pH calculado; <sup>5</sup>relación entre la solubilidad (concentración de saturación) y la concentración máxima posible.

En la Figura 3-28 se presentan los perfiles de liberación acumulativa de AB para las diez dispersiones al reducir el volumen del compartimento donador a 1ml. En todos los perfiles se observa un aumento —de aproximadamente tres veces— en el porcentaje final de AB liberado, si se compara con el alcanzado para volumen donador de 5 ml. En términos generales se advierte que las tendencias en la liberación se mantienen, es decir aquellas composiciones que registraron los valores más altos fueron las mismas en los dos ensayos y asimismo para las de menor liberación, esto es debido a que el pH de las dispersiones estudiadas no fue alterado y como se explicó previamente es uno de los factores de mayor impacto en el comportamiento de liberación. Como principales diferencias se encontró que el perfil de EuB<sub>50</sub>Cl<sub>25</sub> en esta etapa fue de mayor similitud al de EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub> y no al de EuB<sub>50</sub> como en la etapa previa; también se encontró que el perfil de liberación de EuB<sub>75</sub> en este caso fue mucho menor que el de EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub>.

Para una mejor interpretación de los resultados se realizó el análisis mediante el modelamiento matemático de los perfiles obtenidos, en la Tabla 3-22 se incluyen las constantes de velocidad y los coeficientes de determinación (R<sup>2</sup>) para los modelos cinéticos estudiados. Para esta etapa se evidenció que el orden cero no fue el de mayor ajuste—salvo para EuB<sub>50</sub> y EuB<sub>75</sub>—, en cambio el modelo de Higuchi fue el que arrojó los valores de R<sup>2</sup> más altos, sugiriendo que la difusión es el mecanismo que gobierna el proceso de liberación, tal y como ya se había reportado para sistemas tipo CPE entre EuE y AB [2], un polímero dendronizado y ciprofloxacina [253] y para complejos entre ADN y

los fármacos: lidocaína, atenolol y propranolol [213]. Las diferencias en el modelo cinético de mejor ajuste a los perfiles, debidas al volumen del compartimento donador, fueron atribuidas al cambio en el porcentaje de liberación, pues a valores más bajos es más probable que las tendencias de liberación pasen inadvertidas, incluso para modelos como el de Korsmeyer-Peppas se recomienda que la liberación se encuentre entre el 10% y el 60% del activo [251].

**Figura 3-28** Perfiles de liberación acumulativa de ácido benzoico en agua, para las dispersiones de los diez complejos al 0,5 % de EuE, con volumen de compartimento donador de 1 ml.

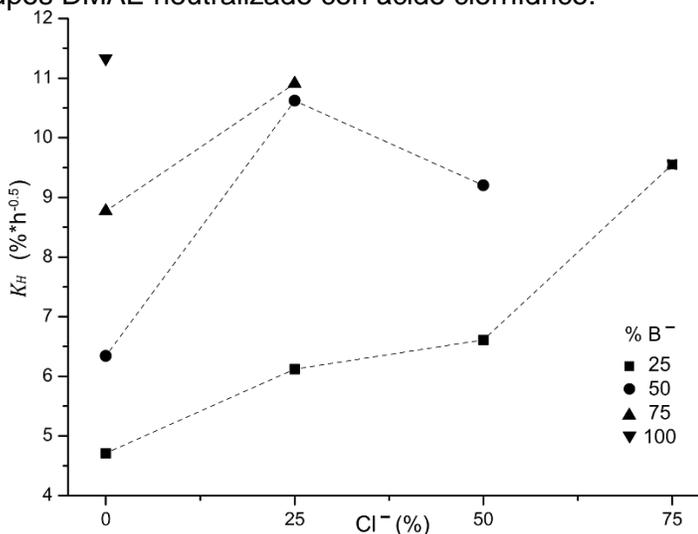


**Tabla 3-22** Parámetros y coeficientes de determinación de varios modelos cinéticos de liberación para la dispersión de complejos entre EuE y AB, a las condiciones de la etapa 2 (al 0,5 % de EuE, con volumen de compartimento donador de 1 ml y medio receptor: agua).

	Orden cero		Higuchi		Korsmeyer-Peppas		
	$K_0$ %*h <sup>-1</sup>	R <sup>2</sup>	$K_H$ %*h <sup>-0.5</sup>	R <sup>2</sup>	n	$K_{k-p}$ h <sup>-n</sup>	R <sup>2</sup>
<b>B<sub>25</sub></b>	1,37	0,927	4,71	0,989	0,36	0,0733	0,992
<b>B<sub>25</sub>Cl<sub>25</sub></b>	1,83	0,976	6,12	0,992	0,38	0,0825	0,976
<b>B<sub>25</sub>Cl<sub>50</sub></b>	1,97	0,974	6,61	0,990	0,46	0,0676	0,961
<b>B<sub>25</sub>Cl<sub>75</sub></b>	2,82	0,955	9,55	0,994	0,42	0,1178	0,991
<b>B<sub>50</sub></b>	1,93	0,992	6,34	0,969	0,53	0,0500	0,922
<b>B<sub>50</sub>Cl<sub>25</sub></b>	3,16	0,968	10,62	0,994	0,68	0,0671	0,991
<b>B<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub></b>	2,76	0,984	9,20	0,994	0,47	0,0916	0,979
<b>B<sub>75</sub></b>	2,65	0,992	8,77	0,986	0,63	0,0582	0,988
<b>B<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub></b>	3,25	0,973	10,91	0,997	0,49	0,1072	0,993
<b>B<sub>100</sub></b>	3,40	0,983	11,33	0,994	0,57	0,0884	0,994

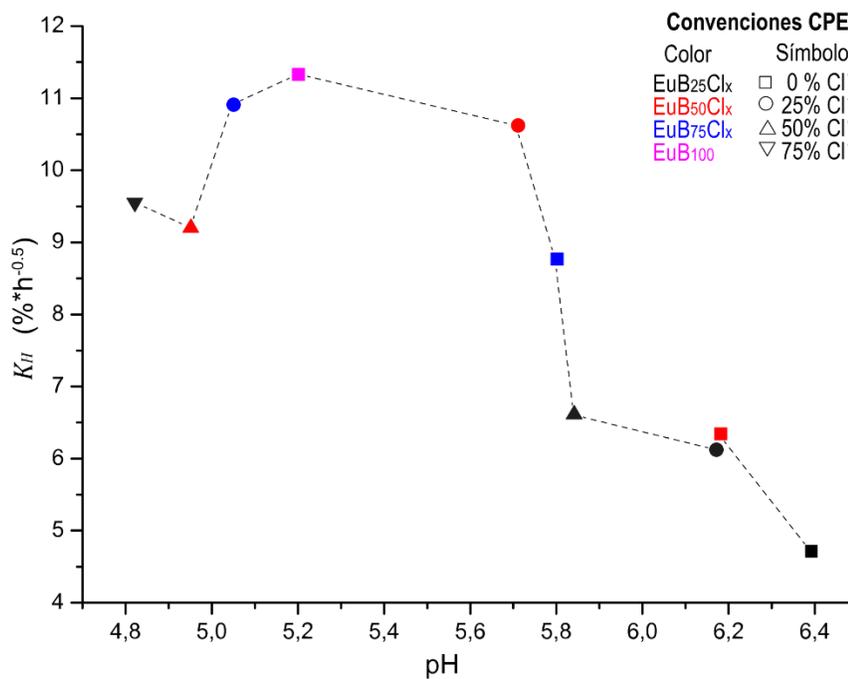
Con el objetivo de analizar la velocidad de liberación de las diez dispersiones se elaboró la Figura 3-29, en la que se grafica el valor de  $K_H$  para las diferentes composiciones. Se observa que las tendencias observadas en la etapa 1 se mantienen, es decir que al aumentar el porcentaje de contraiones —ya sea de benzoato o cloruro—se incrementa la velocidad de liberación, hecho que fue asociado con el pH del sistema, como se explicó previamente.

**Figura 3-29** Valores de constante de velocidad de Higuchi ( $K_H$ ) para las dispersiones al 0,5 % de EuE, medio receptor agua y volumen de compartimento donador de 1 ml de los complejos: EuB<sub>25</sub>Cl<sub>x</sub>(■), EuB<sub>50</sub>Cl<sub>x</sub>(●), EuB<sub>75</sub>Cl<sub>x</sub>(▲) y EuB<sub>100</sub>(▼). En el eje X se presenta el porcentaje de grupos DMAE neutralizado con ácido clorhídrico.



Para corroborar el efecto del pH en la liberación de AB se realizó la Figura 3-30, en la que se graficó la constante de velocidad de Higuchi en función del pH inicial para las diez dispersiones analizadas, es decir, cada punto representa la  $K_H$  y el pH de cada composición. En la figura se observa una tendencia a disminuir la velocidad de liberación al aumentar el pH, resultado que está en línea con la teoría que establece que las dispersiones en las que el pH favorece una mayor ionización del ácido débil cuentan con las menores tasas de liberación porque la molécula disociada es retenida en una mayor proporción mediante la formación del par iónico con el PE. No obstante, en la figura se observa que los puntos correspondientes a las dispersiones de mayor acidez (EuB<sub>25</sub>Cl<sub>75</sub> y EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub>) se desvían de la tendencia general, demostrando la existencia de otras variables en la velocidad de liberación a parte del pH.

**Figura 3-30** Valores de constante de velocidad de Higuchi ( $K_H$ ) vs pH para las dispersiones al 0,5 % de EuE, medio receptor agua y volumen de compartimento donador de 1 ml



Esta etapa de estudios evidenció el gran efecto del volumen de compartimento donador en el porcentaje liberado del activo. Este hallazgo es relevante porque no hay información reportada al respecto y además porque se demostró que las condiciones sink no son el único factor que limita el proceso de liberación, existe un efecto que podría relacionarse con la geometría de las celdas de Franz, es decir que no es recomendable utilizar un

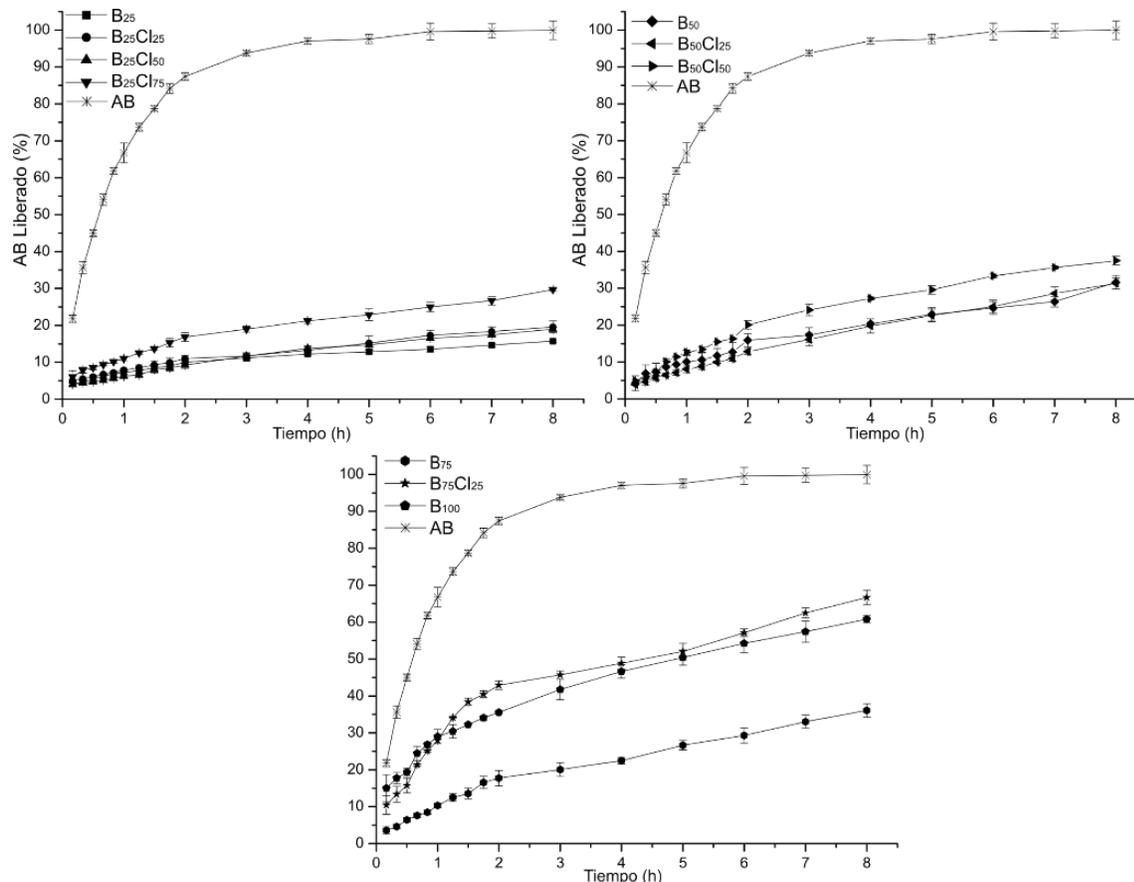
volumen muy alto en el compartimento donador porque se dificulta la difusión del activo que queda en la superficie de la dispersión, por ello a un volumen más bajo el porcentaje de liberación fue mayor.

**Etapa 3: Vol donador: 1 ml; Medio: agua y concentración de complejo: a 0,046 % de AB**

Dado que los estudios de actividad antimicótica de los complejos se realizan en función de la concentración de AB, se consideró de gran importancia realizar ensayos de liberación a un mismo valor de este parámetro; para ello se aprovechó que los cuatro complejos neutralizados al 25 % de los grupos DMAE con AB contaban con una misma concentración y solo se ejecutaron los seis ensayos faltantes a tal condición (0,046 % de AB).

En esta etapa no fue necesario determinar las condiciones sink, ya que corresponden a lo registrado en la Tabla 3-21 para los complejos de la tanda EuB<sub>25</sub>, es decir, a 851 veces de la saturación. Aprovechando que todas las dispersiones se analizaron a la misma concentración del activo, se evaluó como referencia la liberación de la solución de AB a las mismas condiciones que los complejos. En la Figura 3-31 se presentan los perfiles para las diez dispersiones y para la solución de AB (la cual fue incluida en cada una de las tres gráficas), los resultados corroboran el efecto modulador en la liberación del preservante mediante la formación de los CPE: mientras la solución de AB alcanzó cerca del 90% de liberación en las dos primeras horas, los complejos estuvieron entre el 15% y el 67% a las 8 horas de análisis

**Figura 3-31** Perfiles de liberación acumulativa de ácido benzoico en agua, para las dispersiones de los diez complejos y solución de referencia; concentración: 0,046 % de AB y volumen de compartimento donador: 1 ml.



Para facilitar el análisis de las tendencias observadas se elaboró la tabla Tabla 3-23, en la que se registra la información de concentración del PE, el pH de las dispersiones estudiadas y el porcentaje máximo liberado de AB para cada dispersión. Los resultados de esta etapa demuestran que el pH inicial en el compartimento donador no es el único factor que gobierna el proceso, ya que complejos como  $\text{EuB}_{25}\text{Cl}_{75}$  y  $\text{EuB}_{100}$  registraron valores de pH similares, pero porcentajes de liberación bastante diferentes. Tal hallazgo fue atribuido a la concentración de EuE en cada dispersión, pues a menor presencia de moléculas del PE, menor interacción iónica con el activo y en consecuencia menor retención en el compartimento donador. El análisis más detallado de este efecto se realizó con la constante de velocidad.

**Tabla 3-23** Concentración del PE para cada dispersión, valores de porcentaje máximo liberado de AB (en  $t=8h$ ) y pH relacionado con los ensayos de liberación de la etapa 3 (Vol donar: 1ml, concentración complejo: 0,046 % de AB y medio: agua).

Complejo	[EuE] %	pH donor ( $t=0$ )	% de AB liberado ( $t=8h$ )
<b>EuB<sub>25</sub></b>	0,50	6,39 (0,44)	15,75 (2,03)
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>25</sub></b>	0,50	6,17 (0,65)	19,59 (8,36)
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>50</sub></b>	0,50	5,84 (0,59)	19,00 (2,80)
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>75</sub></b>	0,50	4,82 (0,32)	29,69 (1,15)
<b>EuB<sub>50</sub></b>	0,25	6,13 (0,35)	31,63 (5,88)
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>25</sub></b>	0,25	5,65 (0,50)	31,35 (4,81)
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub></b>	0,25	4,89 (0,26)	37,53 (3,06)
<b>EuB<sub>75</sub></b>	0,17	5,70 (0,95)	36,06 (5,08)
<b>EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub></b>	0,17	4,77 (0,15)	66,71 (2,92)
<b>EuB<sub>100</sub></b>	0,13	4,83 (0,29)	60,79 (1,59)
<b>SIn AB</b>	N.A.	3,28 (0,12)	99,96 (2,50)

*Entre paréntesis valores de coeficiente de variación (CV)*

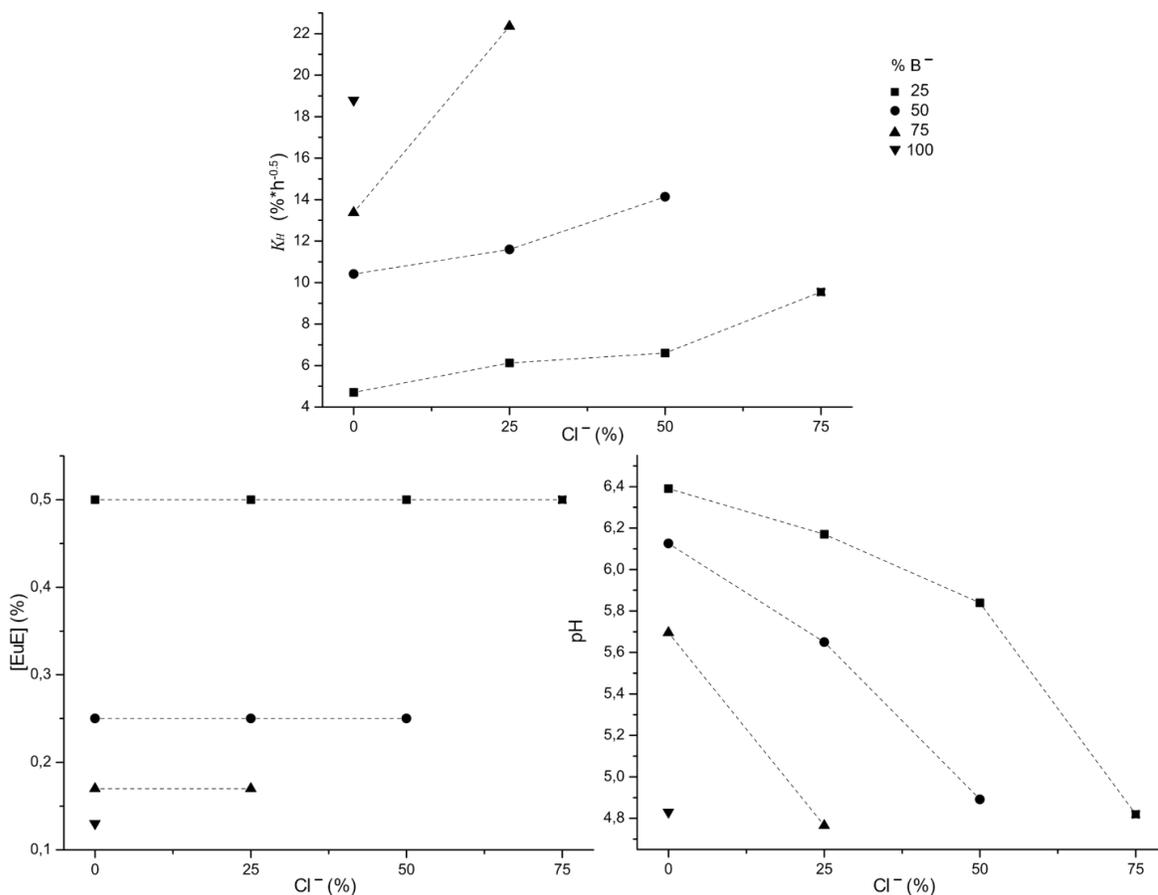
Para el modelamiento matemático de los perfiles de liberación se procedió del mismo modo que en las etapas previas. Los resultados se resumen en la Tabla 3-24 en la que se observa que el modelo cinético de mayor ajuste es el de Higuchi debido a sus altos coeficientes de determinación ( $R^2$ ); también se observa que el de Korsmeyer-Peppas presentó valores altos de  $R^2$ , sin embargo, para los análisis pertinentes se prefirió utilizar el primero, pues la constante de velocidad ( $K_H$ ) cuenta con las mismas unidades para todos los sistemas evaluados ( $\% \cdot h^{-0.5}$ ), permitiendo una fácil comparación, a diferencia de las constantes de Korsmeyer-Peppas, cuyas unidades dependen del exponente  $n$  calculado, que para esta etapa correspondieron a valores entre 0,36 y 0,62.

**Tabla 3-24** Parámetros y coeficientes de determinación de varios modelos cinéticos de liberación para la dispersión de complejos entre EuE y AB, a las condiciones de la etapa 3 (al 0,046 % de AB, con volumen de compartimento donador de 1 ml y medio receptor: agua).

	Orden cero		Higuchi		Korsmeyer-Peppas		
	$K_0$ %*h <sup>-1</sup>	R <sup>2</sup>	$K_H$ %*h <sup>-0.5</sup>	R <sup>2</sup>	n	$K_{k-p}$ h <sup>-n</sup>	R <sup>2</sup>
<b>B<sub>25</sub></b>	1,37	0,927	4,71	0,989	0,36	0,0733	0,992
<b>B<sub>25</sub>Cl<sub>25</sub></b>	1,83	0,976	6,12	0,992	0,38	0,0825	0,976
<b>B<sub>25</sub>Cl<sub>50</sub></b>	1,97	0,974	6,61	0,990	0,46	0,0676	0,961
<b>B<sub>25</sub>Cl<sub>75</sub></b>	2,82	0,955	9,55	0,994	0,42	0,1178	0,991
<b>B<sub>50</sub></b>	3,11	0,971	10,42	0,987	0,50	0,1023	0,989
<b>B<sub>50</sub>Cl<sub>25</sub></b>	3,50	0,992	11,60	0,987	0,58	0,0862	0,982
<b>B<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub></b>	4,16	0,950	14,13	0,995	0,56	0,1227	0,989
<b>B<sub>75</sub></b>	3,97	0,961	13,38	0,993	0,62	0,1015	0,990
<b>B<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub></b>	6,41	0,862	22,36	0,953	0,53	0,2574	0,946
<b>B<sub>100</sub></b>	5,50	0,937	18,79	0,994	0,37	0,2771	0,994
<b>AB</b>	7,31	0,662	27,26	0,814	0,61	0,6845	1,000

En la Figura 3-32 se presenta el efecto de la composición de los complejos en la constante de velocidad de Higuchi; con el propósito de comprender el impacto de la concentración del PE y del pH en la liberación de AB también se añadieron las gráficas con esta información en la figura. Para los resultados de pH se observa una dependencia del porcentaje total de grupos DMAE neutralizados, ya que aquellos con el 100 % de neutralización registraron datos entre 4,77 y 4,89; mientras que los del 75% se encontraron entre 5,65 y 5,84 y los del 50% en 6,17 y 6,13. Respecto a la gráfica de la constante de velocidad se presenta una tendencia similar a la de las etapas anteriores, ya que a medida que aumenta el porcentaje del contraión benzoato o cloruro —en la composición del complejo— se incrementa la  $K_H$ , sin embargo para este caso el efecto de los contraiones cloruro es mucho menor, por ello se concluyó la importancia de la concentración del PE en la dispersión evaluada, en este sentido se deduce la razón por la cual  $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$  y  $\text{EuB}_{100}$  presentaron las tasas más altas de liberación, ya que sus valores de pH fueron los de mayor acidez y sus concentraciones de EuE las más bajas; en términos de la interacción esto responde a una menor retención del PE por la baja presencia de la especie disociada de AB y de moléculas del polímero

**Figura 3-32** Valores de constante de velocidad de Higuchi ( $K_H$ ), concentración de PE ([EuE]) y pH donador ( $t=0$ ) para las dispersiones al 0,046 % de AB, medio receptor agua y volumen de compartimento donor de 1 ml de los complejos: EuB<sub>25</sub>Cl<sub>x</sub>(■), EuB<sub>50</sub>Cl<sub>x</sub>(●), EuB<sub>75</sub>Cl<sub>x</sub>(▲) y EuB<sub>100</sub>(▼). En el eje X se presenta el porcentaje de grupos DMAE neutralizado con ácido clorhídrico.



Para esta etapa de los estudios de liberación se encontró la capacidad con la que cuentan los sistemas CPE en el diseño de perfiles de liberación, pues de acuerdo con las necesidades del experimentador es posible obtener dispersiones con diferentes velocidades de liberación en función de la composición, pH y concentración del PE.

**Etapa 4: Vol donor: 1 ml; Medio: Buffer de fosfatos pH: 6,0 y concentración de complejo: a 0,6 % de AB**

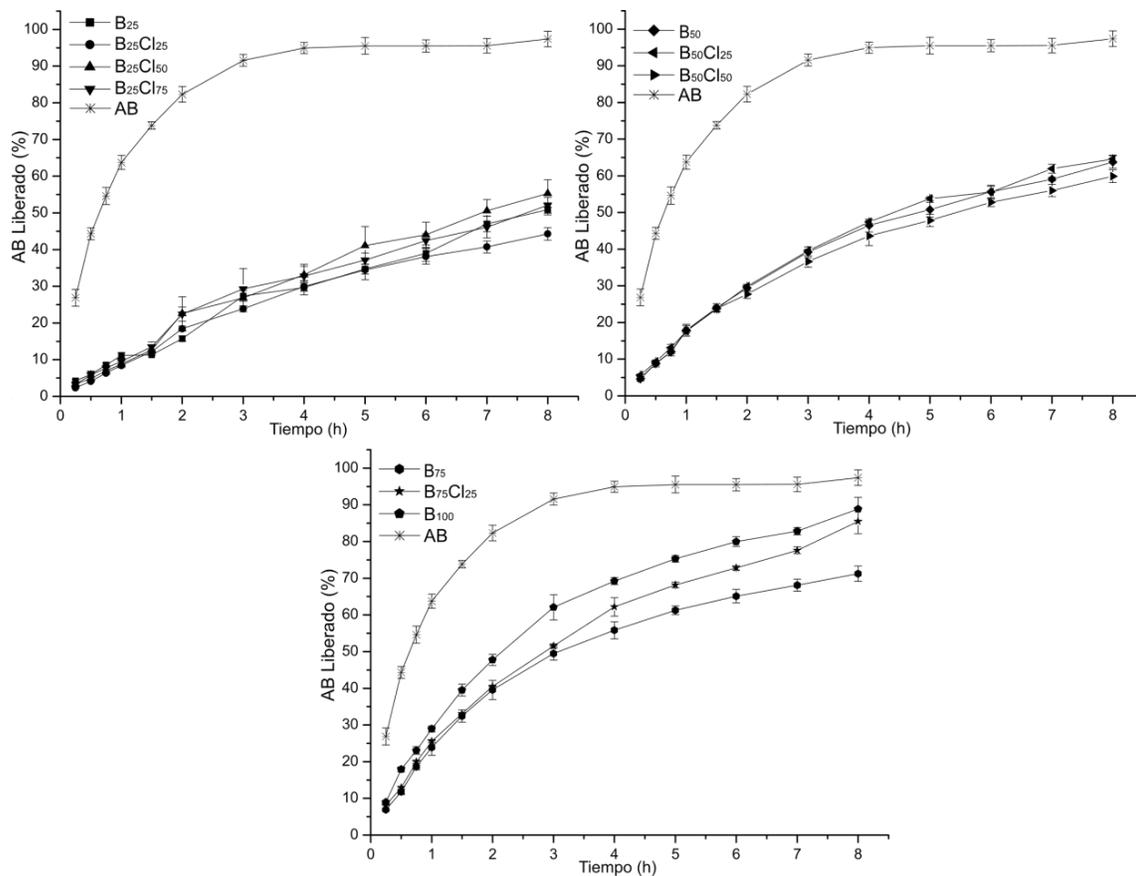
En el Capítulo 4 se presentará la actividad de los complejos a condiciones de pH superiores a las recomendadas para AB con el objetivo de desafiar el efecto antimicótico del

preservante; en consecuencia, se consideró relevante realizar los estudios de liberación respectivos.

En esta etapa se evaluaron los diez complejos a pH 6,0 para ello se utilizó buffer de fosfatos como medio receptor, mientras que, para las dispersiones ubicadas en el compartimento donador se realizó ajuste de pH con solución de NaOH. Adicionalmente, se aprovechó para evaluar una concentración mayor —al 0,6% de AB— correspondiente a la utilizada en algunos de los estudios de actividad y se implementó un esquema de muestreo más cómodo (la primera hora cada 15 minutos; la segunda hora cada 30 minutos y posteriormente un muestreo por hora hasta tiempo final de 8 horas), para facilitar la metodología. En cuanto a las condiciones sink se encontró que los ensayos estaban 2107 veces alejados de la saturación, resultado especialmente alto debido a la solubilidad de AB a pH 6,0 (217,9 mg/ml).

Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 3-33, en esta se observa que los complejos con una misma proporción del contraión benzoato cuentan con perfiles de liberación parecidos. Para los “EuB<sub>25</sub>” y los “EuB<sub>50</sub>” las semejanzas son evidentes, sin embargo para los dos complejos “EuB<sub>75</sub>” no lo son tanto, por ello se realizó el cálculo del factor  $f_2$  de acuerdo a la Ecuación (3-1), que arrojó un resultado de 60,3 indicando similitud. Estos hallazgos evidencian que los factores que gobiernan principalmente el proceso de liberación son el pH y la concentración del PE, ya que al mantener constante el primero, los resultados ocurrieron en función únicamente del segundo, como se puede corroborar con la información registrada en la Tabla 3-25, en la que se incluye la concentración de EuE para cada uno de las dispersiones estudiadas y el porcentaje de AB liberado al finalizar el ensayo ( $t=8h$ ) y donde se observa que guardan una relación inversamente proporcional, es decir a menor concentración de PE mayor porcentaje de liberación.

**Figura 3-33** Perfiles de liberación acumulativa de AB en buffer de fosfatos a pH: 6,0, para las dispersiones de los diez complejos y solución de referencia. Concentración: 0,6 % de AB y volumen de compartimento donador: 1 ml.



**Tabla 3-25** Concentración del PE para cada dispersión y valores de porcentaje máximo liberado de AB (en  $t=8h$ ) para los ensayos de liberación de la etapa 4 (Vol donor: 1ml, concentración complejo: 0,6 % de AB y medio: buffer de fosfatos a pH 6,0).

Complejo	[EuE] %	% de AB liberado ( $t=8h$ )
<b>EuB<sub>25</sub></b>	6,52	50,90 (2,81)
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>25</sub></b>	6,52	44,28 (3,85)
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>50</sub></b>	6,52	55,31 (6,75)
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>75</sub></b>	6,52	52,09 (4,18)
<b>EuB<sub>50</sub></b>	3,27	63,78 (2,66)
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>25</sub></b>	3,27	64,58 (1,68)
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub></b>	3,27	59,90 (2,94)
<b>EuB<sub>75</sub></b>	2,18	71,25 (2,95)
<b>EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub></b>	2,18	85,49 (3,93)
<b>EuB<sub>100</sub></b>	1,63	88,85 (3,55)
<b>Sl'n AB</b>	N. A.	97,40 (2,17)

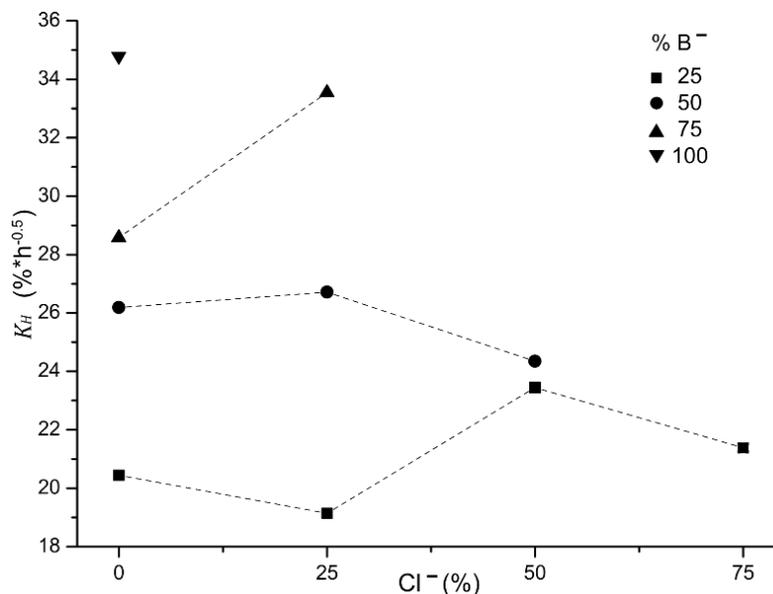
Entre paréntesis valores de coeficiente de variación (CV)

Al realizar el modelamiento cinético de los perfiles (Ver Tabla 3-26) se observa que los coeficientes de determinación para Higuchi y Korsmeyer-Peppas son los más altos. Comparando las constantes de velocidad  $K_H$ , con las de la etapa anterior se encuentra que aumentaron para las diez composiciones, hecho atribuido a la presencia de una mayor cantidad de AB en el compartimento donador y a que las condiciones sink se encontraban muchas más alejadas de la saturación; además al efecto del pH en el grado de ionización del PE, pues al estar más cerca del  $pK_a$  del EuE (de 7,0 a 7,3) [211] una menor proporción de las moléculas del polímero se encuentran ionizadas formando el par iónico con AB, evitando su paso al compartimento receptor. En la Figura 3-34 se representa el valor de  $K_H$  en función de la composición de los complejos, para este caso no se observan las tendencias habituales de los ensayos previos, solamente prevalece el comportamiento de los complejos sin neutralización adicional de HCl, en los que a mayor porcentaje de benzoato mayor el valor de  $K_H$ . Los complejos con contraión cloruro no presentaron una tendencia única.

**Tabla 3-26** Parámetros y coeficientes de determinación de varios modelos cinéticos de liberación para la dispersión de complejos entre EuE y AB, a las condiciones de la etapa 4 (al 0,6 % de AB, con volumen de compartimento donador de 1 ml y medio receptor: buffer de fosfatos a pH 6,0).

	Orden cero		Higuchi		Korsmeyer-Peppas		
	$K_0$ %*h <sup>-1</sup>	R <sup>2</sup>	$K_H$ %*h <sup>-0.5</sup>	R <sup>2</sup>	n	$K_{k-p}$ h <sup>n</sup>	R <sup>2</sup>
<b>B<sub>25</sub></b>	6,05	0,986	20,44	0,978	0,74	0,1051	0,986
<b>B<sub>25</sub>Cl<sub>25</sub></b>	5,56	0,967	19,14	0,995	0,87	0,0830	0,991
<b>B<sub>25</sub>Cl<sub>50</sub></b>	6,88	0,980	23,44	0,988	0,87	0,0967	0,989
<b>B<sub>25</sub>Cl<sub>75</sub></b>	6,23	0,968	21,39	0,990	0,81	0,1028	0,990
<b>B<sub>50</sub></b>	7,52	0,944	26,19	0,995	0,76	0,1550	0,984
<b>B<sub>50</sub>Cl<sub>25</sub></b>	7,69	0,948	26,72	0,994	0,75	0,1655	0,993
<b>B<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub></b>	6,99	0,946	24,35	0,995	0,72	0,1525	0,983
<b>B<sub>75</sub></b>	8,09	0,905	28,58	0,981	0,78	0,2171	0,986
<b>B<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub></b>	9,64	0,947	33,54	0,995	0,76	0,2369	0,993
<b>B<sub>100</sub></b>	9,87	0,911	34,79	0,983	0,77	0,2813	0,995
<b>AB</b>	7,27	0,678	27,28	0,828	0,66	0,6744	0,993

**Figura 3-34** Valores de constante de velocidad de Higuchi ( $K_H$ ) para las dispersiones al 0,6 % de AB, medio receptor buffer de fosfatos a pH 6,0 y volumen de compartimento donador de 1 ml de los complejos:  $\text{EuB}_{25}\text{Cl}_x$ (■),  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_x$ (●),  $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_x$ (▲) y  $\text{EuB}_{100}$ (▼). En el eje X se presenta el porcentaje de grupos DMAE neutralizado con ácido clorhídrico.

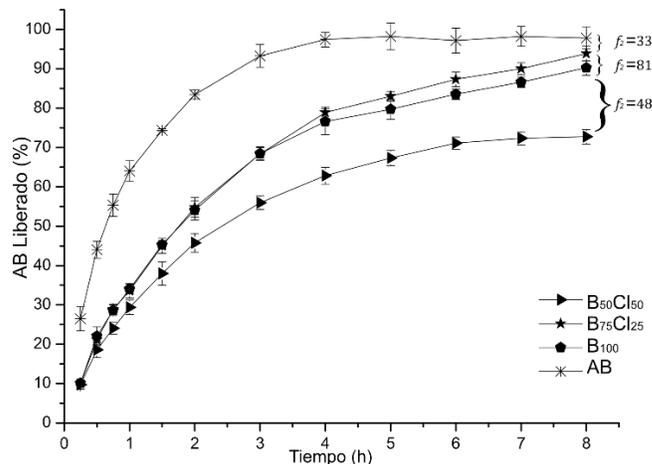


**Etapa 5: Vol donador: 1 ml; Medio: Buffer de fosfatos pH: 6,9 y concentración de complejo: a 0,6 % de AB**

Finalmente se evaluó el proceso de liberación de AB desde las dispersiones de:  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$ ,  $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$  y  $\text{EuB}_{100}$  al pH más alto utilizado en los estudios de actividad, es decir a pH 6,9 (Ver Capítulo 4). La elección de los tres complejos obedeció a los resultados obtenidos en los estudios de actividad antimicótica.

Para esta etapa las condiciones sink aseguraron que los sistemas en estudio estaban 16505 veces alejados de la saturación ya que la solubilidad de AB a pH 6,9 es 1707,4 mg/ml. Los perfiles de liberación se presentan en la Figura 3-35, en la que además se incluye la información del factor de similitud entre perfiles contiguos. Según los  $f_2$  calculados, solo los resultados para  $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$  y  $\text{EuB}_{100}$  pueden considerarse como similares; las diferencias estadísticamente significativas con el perfil de  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$  son debidas a la concentración de EuE que al ser superior (Ver Tabla 3-25) produce una mayor retención de las moléculas disociadas de AB en el compartimento donador.

**Figura 3-35** Perfiles de liberación acumulativa de AB en buffer de fosfatos a pH: 6,9, para las dispersiones de los complejos  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$ ,  $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$  y  $\text{EuB}_{100}$  y solución de referencia. Concentración: 0,6 % de AB y volumen de compartimento donador: 1 ml.



En la Tabla 3-27 se incluyen los parámetros y coeficientes de determinación de los tres modelos cinéticos estudiados. Según los valores de  $R^2$  el modelo de Korsmeyer-Peppas es el de mejor ajuste, hecho atribuido a que este únicamente requiere de los datos por debajo del 60% de la liberación; no obstante, vale la pena analizar la información relacionada con las constantes  $K_H$ , que para esta etapa registraron valores superiores a los reportados para los estudios a pH 6,0 (excepto para  $\text{EuB}_{100}$ ), tal aumento en velocidad de liberación es debido a que las condiciones sink están mucho más alejadas de la saturación y a que el pH se encuentra más cerca del  $pK_a$  del PE, contribuyendo a una menor tasa de ionización del polímero y en consecuencia a una menor retención del activo.

**Tabla 3-27** Parámetros y coeficientes de determinación de varios modelos cinéticos de liberación para la dispersión de los complejos  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$ ,  $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$  y  $\text{EuB}_{100}$  y para AB, a las condiciones de la etapa 5 (al 0,6 % de AB, con volumen de compartimento donador de 1 ml y medio receptor: buffer de fosfatos a pH 6,9).

	Orden cero		Higuchi		Korsmeyer-Peppas		
	$K_0$ %*h <sup>-1</sup>	$R^2$	$K_H$ %*h <sup>-0.5</sup>	$R^2$	n	$K_{k-p}$ h <sup>-n</sup>	$R^2$
<b>B<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub></b>	7,88	0,868	28,15	0,962	0,70	0,2798	0,990
<b>B<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub></b>	10,30	0,886	36,61	0,971	0,78	0,3336	0,981
<b>B<sub>100</sub></b>	9,67	0,872	34,52	0,964	0,79	0,3352	0,979
<b>AB</b>	7,52	0,674	28,25	0,825	0,68	0,6845	0,996

Para el modelo de Korsmeyer-Peppas se observa que la constante de velocidad ( $K_{k-p}$ ) de menor magnitud fue la de  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$ ; mientras que las de los complejos  $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$  y  $\text{EuB}_{100}$  fue prácticamente la misma, resultados que corresponden con la apariencia de los perfiles y obedecen a los fenómenos previamente descritos.

Para el análisis de los valores del exponente de liberación ( $n$ ) se elaboró la Tabla 3-28, en la que se resume el valor promedio y el rango de  $n$  para las dispersiones de los complejos a lo largo de las cinco etapas de estudios realizados. Los valores de  $n$  de la tabla se encuentran en línea con lo reportado para investigaciones de CPE de naturaleza similar, en los que el rango estuvo entre 0,31 y 0,90 [72,141,189,226,252]. Para la tres primeras etapas se deduce —a partir del valor promedio de  $n$ — que el mecanismo de liberación obedece al difusional Fickiano, mientras que, para las etapas 4 y 5 se observa un distanciamiento considerable del valor 0,50 asociado a mecanismos de liberación anómalos o “no Fickianos”; sin embargo, para CPE estos distanciamientos son consecuencia del proceso de disociación entre PE-activo que normalmente controlan la cinética de liberación, pero que son seguidos por la difusión Fickiana del activo [141]; para las dos últimas etapas de estudios estas diferencias fueron más evidentes porque la concentración del complejo en la dispersión era de más de 10 diez veces la de las etapas 1, 2 y 3, por tanto el efecto de la disociación tuvo mayor magnitud en el coeficiente de liberación.

**Tabla 3-28** Valores promedio y rango de los coeficientes de difusión ( $n$ ) del modelo cinético de Korsmeyer-Peppas para las cinco etapas de estudios de liberación.

<b>Etapas</b>	<b><math>n</math> promedio</b>	<b>Rango de <math>n</math></b>
<b>1</b>	0,58	0,46 a 0,78
<b>2</b>	0,50	0,36 a 0,68
<b>3</b>	0,48	0,36 a 0,62
<b>4</b>	0,78	0,72 a 0,87
<b>5</b>	0,76	0,70 a 0,79

En los estudios de liberación de CPE es recurrente la evaluación del NaCl al 0,9% como medio receptor (Ver Tabla 3-17), sin embargo, para la presente investigación no se consideró relevante realizarlo porque el objetivo de reconocer las diferencias entre las diez composiciones de complejos se logró con los medios receptores utilizados, además porque las conclusiones asociadas a tales ensayos son ampliamente conocidas: incremento en la tasa de liberación de los activos debido al intercambio iónico del CPE con los iones  $\text{Na}^+$  y

$\text{Cl}^-$ ; incluso para complejos entre EuE y AB ya se ha reportado los hallazgos mencionados [2,71,189].

### 3.3 Conclusiones

Para la determinación de las propiedades fisicoquímicas de los diez CPE de la presente investigación, se encontró que:

- ☞ Las técnicas de difracción de rayos X (DRX) y calorimetría diferencial de barrido (DSC), como herramientas complementarias a FTIR, evidenciaron la existencia de la dispersión a nivel molecular del activo en el PE.
- ☞ Los estudios de DSC corroboraron el proceso de hidrólisis de los grupos éster del PE, debido a la adición de ácido clorhídrico. Los resultados mostraron la presencia de un evento endotérmico (entre 145 y 180°C) adjudicado a la reacción de ciclación intramolecular del PE, que se favoreció en los CPE con mayor hidrólisis.
- ☞ No fue posible determinar la solubilidad por el método tradicional, debido a inconvenientes con el proceso de saturación de los sistemas en fase acuosa, sin embargo, los estudios cualitativos indicaron que todos los CPE fueron solubles en agua a una concentración de 0,6% de AB y pH entre 5,8 y 6,9. Para determinar la influencia de la composición en la solubilidad, se desarrolló un estudio denominado “*Cantidad máxima de complejo aceptada en agua*” el cual evidenció que a mayor porcentaje de AB y/o HCl neutralizando los grupos DMAE de los CPE mayor era la cantidad de AB solubilizada.
- ☞ Para la constante de afinidad los valores de  $\text{Log } K_{cc}$  oscilaron entre 5,7 y 6,4, evidenciando un alto porcentaje de condensación del par iónico. Se encontró que el efecto del porcentaje de grupos DMAE del PE neutralizado con AB o HCl, en la composición del complejo, es inversamente proporcional a esta propiedad fisicoquímica, lo que se atribuyó al impedimento estérico.
- ☞ El análisis de desplazamiento de AB por intercambio iónico con NaCl, demostró la reversibilidad de la interacción iónica entre EuE y  $\text{B}^-$ . A las condiciones del ensayo se encontró que a menor porcentaje de contraión ( $\text{B}^-$  y/o  $\text{Cl}^-$ ) en la composición

de CPE, mayor fue el impacto del intercambio iónico en el pH, asimismo, se observó para los ionómeros  $\text{EuCl}_x$  aumento de pH tras la adición de la sal, hecho contrario a lo reportado en estudios previos. Los resultados demostraron que los equilibrios presentados en 3-11 y 3-12 son los que gobiernan el fenómeno y explican el aumento de pH.

- ☞ Es inapropiado utilizar el término “potencial  $\zeta$ ” para las determinaciones realizadas a dispersiones de PE o CPE en el equipo Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, con el modelo de Smoluchowski, debido a que requieren del desarrollo de un modelo específico que convierta la movilidad electroforética en potencial zeta; por ello para fines prácticos se utilizó el término “pseudo-potencial zeta ( $p\text{-}\zeta$ )” para referirse a los valores arrojados por el software del equipo.
- ☞ Los valores de  $p\text{-}\zeta$  de las dispersiones de los CPE presentaron valores positivos debido al carácter catiónico del EuE. A concentración constante del PE, se observó una tendencia general de disminución del  $p\text{-}\zeta$  con el aumento de porcentaje de contraión en la composición del complejo, atribuida al apantallamiento causado por el activo. A condiciones de pH 6,0 y concentración de AB constante (0,06 %) se evidenció que mayores porcentajes del ion benzoato en el CPE, se reflejaban en mayores valores de pseudo-potencial zeta, hecho adjudicado a las diferencias en concentración de PE, puesto que las concentraciones mayores incrementan la aglomeración y agregación de los sistemas.
- ☞ Los estudios de liberación en celdas bicompartimentales de Franz evidenciaron que el volumen de la dispersión, en el compartimento donador, tiene un gran impacto en el porcentaje liberado de activo, aun cuando se aseguren las condiciones “Sink” del ensayo. Por lo anterior se recomienda evaluar su incidencia al realizar estudios semejantes.
- ☞ El comportamiento de liberación de AB desde las dispersiones acuosas de los CPE, a concentración constante del PE, dependió del pH, siendo mayor —en constante de velocidad ( $K_H$ ) y porcentaje liberado— para las dispersiones con mayor acidez, debido a que la especie no disociada es retenida, en el compartimento donador, en menor proporción.

- ☞ La liberación del activo, a condiciones controladas de pH (a valores de 6,0 y 6,9) y a concentración constante de AB, evidenció la influencia de la concentración del PE: aquellas con menor porcentaje de EuE fueron las mismas con mayores constantes de velocidad ( $K_H$ ) y más altos porcentajes de activo liberado.
- ☞ El mecanismo de liberación del activo desde las dispersiones de los CPE, según el modelamiento de Korsmeyer-Peppas, obedeció a uno de tipo difusional Fickiano para los ensayos realizados a baja concentración (0,5 % de EuE y 0,046 % de AB) y de tipo “no Fickiano” para valores de concentración mayores (0,6 % de AB). El fenómeno “anómalo” es asociado al proceso de disociación entre PE—activo que controla la cinética de liberación y que es precedido por una difusión Fickiana. Tuvo mayor efecto en los ensayos realizados a alta concentración, precisamente por la presencia de una mayor proporción de CPE.

## 4 Actividad antimicótica

La evaluación de actividad antimicrobiana data de finales del siglo XIX con los primeros estudios realizados en desinfección química, dentro de los que sobresalen los trabajos de Bucholtz en 1875, quien realizó la determinación de la concentración mínima inhibitoria del fenol en ensayos con bacterias y la investigación de Robert Koch, quien hizo mediciones para evaluar el poder inhibitorio del cloruro de mercurio frente a las esporas de *Clostridium anthracis* [254]. Sin embargo, fue hasta 1897 cuando Kronig y Paul publicaron un estudio que constituye la base de los ensayos actuales [254,255], pues concluyeron entre otros postulados, que:

1. No todas las bacterias mueren al mismo tiempo, pues dependen de la concentración del compuesto biocida y de la temperatura del ensayo.
2. Los compuestos biocidas, solo pueden ser comparados si se ensayan bajo condiciones controladas.
3. El número de bacterias al realizar un ensayo debe ser constante.

Estos tres fundamentos demuestran la necesidad del control de variables en estudios de actividad antimicrobiana.

Para los fines del desarrollo de la presente investigación, se decidió evaluar únicamente el efecto antimicótico, pues el ácido benzoico es un agente que cuenta predominantemente con esta actividad y en menor grado antibacteriana [81]. Las condiciones utilizadas en los métodos que evalúan susceptibilidad antimicótica suelen ser bastante heterogéneas, ya que dependen de la naturaleza del hongo, por ejemplo una levadura o un hongo filamentoso cuentan con tasas de crecimiento diferentes y por tanto las condiciones óptimas de cada uno son disímiles [256]. Dentro de los factores que tienen un mayor impacto en los resultados de la mayoría de los métodos utilizados, se encuentran: la composición del medio, clase y concentración del inóculo, temperatura y duración de la

incubación y el criterio para determinar el punto final del ensayo [257]. A continuación, se describen algunas de los rasgos importantes de cada uno:

- **Características del medio:** El medio de cultivo seleccionado para el ensayo debe permitir el crecimiento del hongo a evaluar sin interferir con la acción de la sustancia antimicótica, además debe generar resultados reproducibles. Algunos de los más utilizados son Sabouraud dextrosa, BHI (infusión cerebro corazón), Czapek, PD (patata dextrosa); este último es bastante empleado porque favorece la esporulación de la mayoría de hongos filamentosos [258].
- **Inóculo:** Debe ser libre de microorganismos contaminantes y obtenerse de cultivos en crecimiento activo que aseguren la viabilidad y capacidad de reproducción de las células. La edad y concentración del inóculo deben ser fijadas apropiadamente. Como método de conteo se puede emplear hemocitómetro o una correlación, hecha previamente, con porcentaje de transmitancia.
- **Temperatura de incubación:** influye en la velocidad de crecimiento, en la estabilidad del agente antimicótico y en el desarrollo del inóculo. Debe establecerse con base en guías recomendadas y/o en estudios previos.
- **Periodo de incubación:** para levaduras suele ser de 24 a 48 horas a 35°C, mientras que para los hongos filamentosos es bastante variable, pues depende de su naturaleza, velocidad de crecimiento, temperatura de incubación, entre otros.
- **Punto final del ensayo:** Se determina por la presencia o ausencia de crecimiento del inóculo, puede detectarse por inspección visual, cambios colorimétricos, medidas turbidimétricas y de densidad óptica, liberación de CO<sub>2</sub>, determinación de ATP, entre otros [256].

Actualmente, existen múltiples métodos para evaluar actividad antimicótica, dependiendo de la aplicación del agente estudiado se cuenta con guías recomendadas, por ejemplo, en el ámbito de desinfectantes se sigue lo estipulado por organizaciones como: AOAC International, DGHM (Sociedad alemana de higiene y microbiología) y AFNOR (Organización nacional francesa para la estandarización); en Colombia lo plasmado por el ICONTEC en la normas técnicas colombianas (NTC) 5593; 5540; 5816; 5817. Todas las

guías mencionadas constan de al menos dos etapas: la primera contempla ensayos *in vitro* realizados en suspensión y en porta gérmenes y la segunda abarca metodologías que simulan condiciones reales (ensayos prácticos) [255,259–262]. Estos procedimientos no fueron utilizados para la evaluación antimicótica de los complejos, ya que el AB no tiene uso desinfectante y tampoco fueron adaptadas porque los tiempos de contacto inóculo-activo son cortos (entre 60 a 120 minutos) ya que los agentes desinfectantes son utilizados para reducir la carga microbiana después de una exposición breve.

Adicional a las guías de carácter desinfectante, existen protocolos para evaluación de actividad antimicótica en el ámbito clínico, se trata de lineamientos internacionales establecidos por el “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, antes NCCLS) mediante los estándares M27 y M38, donde especifican los métodos de referencia para la evaluación por dilución en caldo de la sensibilidad de levaduras y hongos filamentosos. Estos protocolos aseguran la reproducibilidad inter e intra laboratorio en la determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima fungicida (CMF) de activos frente a hongos [258,263,264]. Aunque las dos guías mencionadas están diseñadas para la práctica clínica, han sido empleadas para la evaluación de actividad antimicótica en otros campos como el fitoterapéutico, en el cual es frecuente el análisis del efecto fungicida y/o fungistático de extractos vegetales [146,148–152,265–268].

### ***Métodos para la evaluación de actividad antimicótica***

La evaluación de la actividad antimicótica de un activo puede ser determinada mediante varios métodos, a continuación, se presentan algunos de los más utilizados.

#### **1. Método de difusión en agar.**

También conocido como “*difusión en placa*”, consiste en la inoculación del hongo en el agar del medio de cultivo y la posterior ubicación de discos de papel filtro —o equivalente— impregnados con concentraciones conocidas del antimicótico en su superficie; de manera opcional, puede realizarse la adición de las soluciones del activo en hoyos hechos en el agar con sacabocados. Luego, el sistema se incuba bajo las condiciones de temperatura y tiempo establecidas para el microorganismo y finalmente se mide la actividad del compuesto en función de los halos de inhibición [146,148–150,256,266,267]. Dentro de las desventajas de este método

se encuentran los problemas relacionados con la difusión, solubilidad o estabilidad de algunos activos, sin embargo, son bastante utilizados para la evaluación preliminar de actividad [258].

## 2. **Métodos de dilución.**

Este tipo de ensayos son quizás los más utilizados en el campo de la investigación de nuevos agentes antimicóticos, pues permiten cuantificar su actividad. Se pueden clasificar dependiendo del medio de cultivo, en ensayos de *dilución en caldo* y *dilución en agar*, a continuación, se presentan las particularidades de cada tipo:

***Dilución en caldo:*** Su estudio se basa en el análisis de las diferencias en la tasa de crecimiento de un hongo en presencia y ausencia del agente antimicótico. Para ello, una serie de diluciones del activo a evaluar son preparadas en el caldo indicado para el crecimiento del microorganismo y colocadas en tubos de ensayo —o equivalente—; cada uno es inoculado con una suspensión estandarizada de levaduras o esporas del hongo; se evalúa además un control negativo (sin antimicótico) y un control positivo (con un fármaco de acción reconocida). Posteriormente se realiza la incubación a las condiciones de óptimo crecimiento del inóculo y por último se evalúa el crecimiento fúngico en cada uno de los tubos empleando alguna de las técnicas de punto final ya mencionadas. Comparando cada resultado con el control negativo es posible establecer los porcentajes de inhibición y por tanto la CMI de la sustancia estudiada [146,149].

Como alternativa a este método, también denominado de “macrodilución”, existe el de microdilución, que consiste en la realización del ensayo bajo los mismos principios, pero a una escala de volumen inferior, de modo que la cantidad total de cada “tubo de ensayo” no supera los 300  $\mu$ l y puede realizarse en placas de microdilución que cuentan hasta con 96 pozos cada una [148,256,265,266,268,269].

Mediante los estudios de dilución en caldo es posible determinar si el agente antimicótico evaluado causa la muerte celular del hongo (es fungicida) o si únicamente detiene su crecimiento (fungistático), para ello, luego de alcanzar el punto final del ensayo, se realiza la siembra de un volumen determinado -

comúnmente 10 µl- del último pozo o tubo que dio positivo (crecimiento mínimo) y de los siguientes tres, que mostraron una completa inhibición de crecimiento, en una placa que contenga el agar del medio de cultivo respectivo sin tratar. Posterior al proceso de incubación de la placa, se observa la reactivación o no del hongo y dado el caso se podría determinar la concentración mínima fungicida (CMF) [146,266,268].

***Dilución en agar:*** Consiste en un ensayo muy similar al de caldo, pero en el cual las diferentes concentraciones del activo son adicionadas al agar del medio de cultivo a una temperatura entre 40 y 50°C. Posterior a la solidificación del gel, se coloca en el centro de la placa un disco de agar del inóculo, proveniente de un cultivo que fue sembrado a las condiciones óptimas del hongo y se procede a realizar la incubación del sistema obtenido; se incluyen además los controles positivo y negativo como se realizó en el método de suspensión. Transcurrido el tiempo de incubación se realiza la medición de los diámetros de crecimiento del hongo, se determinan los porcentajes de inhibición en comparación con el control negativo y se calcula la CMI [150–153,266].

### **3. Evaluación de actividad sobre germinación de esporas.**

Este método se utiliza para hongos filamentosos y consiste básicamente en la preparación de una suspensión estandarizada de esporas, proveniente de la incubación de un cultivo del hongo. A diferentes tubos, que contienen las concentraciones del antimicótico, en un medio que permita la germinación, se les adiciona la suspensión de esporas y se incuban a las condiciones recomendadas. Se utiliza un control negativo consistente en el solvente del activo o en su defecto del medio solo. Transcurridas 24 horas se hace la determinación con ayuda de un microscopio, se cuentan 100 esporas y se enumeran aquellas que germinaron, caracterizadas por la formación de tubo germinativo de igual o superior tamaño a la espora. Si se desea, puede hacerse varias mediciones en lapsos inferiores a las 24 horas. El efecto del antimicótico en la germinación de las esporas se expresa como porcentaje de inhibición comparado con la germinación del control [147,266,270].

#### 4. Otros métodos.

Para medir la actividad de agentes antimicóticos, existen métodos diferentes a los descritos previamente como: citometría de flujo, cuantificación de ergosterol, métodos radiométricos rápidos, entre otros. Debido a su mayor complejidad principalmente se realizan en laboratorios de referencia o altamente especializados [256,269,271–273].

La evaluación de la actividad antimicótica de los complejos obtenidos se realizó sobre los hongos: *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis* y *Penicillium rubens*, esta selección fue hecha con base en la necesidad de comparar el comportamiento de los complejos tanto en levaduras como en hongos filamentosos. Los dos primeros fueron elegidos porque son los que referencia la USP para las pruebas de eficacia antimicrobiana; además porque *C. albicans* es considerada el modelo de levadura por excelencia y cuenta con múltiples estudios. En cuanto a los hongos filamentosos, su escogencia obedeció a que su presencia es comúnmente relacionada con la contaminación de materias primas utilizadas en la fabricación de productos no estériles en la industria farmacéutica. La selección específica de los hongos *A. brasiliensis* y *P. rubens*, al igual que la de la levadura, fue debida a la amplia información reportada en estudios antimicóticos [263,274–278]. A continuación, se describen las características principales de los microorganismos:

##### i. ***Candida albicans*,**

#### Clasificación Taxonómica

Reino:	<i>Fungi</i>
División:	<i>Ascomycota</i>
Subdivisión:	<i>Saccharomycotina</i>
Clase:	<i>Saccharomycetes</i>
Subclase:	<i>Saccharomycetidae</i>
Orden:	<i>Saccharomycetales</i>
Familia	<i>Saccharomycetaceae</i>
Género	<i>Candida</i>
Especie:	<i>Candida albicans</i>

## Características morfológicas

*Candida albicans* forma parte de la microbiota normal humana, es considerado como un patógeno oportunista que se caracteriza por ser polimórfico; de tal manera, que puede crecer como levadura en forma típica ovalada (tamaño: 3,0 – 6,0 x 4,0 x 8,0 µm) color crema brillante, como células elipsoides alargadas con constricciones en los septos (pseudohifas) o como hifas verdaderas de paredes paralelas [279]. Otras morfologías incluyen células clamidosporas, que corresponden a unas más redondas y grandes que las levaduras, con paredes muy gruesas las cuales generalmente se forman en los extremos de los filamentos hifales, en respuesta a la reducción del nivel de nutrientes en el medio de crecimiento [279,280].

La filamentación de *C. albicans* puede ser inducida por múltiples factores ambientales como la temperatura o pH; asimismo, las hifas filamentosas son más invasivas que la forma de levadura, ya que permiten la invasión de tejidos [281]. *Candida albicans* es el patógeno más común entre las especies de *Candida* y las tres principales enfermedades a las que se le asocia son: candidiasis orofaríngea, candidiasis vulvovaginal y candidiasis invasiva [282].

## ii. *Aspergillus brasiliensis*

### Clasificación Taxonómica

Reino:	<i>Fungi</i>
División:	<i>Ascomycota</i>
Subdivisión:	<i>Pezizomycotina</i>
Clase:	<i>Eurotiomycetes</i>
Subclase:	<i>Eurotiomycetidae</i>
Orden:	<i>Eurotiales</i>
Familia	<i>Trichocomaceae</i>
Género	<i>Aspergillus</i>
Especie:	<i>Aspergillus brasiliensis</i>

### **Características morfológicas**

*Aspergillus* es conocido como el principal género de los hongos filamentosos, considerado a su vez ubicuo. Este género cuenta con más de 339 especies identificadas hasta la fecha, las cuales son relevantes por su importancia económica y social debido a su capacidad para producir y secretar enzimas, metabolitos, antibióticos, micotoxinas, entre otros [283]. En este marco se encuentra *Aspergillus brasiliensis*, ATCC® 16404, una cepa que hasta hace poco tiempo era clasificaba como *Aspergillus niger*, sin embargo, un estudio polifásico que analizó los datos moleculares y las características fisiológicas del microorganismo, determinó que correspondía a la nueva especie *Aspergillus brasiliensis* [284].

*Aspergillus brasiliensis*, ATCC® 16404 es una cepa de referencia para el control de calidad de una serie de aplicaciones y métodos oficiales, como los enumerados en la USP; es generalmente considerado como seguro y se caracteriza por la capacidad de producción de ácidos orgánicos, enzimas, proteínas y además por presentar superficies fúngicas superhidrofóbicas que crecen como un denso gránulo de micelio. Las colonias son inicialmente blancas o ligeramente amarillas, el micelio crece rápidamente produciendo una capa densa de conidióforos erguidos de aspecto liso, con una terminación de vesículas globosas que sostienen las fiálides (uniseriadas) o métulas con fiálides (biseriadas) las cuales producen cadenas de esporas con un reverso pálido a grisáceo o un color amarillo verdoso. Las vesículas irradiadas, inicialmente pálidas, pasan a un color café oscuro o negro. Las esporas esféricas son de color café medio a oscuro, bastante rugosas, con crestas y protuberancias agudas o de punta aplanada y de 3 a 6  $\mu\text{m}$  de diámetro. La esporulación puede ser inhibida cuando el crecimiento se da en contenedores con intercambio gaseoso reducido. Las colonias pueden presentar sectorización, con áreas de niveles variables de esporulación. El uso de esporas frescas para la preparación del inóculo, reduce la presencia de sectorización [283,285,286].

### iii. *Penicillium rubens*

#### Clasificación Taxonómica

Reino:	<i>Fungi</i>
División:	<i>Ascomycota</i>
Subdivisión:	<i>Pezizomycotina</i>
Clase:	<i>Eurotiomycetes</i>
Subclase:	<i>Eurotiomycetidae</i>
Orden:	<i>Eurotiales</i>
Familia	<i>Trichocomaceae</i>
Género	<i>Penicillium</i>
Especie:	<i>Penicillium rubens</i>

#### Características morfológicas

*Penicillium* es un género diverso, anamorfo y comprende una gran cantidad de hongos filamentosos ubicuos que desempeñan diversas funciones. La cepa fúngica que produce el agente antimicrobiano penicilina fue identificada inicialmente por Fleming y colaboradores como *Penicillium rubrum*, el cual posteriormente se identificó como *Penicillium notatum* y como *Penicillium chrysogenum*. Sin embargo, un reciente estudio basado en análisis filogenéticos, concluyó que *P. notatum/chrysogenum*, es en realidad *Penicillium rubens* [287,288].

Las cepas de *P. rubens* forman colonias de crecimiento rápido, vellosas, aterciopeladas y de color verdoso con una corona radial ancha y blanca, con un crecimiento óptimo a una temperatura de 25°C. La reproducción es esencialmente asexual, mediante la formación de esporas o conidios a partir del micelio, constituyendo el denominado micelio aéreo [289]

## 4.1 Metodología

### 4.1.1 Materiales

Los compuestos utilizados: benzoato de sodio, hidróxido de sodio y ácido clorhídrico, eran calidad reactivo analítico. Para nistatina se utilizó una suspensión comercial a 100.000 UI/ml, laboratorio Labinco S.A. Los medios de cultivos empleados fueron agar papa

dextrosa (PDA) marca Scharlau<sup>®</sup>, Antibiotic Assay Medium No.19 (AA19) marca Sigma-Aldrich, agar Sabouraud dextrosa (SDA) marca Scharlau<sup>®</sup> y el caldo Sabouraud dextrosa (SDB) marca Difco<sup>™</sup>, todos fueron preparados según instrucciones de la etiqueta. Se utilizaron cepas derivadas con licencia ATCC<sup>®</sup> de *Candida albicans* ATCC<sup>®</sup>10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC<sup>®</sup>16404 y *Penicillium rubens* ATCC<sup>®</sup> 9179 marca Microbiologics Inc<sup>®</sup>. En todos los experimentos se utilizó agua desionizada.

#### 4.1.2 Métodos

El manejo adecuado y seguro de las tres cepas utilizadas, se realizó de acuerdo al manual de bioseguridad de la Organización Mundial de la Salud (OMS) [290]. Los tres hongos están catalogados, según la descripción general dada por ATCC, en nivel de bioseguridad 1, es decir, son microorganismos que tienen pocas probabilidades de provocar enfermedades en el ser humano o en los animales, su riesgo individual y poblacional es escaso o nulo. Para estos, el manual de la OMS exige prácticas de laboratorio correspondientes a técnicas microbiológicas apropiadas, no es necesario equipo de seguridad y se puede trabajar en mesa de laboratorio al descubierto.

En el Anexo B se detallan los métodos utilizados para la activación de las cepas y la preparación de los inóculos de los hongos desde la cepa criopreservada. La esterilización en los diferentes estudios se realizó por calor húmedo, con autoclave (All American<sup>®</sup>, modelo 25X).

En todos los ensayos la concentración de los CPE fue establecida en función del AB y no directamente de los complejos o del EuE, esto para evitar que las diferencias en los resultados de actividad fueran debidas al contenido del preservante y no a la composición del CPE. Se utilizó la nomenclatura “% de AB” para referirse de forma genérica a la concentración del activo, pero NO hace referencia únicamente a la especie no disociada.

##### i. Difusión en agar.

En primer lugar, se realizó la evaluación preliminar de la actividad antimicótica de todos los complejos obtenidos frente a los tres microorganismos. Esto con el fin de establecer de manera sencilla si tras la complejación, el ácido benzoico mantiene o pierde su efecto antimicótico. Se utilizó la metodología de difusión en agar, seguida por Adarme y Rincones

(2008) [146], con variaciones en las cantidades utilizadas. Para los tres microorganismos se obtuvo un inóculo de levaduras o esporas en agua a una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas/levaduras por mililitro, determinada mediante recuento de cámara de Newbauer, que posteriormente fue adicionado y homogenizado en el agar medio de cultivo, a una temperatura aproximada de 32 °C, para una concentración final de  $1 \times 10^5$  esporas/levaduras por mililitro. Un volumen de 15 ml de medio inoculado fue servido en cada una de las cajas; una vez solidificado se hicieron pozos sobre la superficie de los agares con ayuda de un sacabocados estéril de 4 mm de diámetro y en cada uno de ellos se vertieron 50  $\mu$ l de cada uno de: los controles de crecimiento e inhibición (agua estéril y suspensión de nistatina a 1000 UI/ml), benzoato de sodio y dispersiones acuosas de los complejos (a una concentración de 0,5% de ácido benzoico) por triplicado. Las soluciones o dispersiones fueron preparadas en tubos de ensayo con agua estéril, a los que se les adicionó la cantidad correspondiente de BNa o CPE en estado sólido, posteriormente se homogenizaron con ayuda de agitador vortex (IKA® Vortex Genius 3).

Las cajas de Petri se dejaron reposar por 30 minutos y posteriormente se incubaron, la levadura a 35°C por 24 horas y los hongos filamentosos a 25°C por cinco días. La lectura de resultados se realizó por medición con calibrador pie de rey (Stanley® 78201) de los halos de inhibición presentados en cada tratamiento, sin restar el diámetro del reservorio.

## ii. Dilución en agar.

Esta técnica se desarrolló de modo preliminar para el complejo modelo  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$ , frente al microorganismo *C. albicans*. Como control de crecimiento se utilizó el medio de cultivo sin ningún agente activo y como control de esterilidad el medio sin adición del microorganismo; adicionalmente, se evaluó frente al benzoato de sodio. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado. Se siguió la metodología planteada por Gordon y colaboradores [291] en placas multipozos (x 24) estériles de poliestireno. Los tratamientos a estudiar fueron adicionados en solución, a las concentraciones apropiadas sobre el medio de cultivo agar antibiótico N°19 a una temperatura entre 40 y 50°C en proporción 1:3. Se evaluaron seis concentraciones finales correspondientes a diluciones seriadas de 0,008 %, 0,016 %, 0,031 %, 0,063 %, 0,125 % y 0,250 % de AB.

Una vez solidificados los sistemas (medio de cultivo-activo) se procedió a adicionar en el centro de cada pozo, un volumen de 10  $\mu$ l del inóculo estandarizado de levaduras de  $10^6$

células/ml. Las placas multipozos posteriormente fueron incubadas a 35°C por 24 horas; los resultados se reportaron como presencia o ausencia de crecimiento tras inspección visual. El ensayo se realizó a los valores de pH 3,7, 4,5, 4,9, 5,3, 5,8 y 6,1 para ello se adicionaron cantidades estandarizadas de ácido clorhídrico en la preparación del agar.

### **iii. Dilución en caldo**

Los estudios de actividad antimicótica por dilución en caldo se realizaron en dos etapas:

#### **1. ETAPA A**

La primera consistió en utilizar una técnica bajo los mismos principios de los ensayos de dilución en agar, pero usando como medio de cultivo el caldo Sabouraud dextrosa. Estos ensayos se realizaron, siguiendo los principios básicos de la técnica normalizada de microdilución en caldo [263,264], para los diez complejos -obtenidos y caracterizados previamente- y para benzoato de sodio; inicialmente solo frente a la levadura, para poner a punto la metodología, y luego frente a los tres microorganismos: *C. albicans*, *A. brasiliensis* y *P. rubens* a pH 6,0. Las condiciones de incubación correspondieron a 35°C por 24 horas, para la levadura y 25°C por cinco días para los hongos filamentosos.

La presencia o ausencia de crecimiento del inóculo sembrado en cada pozo, se realizó por inspección visual, además se hizo un repique de 10 µl de cada tratamiento al agar de cultivo apropiado (PDA o AA19), en otra placa multipozo, para determinar el efecto fungicida o fungistático de cada sustancia estudiada.

#### **2. ETAPA B**

Para la segunda etapa se realizaron algunas modificaciones de los ensayos ejecutados en la primera, la principal consistió en realizar el conteo de células viables en el punto final por la técnica de conteo por placa. Para la levadura se empleó el método de “vaciado en placa” es decir el inóculo se agregó a cada caja vacía y luego se añadió el agar y la lectura se realizó a las 24 horas; para los hongos filamentosos el conteo se hizo por el método de “recuento por plaqueo”, esto es mediante la siembra en superficie, con lectura de resultados a los tres días.

Inicialmente se evaluaron los diez complejos frente a los tres microorganismos a una concentración equivalente de ácido benzoico de 0,6 % y a un pH ajustado de 6,0 en el medio de cultivo: Sabouraud dextrosa. Los tres complejos que arrojaron los mejores resultados de actividad antimicótica se evaluaron posteriormente a otras condiciones de pH y de concentración. En la Tabla 4-1 se resumen todos los ensayos realizados por fases en esta etapa. En todos los casos se utilizó como control de crecimiento el medio de cultivo, y además se evaluó benzoato de sodio y el ionómero  $\text{EuCl}_{100}$ .

**Tabla 4-1:** Condiciones de composición de CPE, concentración y pH, en las tres fases de análisis de actividad antimicótica en caldo, mediante conteo de UFC en el punto final.

Fase	Complejos	Concentración (% AB )	pH
1	Los 10 obtenidos.	0,600	6,0
2	Los tres mejores de la fase 1.		6,3
			6,6
			6,9
3	Los tres mejores de la fase 1	0,300	6,9
		0,150	
		0,075	

#### iv. Germinación de esporas

Se realizó para los hongos filamentosos: *Aspergillus brasiliensis* y *Penicillium rubens* siguiendo la metodología descritas por Levinskaitė y Moreno [147,266]. Los complejos que mostraron una actividad antimicótica más alta en las pruebas microbiológicas previas ( $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$ ,  $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$ ,  $\text{EuB}_{100}$ ) fueron adicionados a caldo Sabouraud dextrosa, en las cantidades necesarias para obtener sistemas de concentración final de 0,075, 0,15 y 0,3 % de ácido benzoico; además se evaluó el polímero sin ácido benzoico ( $\text{EuCl}_{100}$ ) y el benzoato de sodio a concentraciones equivalentes a las de los complejos; como control se utilizó el medio de cultivo.

La suspensión de esporas se obtuvo mediante raspado del micelio de cultivos de 5 días de los hongos, estas fueron filtradas con una muselina estéril para remover los micelios y estandarizadas con ayuda de cámara de Neubauer para obtener una concentración final de  $10^6$  esporas/ml luego de adicionar los 100  $\mu\text{l}$  de inóculo a los 2,9 ml de cada muestra. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado y a dos valores de pH: 6,0 y 6,9; para

ello se ajustó el pH utilizando un potenciómetro (Hanna HI 2221, sensibilidad 0.01 pH) y soluciones de hidróxido de sodio y/o ácido clorhídrico a una concentración 1 N.

La germinación de esporas fue evaluada después de una incubación por 24 horas a 25°C, utilizando un microscopio óptico (40x) (Leica Microsystems, DM500) de manera manual. Para cada réplica se realizó por triplicado el conteo de esporas germinadas por cada 100, teniendo en cuenta que solo eran consideradas germinadas, aquellas cuyo largo de tubo germinal era igual o superior a la longitud de la spora. El efecto de los tratamientos estudiados se expresó como porcentaje de inhibición comparado con la germinación del control [266,270].

### **Análisis estadístico.**

El ensayo de difusión en agar fue realizado un solo día, con tres réplicas por tratamiento. Para la lectura de los resultados se tomaron tres mediciones de diámetro, por cada halo de inhibición. Los análisis de difusión en agar y los preliminares en *C. albicans* de dilución en agar de la etapa A, también fueron realizados un solo día, con sus respectivos triplicados (en cada caja multipozo). En cuanto a los estudios restantes (dilución en caldo etapa A para los tres microorganismos, etapa B y los ensayos de germinación) los análisis fueron realizados en dos días independientes y con sus respectivos triplicados.

Para el manejo de los resultados se realizó inicialmente análisis de varianza (ANOVA) y luego se aplicó el método de Tukey para reconocer las diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

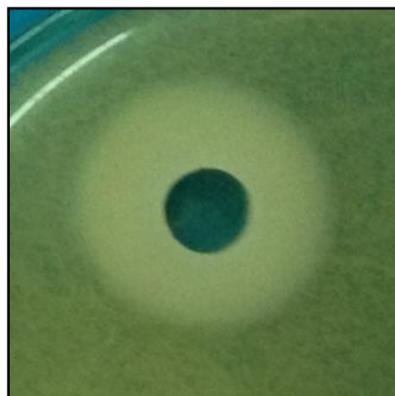
## **4.2 Presentación y discusión de los resultados**

### **i. Difusión en agar**

En primer lugar, se realizaron los ensayos para *Candida albicans*, en el medio de cultivo agar Sabouraud Dextrosa, observándose interferencia al contacto con las dispersiones de los complejos debido a la interacción entre los componentes del agar y los CPE. En la Figura 4-1 se incluye una fotografía en la que se detalla el aspecto que adquirió el agar durante el ensayo, en esta se evidencia la dificultad para determinar el diámetro de

inhibición, ya que la presencia del precipitado color blanco no permite diferenciar el crecimiento del microorganismo.

**Figura 4-1.** Fotografía de la interacción presentada entre agar Sabouraud y la dispersión acuosa del complejo EuB<sub>50</sub> (al 0,5% de AB) al emplear la metodología de difusión en agar.

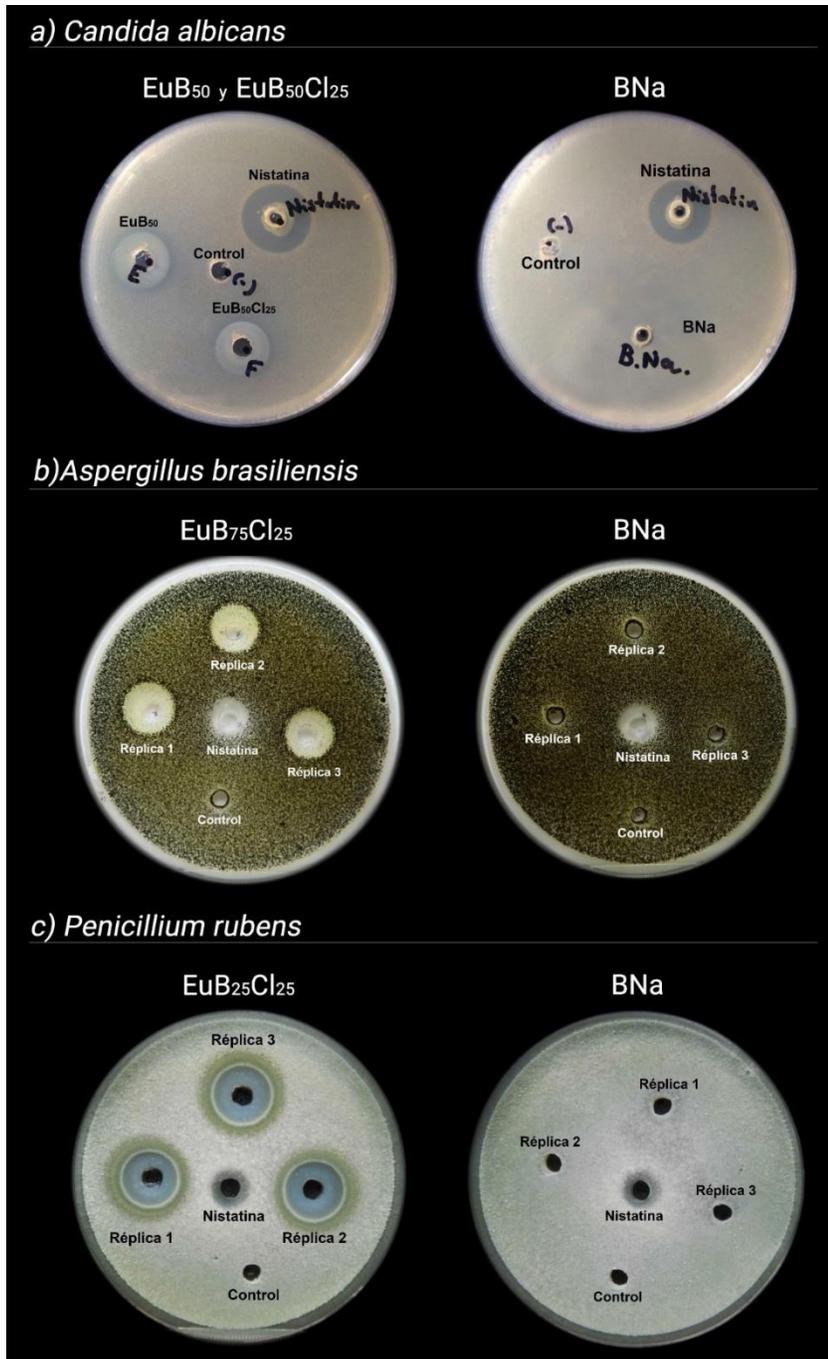


Para superar los inconvenientes relacionados con el medio de cultivo se realizaron ensayos preliminares de compatibilidad entre el agar y las dispersiones de los complejos (resultados no incluidos). Para ello se evaluaron algunos medios disponibles en el laboratorio —aptos para el crecimiento de levaduras— entre los que se eligió el agar Antibiótico 19 (AA19), por contar con un menor efecto de precipitación. En cuanto al medio de cultivo utilizado para los hongos filamentosos (PDA) no se observó ninguna interferencia con las dispersiones de los complejos.

En la Figura 4-2 se presentan imágenes, a modo de ejemplo, de los resultados de difusión en agar con los tres microorganismos, para algunos de los CPE y para el benzoato de sodio. Este último fue utilizado como reemplazo del ácido benzoico, debido a las limitantes de solubilidad del compuesto sin disociar que no permiten alcanzar la misma concentración que los complejos. En cada placa de Petri se realizó un control de crecimiento (agua estéril) y un control de inhibición (nistatina). Para *C. albicans* se observan los resultados de una de las réplicas de EuB<sub>50</sub> y de EuB<sub>50</sub>Cl<sub>25</sub>, mientras que, para *A. brasiliensis* y *P. rubens* se observan las tres réplicas de un solo complejo, EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub> y EuB<sub>25</sub>Cl<sub>75</sub>, respectivamente. En todas las placas se obtuvieron resultados satisfactorios para los controles. El efecto inhibitorio de nistatina fue menor en los hongos filamentosos que en la levadura, debido principalmente al mecanismo de acción del antifúngico que consiste en alterar la

permeabilidad de la membrana mediante unión al ergosterol [292], compuesto que se encuentra en mayor proporción en *C. albicans* que en los otros hongos [293].

**Figura 4-2** Fotografías del estudio de difusión en agar para algunos CPE y BNa (al 0,5% de AB) en **a) *C. albicans***, **b) *A. brasiliensis*** y **c) *P. rubens***. En cada placa se presenta control de crecimiento y control de inhibición (nistatina).



Los valores del diámetro de inhibición, para benzoato de sodio y para cada uno de los complejos, se resumen en la Tabla 4-2; en esta se observa que los resultados oscilan entre 7,9 mm y 19,1 mm, lo que —de manera preliminar— evidencia la existencia de actividad antimicótica de los CPE y descarta la hipótesis de pérdida del efecto del ácido benzoico tras su complejación. Cabe señalar que los resultados de *A. brasiliensis* presentaron un ligero crecimiento dentro del halo de inhibición, indicando un menor efecto inhibitorio que el observado frente a los otros dos hongos. Para el benzoato de sodio no se observó efecto inhibitorio en ninguno de los microorganismos dado que el desarrollo de este ensayo se realizó sin ajuste de pH, por tanto, para la solución de BNa el valor era de 8,4, cifra bastante superior al  $pK_a$  del ácido benzoico; esto explica la falta de actividad ya que el efecto del preservante es debido principalmente a la molécula no disociada, que tiene la capacidad de permear la membrana celular y alterar los procesos de homeostasis de los hongos [78].

**Tabla 4-2** Halos de inhibición (en mm) presentados por *C. albicans*, *A. brasiliensis* y *P. rubens* como respuesta a la aplicación de benzoato de sodio y a las dispersiones de los CPE al 0,5 % de ácido benzoico mediante la técnica de difusión en agar.

	Diámetro del halo de inhibición (mm)		
	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>	<i>P. rubens</i>
<b>EuB<sub>25</sub></b>	16,1 (1,6)	12,2 (2,4)	12,5 (2,7)
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>25</sub></b>	17,7 (0,9)	16,3 (3,5)	14,9 (2,0)
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>50</sub></b>	18,6 (0,5)	18,1 (0,6)	15,4 (2,4)
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>75</sub></b>	19,1 (0,3)	18,0 (0,3)	15,5 (1,2)
<b>EuB<sub>50</sub></b>	17,0 (1,2)	14,3 (2,0)	12,2 (1,5)
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>25</sub></b>	16,0 (1,0)	13,5 (0,4)	10,9 (2,0)
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub></b>	15,8 (0,6)	13,6 (0,9)	10,9 (1,6)
<b>EuB<sub>75</sub></b>	13,5 (0,4)	11,7 (1,7)	10,9 (0,8)
<b>EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub></b>	15,1 (0,7)	12,8 (0,9)	11,7 (2,1)
<b>EuB<sub>100</sub></b>	12,9 (0,8)	12,1 (1,3)	7,9 (2,3)
<b>BNa</b>	N.I.	N.I.	N.I.

Entre paréntesis: valores de coeficiente de variación (CV); N.I.: No inhibió.

Con los resultados de los halos de inhibición se realizaron comparaciones estadísticas mediante análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95% para establecer si los diámetros reportados para las diez composiciones de CPE contaban con diferencias estadísticamente significativas. En la Tabla 4-3 se presenta el ANOVA para los tres microorganismos, en esta se observa que la hipótesis nula fue rechazada en los tres casos, indicando que, en al menos uno de los complejos, el diámetro promedio del halo de inhibición era distinto. Para reconocer cuales eran las diferencias significativas entre

resultados se procedió a aplicar el método de Tukey, el cual evalúa comparaciones múltiples entre medias y genera grupos que son significativamente diferentes. En la Tabla 4-4 se presentan las agrupaciones generadas para los halos de inhibición promedio de cada CPE en los tres microorganismos, organizadas de mayor a menor y representadas por letras entre A a la H.

**Tabla 4-3** Análisis de varianza evaluando los halos de inhibición del crecimiento de *C. albicans*, *A. brasiliensis* y *P. rubens* tratados con dispersiones de los complejos al 0,5% de AB.

$H_o$	El diámetro promedio del halo de inhibición para los diez complejos es igual, con 95% de confiabilidad.		
$H_a$	En al menos uno de los complejos, el diámetro promedio del halo de inhibición es distinto, con 95% de confiabilidad		
$F_{critico}$	1,99		
Microorganismo	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>	<i>P. rubens</i>
$F_{experimental}$	541,60	283,19	882,02
Concepto	Se rechaza la $H_o$ y se acepta la $H_a$ para los tres microorganismos		

*H<sub>o</sub>*: Hipótesis nula; *H<sub>a</sub>*: Hipótesis alterna.

**Tabla 4-4** Método de Tukey evaluando los halos de inhibición del crecimiento de *C. albicans*, *A. brasiliensis* y *P. rubens* tratados con dispersiones de los complejos al 0,5% de AB.

Microorganismo	Agrupación utilizando el método de Tukey y confianza de 95%			
	Complejo	N	Media	Agrupación
<b><i>Candida albicans</i></b>	EuB <sub>25</sub> Cl <sub>75</sub>	9	19,1	A
	<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>50</sub></b>	<b>9</b>	<b>18,6</b>	<b>B</b>
	EuB <sub>25</sub> Cl <sub>25</sub>	9	17,7	C
	<b>EuB<sub>50</sub></b>	<b>9</b>	<b>17,0</b>	<b>D</b>
	EuB <sub>25</sub>	9	16,1	E
	EuB <sub>50</sub> Cl <sub>25</sub>	9	16,0	E
	EuB <sub>50</sub> Cl <sub>50</sub>	9	15,8	E
	<b>EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub></b>	<b>9</b>	<b>15,1</b>	<b>F</b>
	EuB <sub>75</sub>	9	13,5	G
	<b>EuB<sub>100</sub></b>	<b>9</b>	<b>12,9</b>	<b>H</b>
<b><i>Aspergillus brasiliensis</i></b>	EuB <sub>25</sub> Cl <sub>50</sub>	9	18,1	A
	EuB <sub>25</sub> Cl <sub>75</sub>	9	18,0	A
	<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>25</sub></b>	<b>9</b>	<b>16,3</b>	<b>B</b>
	EuB <sub>50</sub>	9	14,3	C
	<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub></b>	<b>9</b>	<b>13,6</b>	<b>D</b>
	<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>25</sub></b>	<b>9</b>	<b>13,5</b>	<b>D E</b>
	EuB <sub>75</sub> Cl <sub>25</sub>	9	12,8	E F
	<b>EuB<sub>25</sub></b>	<b>9</b>	<b>12,2</b>	<b>F G</b>
	<b>EuB<sub>100</sub></b>	<b>9</b>	<b>12,1</b>	<b>G</b>
	<b>EuB<sub>75</sub></b>	<b>9</b>	<b>11,7</b>	<b>G</b>

	<b>Complejo</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
<b><i>Penicillium rubens</i></b>	EuB <sub>25</sub> Cl <sub>75</sub>	9	15,5	A
	EuB <sub>25</sub> Cl <sub>50</sub>	9	15,4	A
	<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>25</sub></b>	<b>9</b>	<b>14,9</b>	<b>B</b>
	EuB <sub>25</sub>	9	12,5	C
	EuB <sub>50</sub>	9	12,2	C
	<b>EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub></b>	<b>9</b>	<b>11,7</b>	<b>D</b>
	EuB <sub>75</sub>	9	10,9	E
	EuB <sub>50</sub> Cl <sub>25</sub>	9	10,9	E
	EuB <sub>50</sub> Cl <sub>50</sub>	9	10,9	E
	<b>EuB<sub>100</sub></b>	<b>9</b>	<b>7,9</b>	<b>F</b>

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. N: número de datos por tratamiento.

De los resultados del método de Tukey se observa que los diámetros de inhibición fueron reunidos en 8, 7 y 6 grupos para *C. albicans*, *A. brasiliensis* y *P. rubens*, respectivamente. Para la levadura se encontró que prácticamente cada resultado era significativamente diferente, a excepción del grupo E conformado por tres complejos. Para los hongos restantes el número de grupos conformados por más de un CPE fue de 5 para *A. brasiliensis* y 3 para *P. rubens*. En los tres microorganismos los complejos EuB<sub>25</sub>Cl<sub>75</sub>, EuB<sub>25</sub>Cl<sub>50</sub> y EuB<sub>25</sub>Cl<sub>25</sub> pertenecieron a las agrupaciones con mayor respuesta de inhibición, mientras que los complejos EuB<sub>75</sub> y EuB<sub>100</sub> se ubicaron en los grupos de menor diámetro. Tales resultados reflejan el efecto de la composición de cada dispersión en la actividad antimicótica ya que aquellas con mayor concentración del contraión cloruro y en consecuencia menor pH, fueron las de mejor respuesta inhibitoria; vale la pena aclarar que para el estudio no se realizó ajuste de pH y que la concentración de los iones Cl<sup>-</sup> fue variable debido a que las dispersiones se prepararon en función de la concentración de AB. En la Tabla 4-5 se presenta la concentración de iones cloruro, para cada una de las dispersiones de los complejos al 0,5 % de ácido benzoico y además se incluye el porcentaje del PE. Los valores presentados en la tabla confirman la relación —mencionada previamente— entre actividad inhibitoria y concentración de iones cloruro.

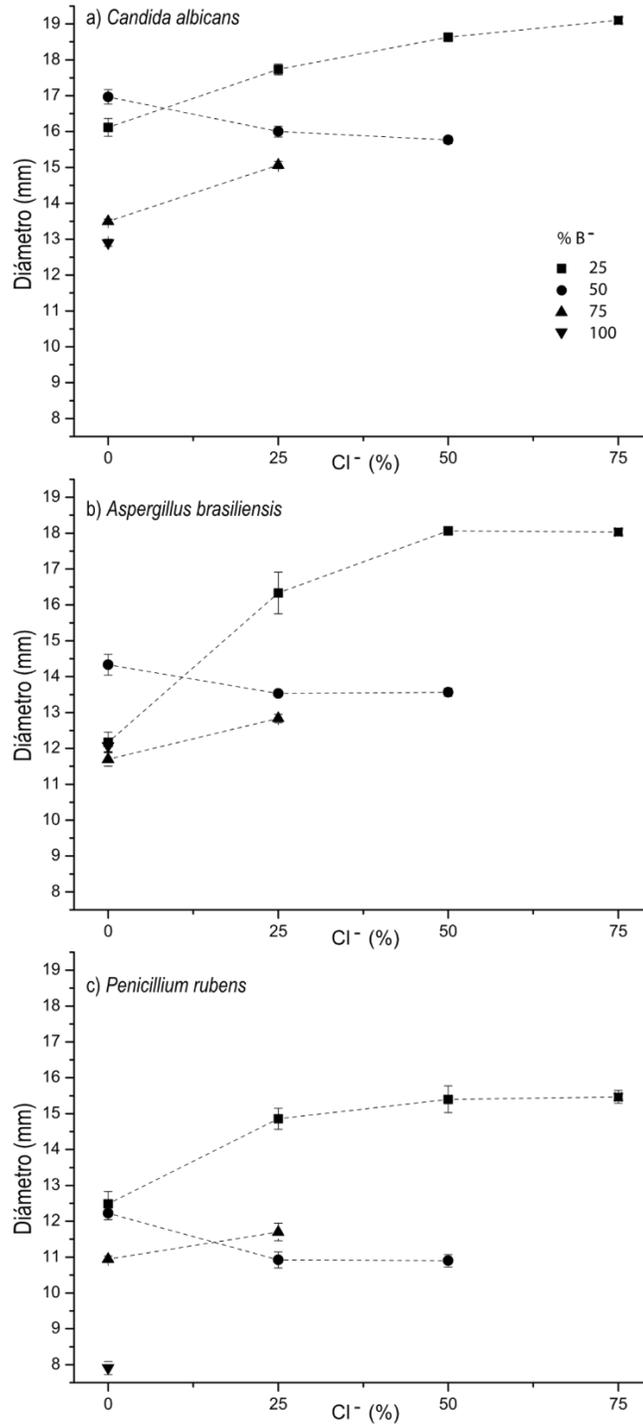
**Tabla 4-5** Concentración de Cl<sup>-</sup> y EuE para las dispersiones de CPE al 0,5% de AB.

<b>Complejo</b>	<b>[Cl<sup>-</sup>] (%)</b>	<b>[EuE] (%)</b>
<b>EuB<sub>25</sub></b>	0	5,43
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>25</sub></b>	0,15	5,43
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>50</sub></b>	0,30	5,43
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>75</sub></b>	0,45	5,43
<b>EuB<sub>50</sub></b>	0	2,72
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>25</sub></b>	0,07	2,72
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub></b>	0,15	2,72
<b>EuB<sub>75</sub></b>	0	1,81
<b>EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub></b>	0,05	1,81
<b>EuB<sub>100</sub></b>	0	1,36

Para facilitar la interpretación de los resultados de los halos de inhibición en el crecimiento de los hongos, en función de la composición del CPE (datos de la Tabla 4-2), se realizó la Figura 4-3.

En la Figura 4-3 se observa que, en términos generales, la tendencia de los resultados para los tres microorganismos es semejante, aunque los valores de los diámetros de inhibición de *Penicillium rubens* son más bajos que los registrados para los otros dos hongos; adicionalmente se evidencia un aumento en el diámetro de inhibición a medida que incrementa el porcentaje de grupos DMAE neutralizado con ácido clorhídrico, excepto para la serie de complejos EuB<sub>50</sub>Cl<sub>x</sub>, en la que el resultado de la dispersión de EuB<sub>50</sub> presentó, para los tres microorganismos, un resultado anómalo a la tendencia general (fue mucho mayor de lo esperado) demostrando el efecto de otras variables en el análisis y asimismo la necesidad de estandarizar condiciones de ensayo adicionales, como el pH. Llama la atención que las dispersiones de los complejos EuB<sub>25</sub>Cl<sub>25</sub> y EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub> registraran resultados de diámetros con diferencias estadísticamente significativas, según los resultados del método de Tukey (ver Tabla 4-4). Las dispersiones de estos complejos contaban con la misma concentración del contraión cloruro, este hecho sugiere un posible efecto relacionado con la concentración del PE (ver Tabla 4-5) puesto que aquellos complejos con un mayor porcentaje de EuE, tuvieron una mayor inhibición; esto suscita un posible efecto de sinergia del polielectrolito en la actividad antimicótica de los complejos.

**Figura 4-3** Diámetro de los halos de inhibición (en mm) presentados por a) *C. albicans*, b) *A. brasiliensis* y c) *P. rubens* como respuesta a la aplicación de las dispersiones de los CPE al 0,5% de AB. Complejos:  $\text{EuB}_{25}\text{Cl}_x$  (■),  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_x$  (●),  $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_x$  (▲) y  $\text{EuB}_{100}$  (▼). En el eje X se presenta el porcentaje de grupos DMAE neutralizado con ácido clorhídrico.



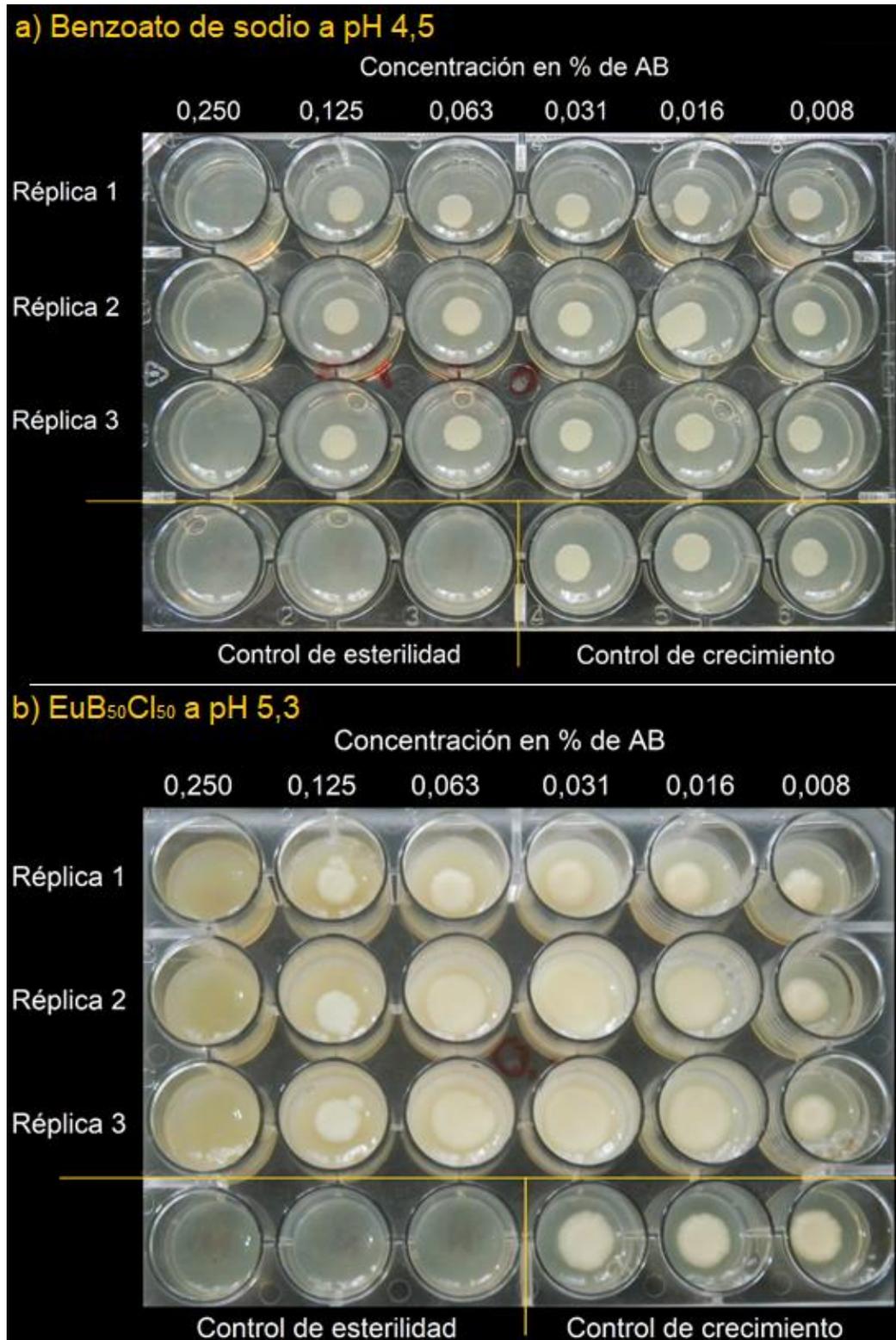
## ii. Dilución en agar

Con el propósito de cuantificar el efecto inhibitorio de las dispersiones de los complejos, se evaluó el uso de la metodología “dilución en agar” a fin de determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI). Los ensayos preliminares se realizaron con el complejo  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$  y el microorganismo *C. albicans* a seis valores de pH, que fueron logrados mediante adición de ácido clorhídrico al agar. En la Figura 4-4 se presentan, a manera de ejemplo, las fotografías de los resultados para benzoato de sodio a pH 4,5 y del complejo a pH 5,3; en las imágenes se observa que los controles de crecimiento y de esterilidad arrojaron resultados satisfactorios. Asimismo, se evidencia que en todos los casos, las tres réplicas de cada tratamiento contaron con los mismos resultados. Para los dos análisis de la figura, la CMI fue de 0,250 % de AB, correspondiente a la concentración más baja en la que no se observó crecimiento de la levadura. En la Tabla 4-6 se presentan los datos de CMI para BNa y para el CPE a los seis valores de pH estudiados.

**Tabla 4-6** CMI frente a *Candida albicans* para el complejo  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$  y benzoato de sodio a seis valores de pH, determinada por el método de dilución en agar.

pH	CMI (% de AB)					
	3,7	4,5	4,9	5,3	5,8	6,1
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub></b>	0,016	0,063	0,063	0,125	0,250	> 0,250
<b>BNa</b>	0,031	0,125	0,125	0,250	> 0,250	> 0,250

**Figura 4-4** Fotografías de los resultados de la metodología dilución en agar para la determinación de la CMI de: **a)** Benzoato de sodio a pH 4,5 y **b)** EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub> a pH 5,3; frente a *C. albicans*.



Los valores reportados en la Tabla 4-6 obedecen a la tendencia esperada para el mecanismo de acción de ácido benzoico, puesto que, a mayor pH, mayor fue la concentración de complejo o BNa necesaria para impedir el crecimiento del microorganismo; también se observa que el complejo contó con valores de CMI más bajos —en una dilución— que los de benzoato de sodio, sugiriendo una pequeña ventaja sobre este. Sin embargo, se decidió no implementar esta metodología para la evaluación de la actividad antimicótica de los diez CPE debido, entre otros, a:

- ☞ La posible interferencia en el análisis por la interacción entre el complejo y el agar, que se manifiesta en el aspecto opaco y diferente de los pozos que contienen  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$  (comparar resultados de las secciones a y b de la Figura 4-4).
- ☞ Dificultad para fijar el pH en el medio de cultivo por tratarse de un agar y no de un caldo.
- ☞ La ausencia de interacción entre el microorganismo y el agente antimicótico en una misma fase, puesto que, en la metodología de dilución en agar la dispersión del complejo se solidifica en el medio de cultivo, mientras que, las levaduras o esporas son ubicadas en la superficie de este, de modo que algunos de los fenómenos involucrados con el contacto directo entre las células de los hongos y la dispersión del complejo no tendrían lugar y por tanto los resultados no reflejarían todo el potencial antimicótico de los CPE.

Por lo anterior, se procedió a realizar los estudios de actividad mediante dilución en caldo.

### iii. Dilución en caldo

Como se mencionó en la metodología, esta sección se desarrolló en dos etapas:

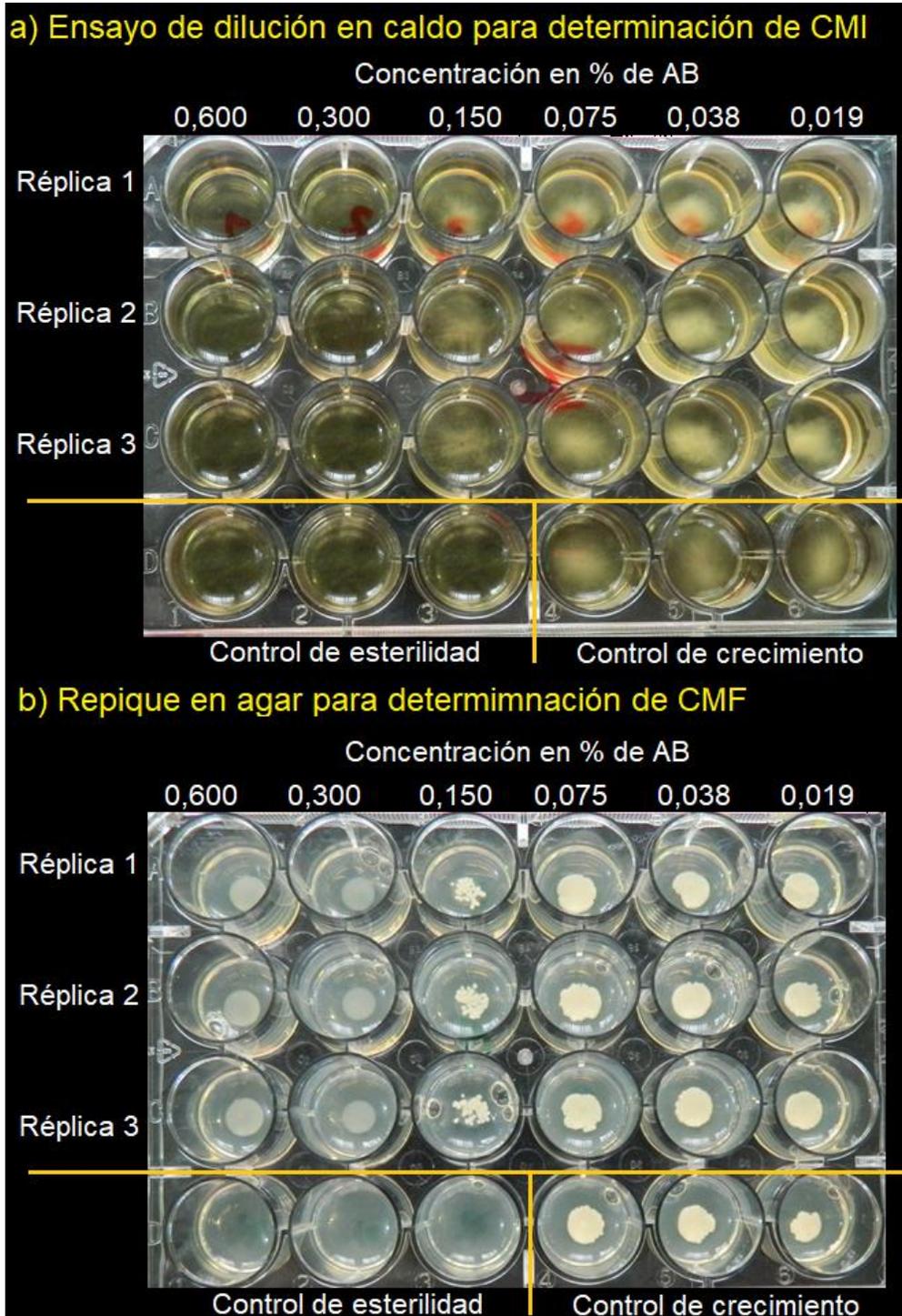
#### **ETAPA A**

Los primeros ensayos se realizaron únicamente sobre *Candida albicans*. Para evitar contaminación durante la preparación de las dispersiones o soluciones, se obtuvo la de mayor concentración (solución madre) mediante adición del complejo o de BNa (en estado sólido) al medio de crecimiento estéril (con pH ajustado a 5,2) y posterior homogenización

en agitador vortex. Para las cinco diluciones restantes se empleó el volumen calculado de la solución madre y el respectivo volumen del medio de cultivo estéril (a pH 5,2). En la Figura 4-5 se presentan, a modo de ejemplo, las fotografías de los resultados para  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$ ; en la sección “a)” se observa la placa multipozo para el ensayo de dilución en caldo, con una distribución semejante a la del ensayo de dilución en agar: seis concentraciones del analito en estudio, un control de esterilidad y un control de crecimiento, cada uno con sus respectivas réplicas. La concentración de la solución madre se estableció en un valor alto (0,60 % de AB) para asegurar que en el rango estudiado se observara inhibición. Para la placa de la figura se observan resultados satisfactorios de los controles y la ausencia de crecimiento en las dos primeras concentraciones evaluadas, a partir de la tercera (0,15 % de AB) es evidente el crecimiento de la levadura, el cual incrementa a medida que disminuye el contenido de complejo, concluyendo que la CMI es de 0,30 % de AB para el complejo  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$ . En la sección “b)” de la figura se presenta el repique de 10  $\mu\text{l}$  de cada uno de los pozos —desde la placa de dilución en caldo, a otra con agar AA19— el cual arrojó los mismos resultados de la placa de origen, por lo tanto, la CMF correspondió también a 0,30 % de AB. Vale la pena aclarar que el aspecto presentado por los pozos de las concentraciones a 0,60 % y 0,30 % de AB no corresponde al crecimiento de *Candida albicans*, esto se verificó con el asa bacteriológica al hacer un raspado de la superficie y encontrar que no habían colonias de aspecto cremoso, típicas del crecimiento de la levadura; en consecuencia se dedujo que el aspecto blancuzco corresponde a algún tipo de interacción entre la dispersión del complejo y el medio de cultivo.

Los resultados de CMI y CMF para las diez composiciones de los CPE y para BNa se presentan en la Tabla 4-7. Debido a que no se realizó ajuste final de pH en las dispersiones y cada una contó con un valor diferente, se incluyó en la tabla el valor de pH a la mayor concentración (medido con potenciómetro Hanna HI 2221), fundamental para la interpretación de los resultados de actividad exhibidos.

**Figura 4-5** Fotografías de los resultados de la metodología dilución en caldo para la determinación **a)** CMI y **b)** CMF de:  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$  frente a *C. albicans* (utilizando medio de crecimiento a pH 5,2 sin ajuste de pH final)



**Tabla 4-7** CMI y CMF frente a *C. albicans* para BNa y los diez CPE, (utilizando medio de crecimiento a pH 5,2 pero sin ajuste de pH final) y el pH de las dispersiones o solución al 0,6% de AB.

	<b>CMI (% de AB)</b>	<b>CMF (% de AB)</b>	<b>pH al 0,6% de AB</b>
<b>EuB<sub>25</sub></b>	> 0,600	> 0,600	7,59
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>25</sub></b>	> 0,600	> 0,600	7,45
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>50</sub></b>	> 0,600	> 0,600	7,03
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>75</sub></b>	0,300	0,300	5,30
<b>EuB<sub>50</sub></b>	> 0,600	> 0,600	7,46
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>25</sub></b>	> 0,600	> 0,600	6,94
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub></b>	0,300	0,300	5,31
<b>EuB<sub>75</sub></b>	> 0,600	> 0,600	6,60
<b>EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub></b>	0,300	0,600	5,53
<b>EuB<sub>100</sub></b>	0,300	0,600	5,67
<b>BNa</b>	0,300	0,600	5,72

Los resultados de la Tabla 4-7 demostraron la necesidad de realizar el ajuste final de pH en las dispersiones estudiadas, dado que, la actividad antimicótica de los analitos se manifestó en función de este parámetro: aquellos con valores más bajos de pH —filas sombreadas en gris— contaron con menores CMI y CMF; de hecho, en todos los sistemas con pH superior a 6,60 se observó el crecimiento del hongo a las seis concentraciones en estudio.

Para realizar el ajuste del pH de las dispersiones y mantener al mismo tiempo el sistema estéril, se encontró gran dificultad a nivel experimental, puesto que el proceso requirió de: esterilizar el medio, agregar el CPE en estado sólido, agitar, adicionar solución estéril de HCl o NaOH, homogenizar y verificar pH. Ante la imposibilidad de esterilizar el electrodo del potenciómetro, fue necesario hacer la medición de pH en una alícuota y descartarla, asimismo fue indispensable utilizar volúmenes pequeños de las soluciones (ácida o alcalina) para no alterar la concentración del analito. Lo anterior se realizó no solo para la solución de mayor concentración, sino además para las diluciones, ya que se presentaron cambios de pH en las demás concentraciones, aun cuando el medio de cultivo y la solución madre contaban con el mismo valor de pH.

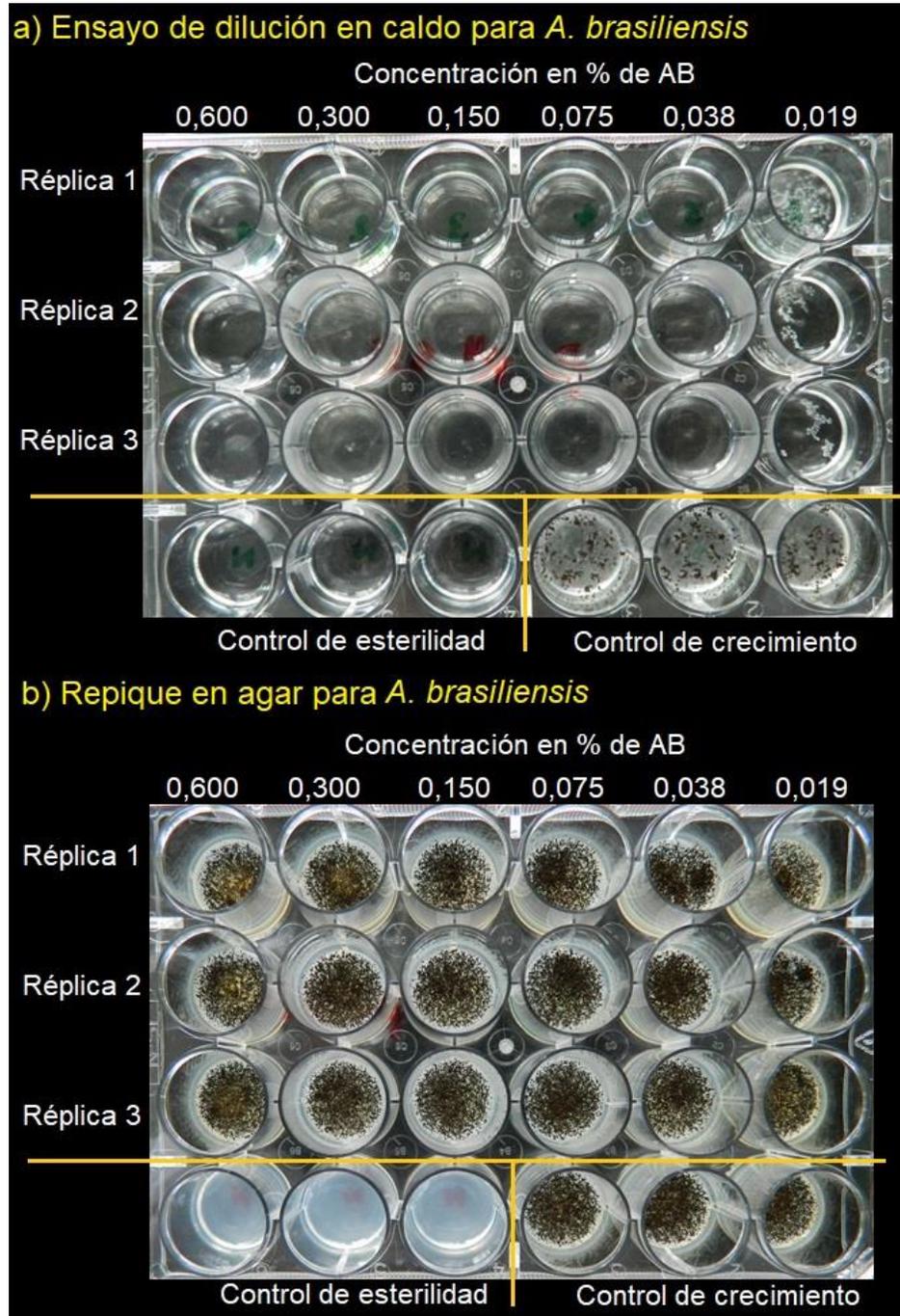
Con el objetivo de facilitar la metodología expuesta, se realizaron algunos ensayos con dos de los complejos (EuB<sub>50</sub> y EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub>) sobre *C. albicans*, que fue elegida por contar con un menor tiempo de incubación. Los ensayos consistieron en comparar la respuesta del

estudio de dilución en caldo, al realizar el ajuste de pH como se describió en el párrafo anterior (utilizando todo estéril), con la respuesta obtenida al utilizar otra metodología, que consistió en preparar las dispersiones de los CPE en el medio de cultivo sin esterilizar, realizar el ajuste de pH (para todas las diluciones) y finalmente esterilizar con calor húmedo. Los resultados de estos ensayos (valores no incluidos) establecieron la inexistencia de diferencias entre metodologías de ajuste de pH, por ello para facilidad del experimentador y teniendo en cuenta que la estabilidad del AB no se alteraba [294], los siguientes ensayos se realizaron con la esterilización posterior.

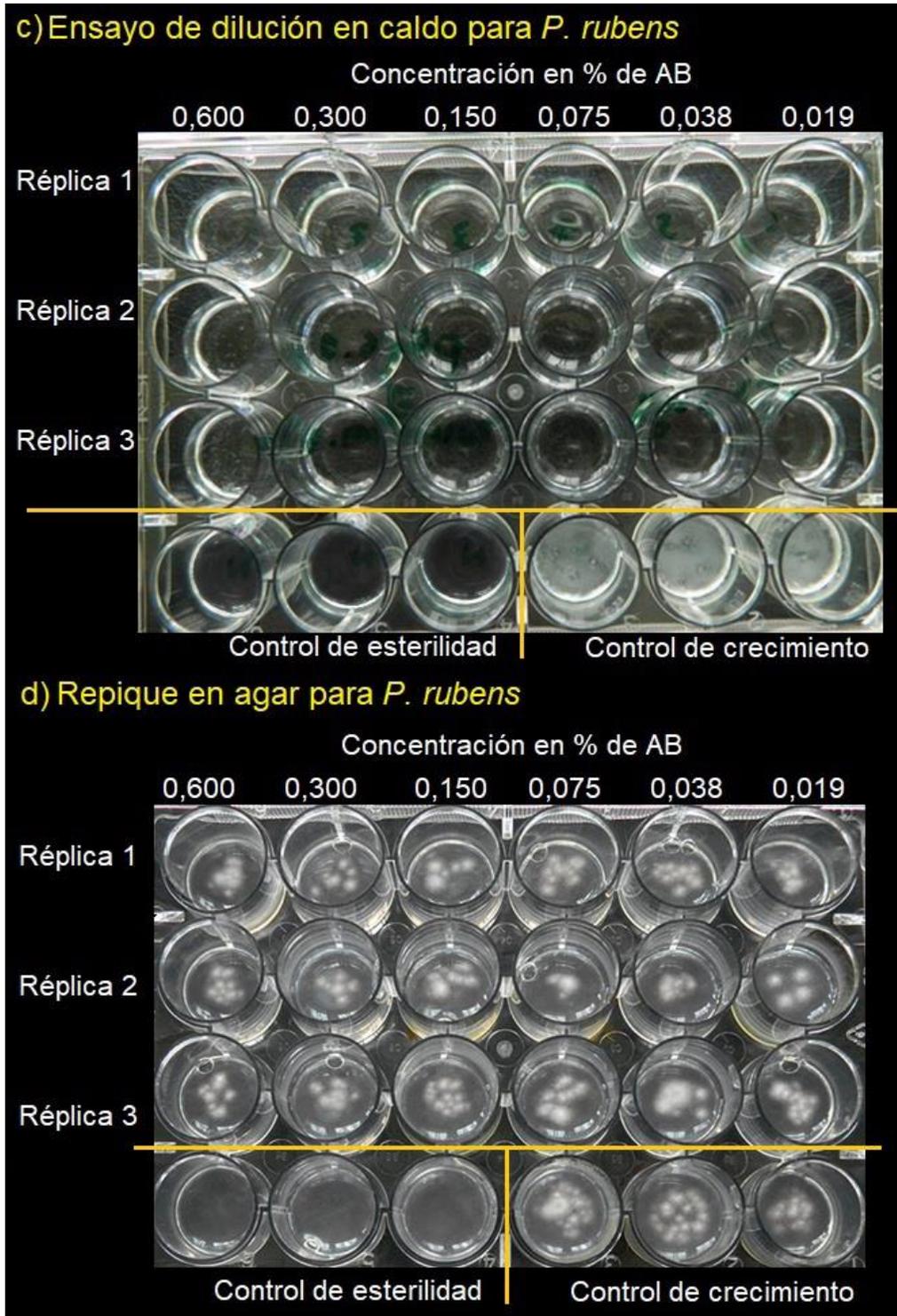
Una vez identificada la metodología para realizar el ajuste de pH, se ejecutaron los estudios de dilución en caldo para todas las composiciones de CPE y para BNa, frente a los tres microorganismos, a pH de 6,0. Este valor de pH fue elegido para desafiar la actividad de los complejos, ya que el desempeño de ácido benzoico es limitado a esta condición. En la Figura 4-6 se incluyen —a modo de ejemplo— las fotografías de los resultados de  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$  frente a los dos hongos filamentosos. En las imágenes se observan resultados satisfactorios para los controles (de esterilidad y crecimiento) de las cuatro placas multipozo; para el estudio de dilución en caldo frente a *A. brasiliensis* (sección **a**) se observó un crecimiento considerable del microorganismo a la concentración más baja, en cambio, para *Penicillium rubens* (ver sección **c**, Figura 4-6), se evidenció un crecimiento (casi imperceptible) del hongo en todas las concentraciones estudiadas, por ello, se tuvo en cuenta que: “Para agentes fungistáticos la CMI debe ser la concentración más baja de antifúngico que produce una reducción aparente de crecimiento (mayor o igual al 50 %) comparada con el control” [295], en consecuencia el valor de CMI reportado para  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$  frente a *P. rubens* fue “inferior a 0,019 % de AB”, ya que en ninguno de los pozos el crecimiento fue superior al 50 % del percibido para el control. En cuanto a las placas de repique en agar (secciones **b** y **d**, Figura 4-6) se observó crecimiento de los microorganismos a todos los niveles de concentración evaluados, aun cuando los resultados en caldo mostraron inhibición, indicando un efecto de tipo fungistático para el complejo en estudio, el cual se encuentra en línea con las propiedades del ácido benzoico (baja actividad sobre esporas) [67]. Los resultados arrojados para los analitos restantes —frente a los dos hongos filamentosos— fueron semejantes a los descritos para  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$ ; respecto a la levadura, se observó un comportamiento similar al registrado en la sección

anterior (Figura 4-5), con un efecto de tipo fungicida y por tanto con valores de CMF asociados. En la Tabla 4-8 se resumen los datos de CMI y CMF del estudio completo.

**Figura 4-6** Fotografías de los resultados de la metodología dilución en caldo para la determinación de CMI y CMF para  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$  frente a *A. brasiliensis* (sección a y b) y frente a *P. rubens* (sección c y d).



**Figura 4-6 (Continuación)** Fotografías de los resultados de la metodología dilución en caldo para la determinación de CMI y CMF para  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$  frente a *A. brasiliensis* (sección a y b) y frente a *P. rubens* (sección c y d).



**Tabla 4-8** CMI y CMF frente a *C. albicans*, *A. brasiliensis* y *P. rubens* para BNa y los diez CPE a pH ajustado de 6,0.

	<i>C. albicans</i>		<i>A. brasiliensis</i>		<i>P. rubens</i>	
	CMI (% de AB)	CMF (% de AB)	CMI (% de AB)	CMF	CMI (% de AB)	CMF
<b>EuB<sub>25</sub></b>	0,600	0,600	0,150	N.A.	0,075	N.A.
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>25</sub></b>	0,600	0,600	0,150	N.A.	0,075	N.A.
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>50</sub></b>	0,600	0,600	0,150	N.A.	0,075	N.A.
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>75</sub></b>	0,600	0,600	0,075	N.A.	0,075	N.A.
<b>EuB<sub>50</sub></b>	0,600	0,600	0,075	N.A.	0,038	N.A.
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>25</sub></b>	0,600	0,600	0,075	N.A.	0,038	N.A.
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub></b>	0,600	0,600	0,038	N.A.	< 0,019	N.A.
<b>EuB<sub>75</sub></b>	0,600	0,600	0,075	N.A.	0,038	N.A.
<b>EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub></b>	0,600	0,600	0,038	N.A.	< 0,019	N.A.
<b>EuB<sub>100</sub></b>	0,600	0,600	0,038	N.A.	< 0,019	N.A.
<b>BNa</b>	0,600	> 0,600	0,600	N.A.	< 0,019	N.A.

N.A.: No aplica.

Las réplicas de todos los análisis realizados arrojaron los mismos resultados, por ello en la Tabla 4-8 no se registra información de coeficiente de variación, de tal forma que, valores distintos en la tabla cuentan con diferencias estadísticamente significativas. Para los resultados de CMI se observa que los hongos filamentosos presentaron valores más bajos que la levadura, sin embargo, esta contó con un efecto tipo fungicida, mientras que, los otros dos con un efecto fungistático, por ello no registraron información de CMF. Para *C. albicans* los resultados de CMI no variaron, todas contaron con el mismo valor (0,600 % de AB), mientras que, *A. brasiliensis* y *P. rubens* registraron tres datos distintos de CMI (entre las diez composiciones); la tendencia general de actividad antimicótica expuso a los complejos: EuB<sub>25</sub>, EuB<sub>25</sub>Cl<sub>25</sub> y EuB<sub>25</sub>Cl<sub>50</sub> como los de peor desempeño y a: EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub>, EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub> y EuB<sub>100</sub> (resultados sombreados en gris en la tabla), como los complejos de mayor actividad. En cuanto a BNa se observó que solo para *P. rubens* los resultados eran iguales a aquellos con mejor respuesta, ya que frente a los dos hongos restantes demostró poca actividad.

Con el propósito de realizar un análisis de la influencia de los demás componentes del CPE en la actividad expuesta, se realizó la Tabla 4-9 con la información de la concentración del PE y de los contraiones cloruro (provenientes del complejo) al valor de mayor concentración utilizado en el estudio de dilución en caldo (0,6 % de AB). De la tabla se

infiere que a condiciones controladas de pH, los complejos con baja concentración del PE son los mismos con mayor actividad y a su vez, los de mayor concentración de EuE son los de peor respuesta, sugiriendo un efecto negativo en la actividad debido a la presencia del polímero; sin embargo los complejos contaron con menor CMI que la registrada para BNa para dos de los microorganismos, por ello se consideró necesario realizar estudios complementarios para corroborar el papel del PE en el sistema. En cuanto a la concentración del contraión cloruro, a condiciones controladas de pH, no se evidenció ningún efecto ni tendencia en la actividad de los complejos.

**Tabla 4-9** Concentración de EuE y Cl<sup>-</sup> para las dispersiones de CPE al 0,6% de AB.

<b>Complejo</b>	<b>[EuE] (%)</b>	<b>[Cl<sup>-</sup>] (%)</b>
<b>EuB<sub>25</sub></b>	6,52	0,00
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>25</sub></b>	6,52	0,18
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>50</sub></b>	6,52	0,36
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>75</sub></b>	6,52	0,54
<b>EuB<sub>50</sub></b>	3,27	0,00
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>25</sub></b>	3,27	0,09
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub></b>	3,27	0,18
<b>EuB<sub>75</sub></b>	2,18	0,00
<b>EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub></b>	2,18	0,06
<b>EuB<sub>100</sub></b>	1,63	0,00

Con el propósito de comparar los resultados de CMI (obtenidos para los complejos) con los reportados en la literatura para ácido benzoico, se realizó la respectiva búsqueda bibliográfica, sin embargo, no se encontró ningún estudio en el que evaluaran simultáneamente los tres hongos, escenario deseable para asegurar que las condiciones de análisis fueran iguales, ya que el valor de la CMI registrado depende de variables como la concentración de las diluciones dobles seriadas evaluadas, el pH, el medio de cultivo, entre otros. Un aspecto que dificultó la recolección de la información fue la reclasificación en la última década de dos de los hongos: de *Aspergillus niger* a *Aspergillus brasiliensis* y de *Penicillium chrysogenum* a *Penicillium rubens* [284,287], por ello los nombres originales también fueron considerados en la revisión. En la Tabla 4-10 se presentan los datos de CMI reportados en algunas investigaciones para *C. albicans* y *A. niger*, ya que para *P. rubens* no se encontraron reportes de CMI de AB; para facilidad de interpretación, la información se presenta en las mismas unidades de la publicación y en porcentaje.

**Tabla 4-10** Valores de CMI de AB frente a *C. albicans* y *A. niger* reportados en la literatura

Microorganismo	CMI reportada	CMI (% AB)	pH	Referencia
<i>Candida albicans</i> (JSM 101)	10 a 100 mmol/L	0,12 a 1,22	Rango entre 4,0 y 7,6	[296]
<i>Candida albicans</i> (PMFKg-F8)	2,5 mg/ml	0,25	No especificado	[297]
<i>Candida albicans</i> (ATCC 44503)	35530 µM	0,43	6,75 (pH de saliva)	[298]
<i>Aspergillus niger</i>	2000 ppm (mcg/ml)	0,20	5.0	[78]
<i>Aspergillus niger</i> (ATCC 16404)	5,73 mM	0,07	No especificado	[299]
<i>Aspergillus niger</i>	0,04%	0,04%	3	[300]
	0,20%	0,20%	5	
	>0,20 %	>0,20 %	7	
	>0,20%	>0,20%	9	

Los valores de CMI de la literatura muestran que los resultados obtenidos para BNa en el presente estudio se encuentran en un rango semejante, sin embargo, en ninguno de los casos hubo un reporte a condición de pH 6,0.

En cuanto a las diferencias entre las CMI de los hongos filamentosos (Tabla 4-8), se encontró que los datos para *P. rubens* eran inferiores que los de *A. brasiliensis*, respuesta que se encuentra en línea con el estudio de Stanojevic D. y col en el que un hongo del género *Penicillium* contó con menor CMI para benzoato de sodio que otro del género *Aspergillus* [297]. De manera similar, la investigación de Huang Y. y col para sorbato de potasio, agente preservante de la familia de los ácidos débiles con igual mecanismo de acción, a pH 6,0 contó con CMI de 0,55% para *A. niger* y 0,40% para *Penicillium roqueforti* [301]. Estos resultados sugieren una relación entre la actividad antimicótica y las características morfológicas asociadas a la taxonomía de los microorganismos.

### **ETAPA B**

Teniendo en cuenta que el estudio de dilución en caldo frente a *P. rubens* presentó un ligero crecimiento del hongo en todas las concentraciones evaluadas, se consideró de gran utilidad cuantificar las unidades formadoras de colonia (UFC) viables, luego de la incubación del microorganismo con cada uno de los tratamientos estudiados. Esta metodología además permitió conocer resultados mucho más discriminados para cada una de las composiciones de los CPE, ya que los rangos entre las concentraciones evaluadas

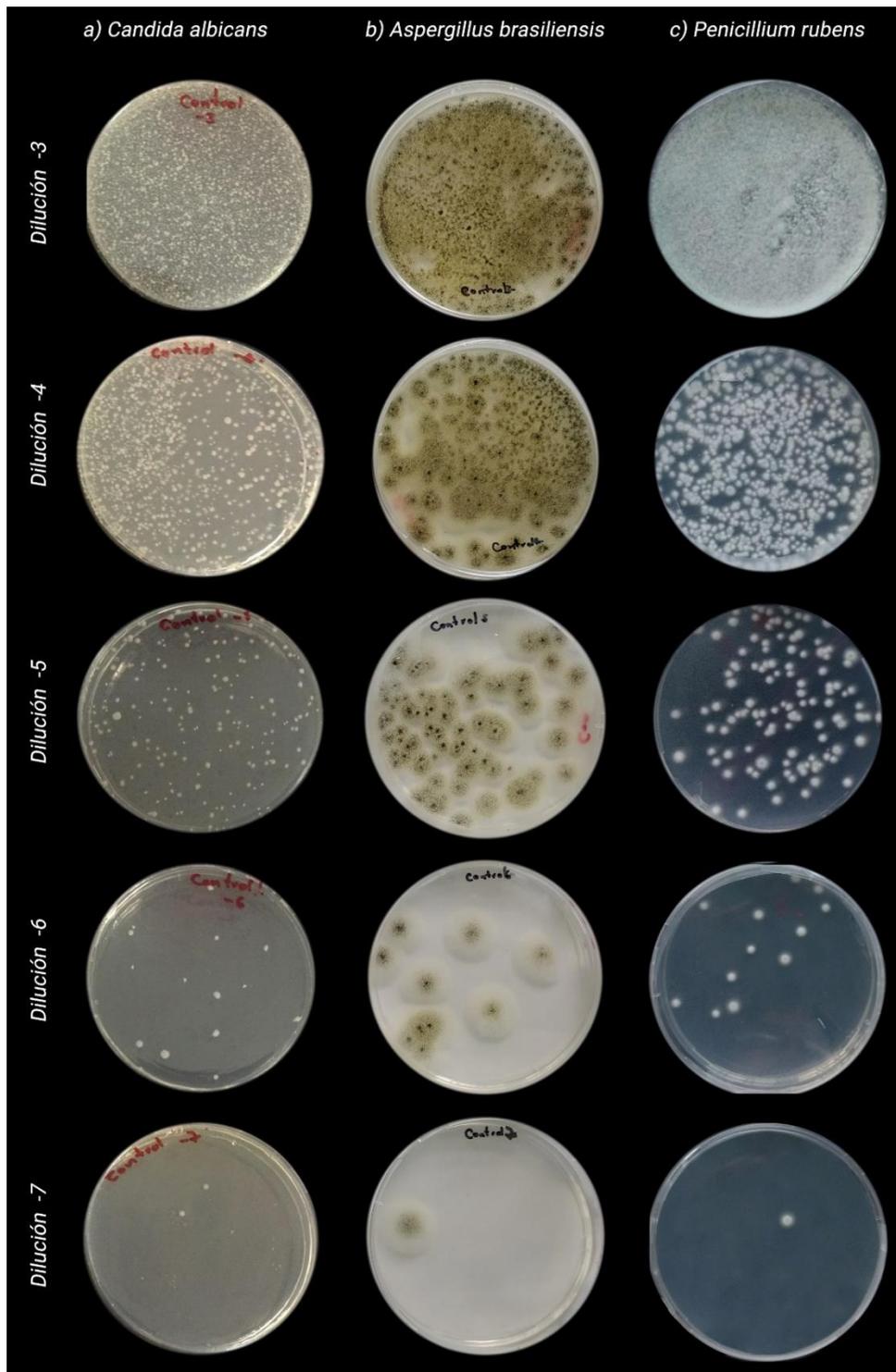
para la determinación de CMI fueron amplios (por tratarse de diluciones seriadas) y no permitieron establecer grandes diferencias entre las respuestas de cada uno de los complejos.

A fin de evaluar el efecto del polímero sin ácido benzoico, se incluyó el sistema obtenido por neutralización del 100% de los grupos DMAE con ácido clorhídrico ( $\text{EuCl}_{100}$ ). Para establecer la concentración a utilizar —ya que los ensayos se realizaron en función del % de AB— se decidió mantener la misma concentración de EuE que las dispersiones de  $\text{EuB}_{100}$ ; se eligió este complejo porque fue uno de los que contó con mayor actividad (según la etapa previa) y porque su dispersión cuenta con la menor concentración del polímero, condición que desafía aún más el efecto del  $\text{EuCl}_{100}$ .

Con el objetivo de mostrar el aspecto de los resultados de esta etapa se incluyó la Figura 4-7, la cual recopiló fotografías del recuento de células viables para uno de los controles de crecimiento de cada microorganismo. En la figura se observa que los resultados mantuvieron la tendencia esperada —incrementos de 10 veces entre placas— y que la metodología permitía realizar de modo sencillo el recuento de UFC. Todos los estudios realizados presentaron resultados satisfactorios (semejantes a los de la Figura 4-7), los cuales fueron reportados posteriormente en términos de *reducción logarítmica de UFC*, calculada con la Ecuación (4-1).

$$\text{Reducción logarítmica de UFC} = \log_{10}(\text{UFC}_{\text{Control}}) - \log_{10}(\text{UFC}_{\text{estudio}}) \quad (4-1)$$

**Figura 4-7** Fotografías del recuento de células viables por la técnica de conteo por placa para el control de crecimiento de a) *C. albicans*, b) *A. brasiliensis* y c) *P. rubens*.



El desarrollo de los análisis se llevó a cabo según las fases mencionadas en la Tabla 4-1 de la metodología.

**Fase 1: Todas las composiciones de CPE al 0,6 % de AB y pH: 6,0**

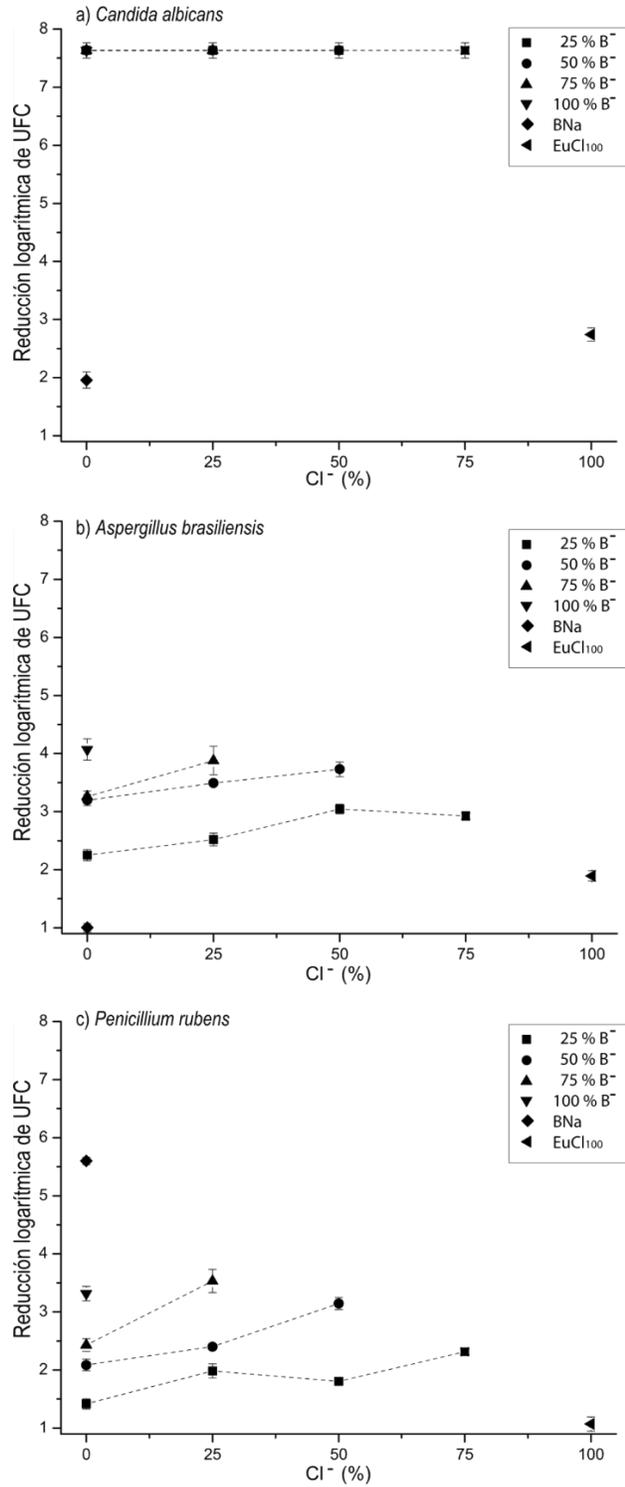
En la Tabla 4-11 se presentan los valores de reducción logarítmica de UFC para los estudios realizados en esta fase, igualmente se incluye la información del método de Tukey aplicado para cada microorganismo, el cual reconoce diferencias estadísticamente significativas entre grupos (identificados con letras). Para la levadura, no se observó crecimiento de UFC en ninguna de las diez composiciones de CPE, por ello todas fueron agrupadas en “A”, mientras que, los resultados de EuCl<sub>100</sub> y BNa pertenecieron a grupos independientes. En cuanto a los hongos filamentosos se registró un mayor número de agrupaciones, por ello para comparar la actividad, entre los diez CPE de EuE y AB, se resaltaron en color verde los que pertenecieron al grupo con mejor desempeño (“A” para *A. brasiliensis* y “B” *P. rubens*) y con rojo los peores (“G y H” para *A. brasiliensis* y “F y G” *P. rubens*), nótese que los resultados corresponden prácticamente a las mismas composiciones y que están en concordancia con las CMI determinadas en la etapa previa (Tabla 4-8).

**Tabla 4-11** Reducción logarítmica de UFC de *C. albicans*, *A. brasiliensis* y *P. rubens* como respuesta a la aplicación de benzoato sodio, EuCl<sub>100</sub> y los diez complejos en dispersión al 0,6% de AB y pH 6,0.

<b>Reducción logarítmica de UFC para</b>			
	<b><i>C. albicans</i></b>	<b><i>A. brasiliensis</i></b>	<b><i>P. rubens</i></b>
<b>EuB<sub>25</sub></b>	7,63 (1,73) [A]	2,25 (4,23) [G,H]	1,42 (6,43) [F,G]
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>25</sub></b>	7,63 (1,73) [A]	2,52 (4,31) [F,G]	1,99 (6,11) [D,E]
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>50</sub></b>	7,63 (1,73) [A]	3,05 (2,77) [D,E]	1,80 (2,01) [E,F]
<b>EuB<sub>25</sub>Cl<sub>75</sub></b>	7,63 (1,73) [A]	2,93 (2,59) [E,F]	2,32 (0,09) [C,D]
<b>EuB<sub>50</sub></b>	7,63 (1,73) [A]	3,20 (2,92) [D,E]	2,09 (4,76) [C,D,E]
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>25</sub></b>	7,63 (1,73) [A]	3,49 (1,10) [B,C,D]	2,40 (1,74) [C,D]
<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub></b>	7,63 (1,73) [A]	3,73 (3,40) [A,B,C]	3,14 (3,33) [B]
<b>EuB<sub>75</sub></b>	7,63 (1,73) [A]	3,26 (2,93) [C,D,E]	2,43 (4,47) [C]
<b>EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub></b>	7,63 (1,73) [A]	3,88 (6,31) [A,B]	3,53 (5,68) [B]
<b>EuB<sub>100</sub></b>	7,63 (1,73) [A]	4,07 (4,49) [A]	3,32 (3,78) [B]
<b>BNa</b>	1,96 (7,20) [C]	1,00 (7,03) [I]	5,60 (1,10) [A]
<b>EuCl<sub>100</sub></b>	2,74 (4,25) [B]	1,89 (4,74) [H]	1,07 (11,40)[G]

Entre paréntesis valores de coeficiente de variación (CV) y entre corchetes la letra asignada según agrupación del método de Tukey con 95 % de confianza, aplicado de modo independiente para cada hongo [X].

**Figura 4-8** Efecto de la composición de los CPE en la reducción logarítmica de UFC de **a)** *C. albicans*, **b)** *A. brasiliensis* y **c)** *P. rubens* para BNa(◆) y los complejos: EuB<sub>25</sub>Cl<sub>x</sub>(■), EuB<sub>50</sub>Cl<sub>x</sub>(●), EuB<sub>75</sub>Cl<sub>x</sub>(▲), EuB<sub>100</sub>(▼) y EuCl<sub>100</sub>(◄) al 0,6% de AB y pH 6,0. En el eje X se presenta el porcentaje de grupos DMAE neutralizado con ácido clorhídrico.



Con el propósito de facilitar el análisis de toda la información contenida en la tabla, se realizó la Figura 4-8. En esta se observa que, a las condiciones de estudio, la actividad de los CPE frente a *Candida albicans* fue independiente de la composición, en cambio, para *Aspergillus brasiliensis* y *Penicillium rubens* se evidencia una relación con el porcentaje de grupos DMAE neutralizado con ácido benzoico, e incluso con ácido clorhídrico. Para las composiciones sin neutralización adicional con HCl, es decir los ubicados en el eje X = 0, se observa que a medida que aumenta la proporción de iones benzoato, también aumenta el valor de la reducción logarítmica de UFC, con diferencias estadísticamente significativas entre sí, excepto para la diferencia entre EuB<sub>50</sub> y EuB<sub>75</sub> según la agrupación de Tukey. Del mismo modo se observa una tendencia de aumento de la actividad antimicótica al incrementar el porcentaje de contraiones cloruro en la composición de los complejos, no obstante, para este caso las diferencias arrojadas por el método de Tukey no se dan para todas las combinaciones.

Respecto al ionómero EuCl<sub>100</sub> se observa presencia de actividad antimicótica frente a los tres microorganismos, la cual fue inferior a la registrada para EuB<sub>25</sub> (pero sin diferencias estadísticamente significativas en los dos hongos filamentosos). Pese a que estos resultados son el primer reporte de efecto antimicótico del polímero Eudragit E100, no es inesperado este hallazgo, puesto que estudios previos han demostrado su capacidad para establecer fuerte interacción con modelos de membrana debido a su carácter anfipático, que involucra una primera aproximación mediada por atracción electrostática entre las cargas catiónicas del polímero y los grupos electronegativos de la superficie de la célula, seguida de un segundo paso en el cual hay una asociación hidrofóbica del PE con las estructuras de la membrana [74–77]. En otros estudios el polímero EuE demostró efecto como potenciador de permeación en células Caco2 [302] y como agente causante de daños en la membrana celular de *Pseudomonas aeruginosa*, fenómeno atribuido a la mitigación de la electronegatividad de la superficie celular en el proceso de desorganización de membrana [119].

Los resultados de benzoato de sodio contaron con diferencias estadísticamente significativas de los demás, ya que en el Tukey de los tres hongos fue agrupado de manera unitaria. BNa presentó la menor actividad frente a *C. albicans* y *A. brasiliensis*, no obstante, con *P. rubens* exhibió la mayor reducción de UFC entre todos los tratamientos estudiados, esto debido a las características propias del hongo; sin embargo, ante la ausencia de

estudios específicos de AB en *Penicillium rubens* se desconoce la causa del resultado atípico, puesto que a pH 6,0 no se esperaría una respuesta de actividad tan alta.

Con la finalidad de evaluar el efecto del pH y de la concentración (en términos de % de AB) se eligieron tres de los complejos (EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub>, EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub> y EuB<sub>100</sub>). La selección se basó en lo siguiente:

- ☞ Fueron los de mayor respuesta antimicótica, de modo que, al someterlos a condiciones menos favorables (como mayor pH o menor concentración) existe una posibilidad más alta de seguir observando actividad antimicótica y que su respuesta sea diferenciable entre sí.
- ☞ Las tres composiciones cuentan con diferente porcentaje de grupos DMAE neutralizados con AB (50, 75 y 100) y con ácido clorhídrico (0, 25 y 50), hecho que permite evaluar la incidencia —o no— de cada componente en la actividad antimicótica de los complejos.

### **Fase 2: Los tres CPE seleccionados de fase 1 al 0,6 % de AB y a diferente pH**

Los valores de pH estudiados en esta fase fueron 6,3, 6,6 y 6,9; no se evaluó ningún pH por encima de este debido a las limitaciones de solubilidad registradas por los complejos en el capítulo anterior (ver Tabla 3-8). Los resultados de reducción logarítmica de UFC se presentan en la Tabla 4-12, en la que también se incluyen los datos a pH 6,0 (de la fase 1) para evaluar el efecto en todo el rango de pH estudiado y para incluirlos en el análisis estadístico por el método de Tukey, que fue aplicado por microorganismo. La información de las agrupaciones por letras permite comparar todos los valores asociados a un hongo y al mismo tiempo permite hacer deducciones por pH, por ejemplo, para *C. albicans* se observa que la respuesta de los tres CPE modelo (EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub>, EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub> y EuB<sub>100</sub>) no contó con diferencias estadísticamente significativas a valores de pH entre 6,0 y 6,6 y a su vez se puede afirmar que a pH 6,0, los resultados de BNa y EuCl<sub>100</sub> son significativamente diferentes puesto que no comparten letras de la agrupación

Para facilitar el análisis de los resultados se realizó la Figura 4-9 con toda la información de la Tabla 4-12. En *C. albicans* se observa que los datos mantuvieron la misma tendencia entre pH 6,0 y 6,6: reducción total de las UFC por parte de los tres complejos y mayor actividad para EuCl<sub>100</sub> que para BNa; a pH 6,9 se observaron cambios estadísticamente

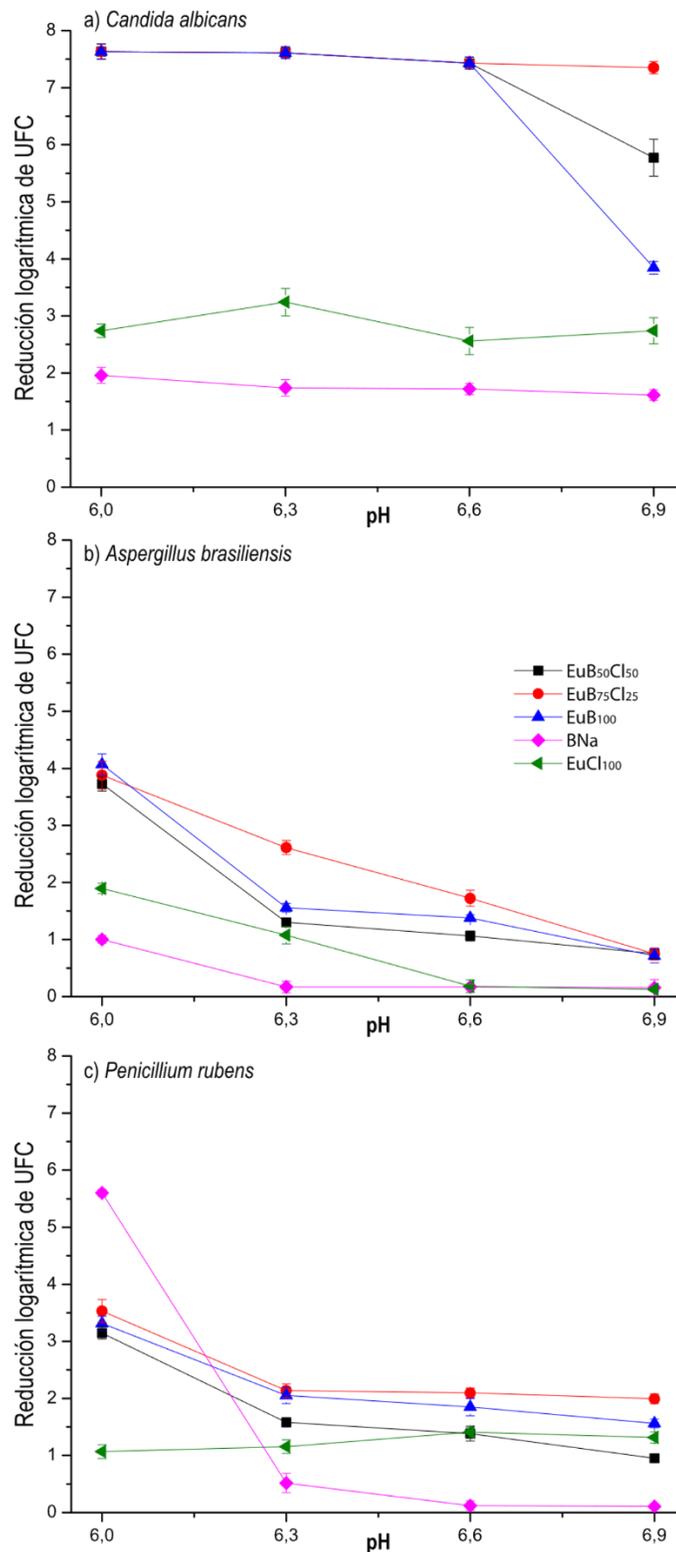
significativos en la actividad de los complejos, indicando un efecto antifúngico de mayor a menor así:  $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25} > \text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50} > \text{EuB}_{100}$ .

**Tabla 4-12** Reducción logarítmica de UFC de *C. albicans*, *A. brasiliensis* y *P. rubens* como respuesta a la aplicación de  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$ ,  $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$ ,  $\text{EuB}_{100}$ ,  $\text{EuCl}_{100}$  y BNa al 0,6% de AB a diferentes condiciones de pH.

		<i>Reducción logarítmica de UFC a pH:</i>			
		<i>6,0</i>	<i>6,3</i>	<i>6,6</i>	<i>6,9</i>
<i>Candida albicans</i>	<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub></b>	7,63 (1,73) [A]	7,61 (1,31) [A]	7,43 (1,43) [A]	5,77 (5,59) [B]
	<b>EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub></b>	7,63 (1,73) [A]	7,61 (1,31) [A]	7,43 (1,43) [A]	7,35 (1,49) [A]
	<b>EuB<sub>100</sub></b>	7,63 (1,73) [A]	7,61 (1,31) [A]	7,43 (1,43) [A]	3,84 (2,85) [C]
	<b>BNa</b>	1,96 (7,20) [F,G]	1,74 (8,28) [G]	1,72 (5,69) [G]	1,61 (5,87) [G]
	<b>EuCl<sub>100</sub></b>	2,74 (4,25) [D,E]	3,24 (7,37) [C,D]	2,56 (9,27) [E,F]	2,74 (8,39) [D,E]
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub></b>	3,73 (3,40) [A]	1,30 (4,58) [D,E,F]	1,06 (8,32) [F,G]	0,76 (12,88) [G]
	<b>EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub></b>	3,88 (6,31) [A]	2,61 (4,77) [B]	1,73 (8,09) [C,D]	0,75 (14,14) [G]
	<b>EuB<sub>100</sub></b>	4,07 (4,49) [A]	1,56 (4,85) [C,D,E]	1,38 (4,44) [D,E,F]	0,71 (16,63) [G]
	<b>BNa</b>	1,00 (7,03) [F,G]	0,17 (60,45) [H]	0,17 (31,02) [H]	0,16 (92,46) [H]
	<b>EuCl<sub>100</sub></b>	1,89 (4,74) [C]	1,08 (14,09) [E,F,G]	0,19 (59,19) [H]	0,12 (30,98) [H]
<i>Penicillium rubens</i>	<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub></b>	3,14 (3,33) [B]	1,58 (3,58) [D,E,F]	1,38 (9,53) [F,G]	0,95 (6,75) [G,H]
	<b>EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub></b>	3,53 (5,68) [B]	2,14 (5,58) [C]	2,10 (4,23) [C]	1,99 (4,30) [C,D]
	<b>EuB<sub>100</sub></b>	3,32 (3,78) [B]	2,05 (6,97) [C]	1,85 (8,06) [C,D,E]	1,56 (4,93) [D,E,F]
	<b>BNa</b>	5,60 (1,10) [A]	0,52 (32,65) [H,I]	0,12 (66,86) [I]	0,11 (36,14) [I]
	<b>EuCl<sub>100</sub></b>	1,07 (11,40) [G]	1,15 (10,31) [G]	1,41 (5,74) [E,F,G]	1,32 (7,45) [F,G]

Entre paréntesis valores de coeficiente de variación (CV) y entre corchetes la letra asignada según agrupación del método de Tukey con 95 % de confianza, aplicado de modo independiente para cada hongo [X].

**Figura 4-9** Efecto del pH en la reducción logarítmica de UFC de a) *C. albicans*, b) *A. brasiliensis* y c) *P. rubens* para  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$  (■),  $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$  (●),  $\text{EuB}_{100}$  (▲),  $\text{EuCl}_{100}$  (◄) y  $\text{BNa}$  (◆) al 0,6% de AB.



En *A. brasiliensis* se observa una tendencia general de disminución de la actividad a medida que aumenta el pH para los cinco tratamientos. Los tres complejos contaron con la mejor respuesta, la cual a pH de 6,0 y 6,9 no detectó diferencias entre composiciones, mientras que, a pH 6,3 y 6,6 se observó actividad en orden decreciente así:  $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25} > \text{EuB}_{100} > \text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$ . Para BNa únicamente se presentó actividad a pH 6,0, de modo semejante para  $\text{EuCl}_{100}$  que solo presentó efecto a pH de 6,0 y 6,3, en las otras condiciones de pH la reducción logarítmica de UFC fue prácticamente nula.

Finalmente, para *P. rubens* se vislumbra una tendencia de disminución de la actividad con el aumento de pH para todos los tratamientos en estudio, excepto para  $\text{EuCl}_{100}$ , el cual se mantuvo estable y no presentó diferencias estadísticamente significativas en todo el rango de pH. El comportamiento de los tres complejos fue similar entre sí: un descenso considerable de pH 6,0 a 6,3 y luego una reducción de actividad más sutil, incluso a pH 6,6 y 6,9 la respuesta se igualó a la registrada por  $\text{EuCl}_{100}$ . La tendencia de actividad de los tres complejos en orden decreciente fue:  $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25} > \text{EuB}_{100} > \text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$  (igual a la presentada en *A. brasiliensis*), donde los dos primeros contaron con diferencias significativas respecto a  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$ , complejo con el menor efecto de los tres. Para BNa se observó que el comportamiento inhibitorio atípico presentado a pH 6,0 no se mantuvo para los valores superiores de pH, ya que su respuesta fue mínima, como se esperaba para el mecanismo de acción del AB.

Llama la atención la relación existente entre la reducción de las UFC generada por  $\text{EuCl}_{100}$  y la de los complejos para los hongos filamentosos, puesto que, en *A. brasiliensis* la respuesta del CPE sin AB fue prácticamente nula a pH 6,6 y pH 6,9 y asimismo la respuesta de los tres complejos modelo fue baja, sin embargo, para *P. rubens* la reducción de las UFC para  $\text{EuCl}_{100}$  contó con un valor considerable y a su vez la de los complejos; demostrando que parte de la actividad de los complejos es debida a la interacción del PE con los microorganismos.

### **Fase 3: Los tres CPE seleccionados de fase 1 a pH 6,9 y a diferente porcentaje de AB**

Para la fase final de los estudios de reducción logarítmica de UFC se evaluó el efecto de la concentración de ácido benzoico, para ello se eligieron las concentraciones de: 0,075, 0,150 y 0,300 % de AB y se fijó el pH en 6,9 con el objetivo de estudiar el comportamiento

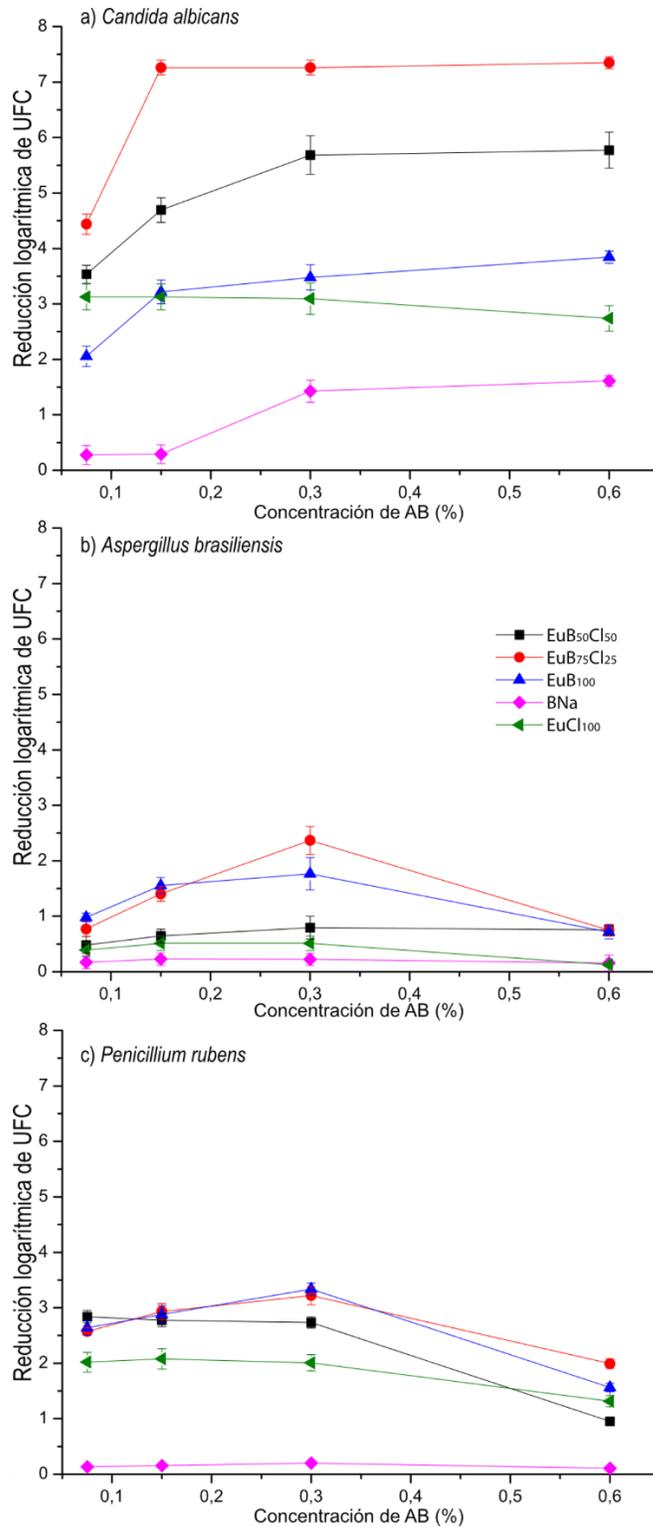
de los complejos a condiciones de menor favorabilidad para la molécula preservante. Al igual que en las fases anteriores los resultados se presentan tabulados y a modo de gráfica (ver Tabla 4-13 y Figura 4-10), en los que se incluyeron los datos a pH 6,9 y al 0,600% de AB de la fase 2.

**Tabla 4-13** Reducción logarítmica de UFC de *C. albicans*, *A. brasiliensis* y *P. rubens* como respuesta a la aplicación de EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub>, EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub>, EuB<sub>100</sub>, EuCl<sub>100</sub> y BNa a pH 6,9 en diferentes concentraciones de AB.

		<b>Reducción logarítmica de UFC a % de AB:</b>			
		<b>0,075</b>	<b>0,150</b>	<b>0,300</b>	<b>0,600</b>
<b><i>Candida albicans</i></b>	<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub></b>	3,53 (4,65) [E,F]	4,69 (4,73) [C]	5,68 (6,10) [B]	5,77 (5,59) [B]
	<b>EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub></b>	4,44 (4,12) [C,D]	7,26 (1,84) [A]	7,26 (1,84) [A]	7,35 (1,49) [A]
	<b>EuB<sub>100</sub></b>	2,06 (8,99) [G,H]	3,22 (6,67) [E,F]	3,48 (6,55) [E,F]	3,84 (2,85) [D,E]
	<b>BNa</b>	0,28 (62,17) [I]	0,29 (57,91) [I]	1,43 (13,99) [H]	1,61 (5,87) [H]
	<b>EuCl<sub>100</sub></b>	3,13 (7,43) [E,F]	3,13 (7,43) [E,F]	3,09 (9,05) [F,G]	2,74 (8,39) [F,G]
<b><i>Aspergillus brasiliensis</i></b>	<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub></b>	0,48 (31,37) [D,E,F,G,H]	0,64 (18,92) [D,E,F,G,H]	0,80 (25,90) [D,E]	0,76 (12,88) [D,E,F]
	<b>EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub></b>	0,77 (17,46) [D,E]	1,41 (9,55) [B,C]	2,37 (10,56) [A]	0,75 (14,14) [D,E,F,G]
	<b>EuB<sub>100</sub></b>	0,98 (7,63) [C,D]	1,55 (9,35) [B,C]	1,76 (16,49) [B]	0,71 (16,63) [D,E,F,G,H]
	<b>BNa</b>	0,17 (68,39) [F,G,H]	0,23 (49,30) [E,F,G,H]	0,22 (48,02) [E,F,G,H]	0,16 (92,46) [G,H]
	<b>EuCl<sub>100</sub></b>	0,39 (32,81) [D,E,F,G,H]	0,51 (25,45) [D,E,F,G,H]	0,51 (25,45) [D,E,F,G,H]	0,12 (30,98) [H]
<b><i>Penicillium rubens</i></b>	<b>EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub></b>	2,84 (3,89) [B,C]	2,78 (4,23) [B,C]	2,73 (3,74) [C]	0,95 (6,75) [G]
	<b>EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub></b>	2,57 (2,49) [C]	2,93 (4,98) [A,B,C]	3,22 (5,10) [A,B]	1,99 (4,30) [D,E]
	<b>EuB<sub>100</sub></b>	2,64 (3,21) [C]	2,88 (5,37) [B,C]	3,34 (3,21) [A]	1,56 (4,93) [E,F]
	<b>BNa</b>	0,13 (5,10) [H]	0,16 (17,00) [H]	0,20 (18,57) [H]	0,11 (36,14) [H]
	<b>EuCl<sub>100</sub></b>	2,02 (8,71) [D]	2,08 (8,85) [D]	2,01 (7,33) [D,E]	1,32 (7,45) [F,G]

Entre paréntesis valores de coeficiente de variación (CV) y entre corchetes la letra asignada según agrupación del método de Tukey con 95 % de confianza, aplicado de modo independiente para cada hongo [X].

**Figura 4-10** Efecto de la concentración de AB en la reducción logarítmica de UFC de **a) *C. albicans***, **b) *A. brasiliensis*** y **c) *P. rubens*** para  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$  (■),  $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$  (●),  $\text{EuB}_{100}$  (▲),  $\text{EuCl}_{100}$  (◄) y BNa (◆) a pH 6,9.



Al preparar las dispersiones, a las tres concentraciones de estudio, se observó la presencia de una incompatibilidad con el medio de cultivo manifiesta en precipitación de una parte del complejo, llama la atención que el fenómeno mencionado no ocurrió al valor de mayor concentración (0,600 % de AB) hecho que sugiere un posible efecto de salting in. No obstante, se decidió continuar con el estudio para determinar el efecto, tanto de la incompatibilidad como de la concentración de AB, en el crecimiento de los microorganismos.

Para la levadura los resultados arrojaron una tendencia lógica: a mayor concentración de AB, mayor actividad y mantuvieron la jerarquía presentada en la Fase 2:  $EuB_{75}Cl_{25} > EuB_{50}Cl_{50} > EuB_{100} > BNa$ , orden que no denotó ningún efecto relacionado con la composición de los complejos: ni con el porcentaje de grupos DMAE neutralizado con AB, ni con el neutralizado con HCl y mucho menos con la concentración del PE (ver Tabla 4-9); en todo caso la reducción de las UFC fue considerable, ya que el dato más bajo fue de 2,06. En cuanto a  $EuCl_{100}$  se observó que su efecto fue independiente de la concentración, de modo que no contó con diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro valores de concentración estudiados: a 0,075 % de AB presentó una respuesta similar a  $EuB_{50}Cl_{50}$ , mientras que, a 0,150 y 0,300 % de AB la respuesta se asemejó a  $EuB_{100}$ .

Los resultados de los CPE frente a los hongos filamentosos fueron inesperados, puesto que no hubo una relación directa entre concentración y actividad en todos los casos. Para *A. brasiliensis* tal fenómeno tuvo lugar para los complejos  $EuB_{75}Cl_{25}$  y  $EuB_{100}$  a 0,150 y 0,300 % de AB en los que se observó un aumento significativo de la actividad, mientras que, los tratamientos restantes demostraron (según los grupos de Tukey) la inexistencia de diferencias significativas en todo el rango de concentraciones. En *P. rubens* el comportamiento anómalo fue mucho más dramático, ya que todos los CPE (incluso  $EuCl_{100}$ ) mostraron un incremento en la respuesta antimicótica a los valores más bajos de concentración, sin embargo, no se presentó una jerarquización definida entre los tres complejos de interés ya que los resultados fueron variables entre una y otra concentración, aunque los resultados de  $EuB_{50}Cl_{50}$  fueron ligeramente más bajos.

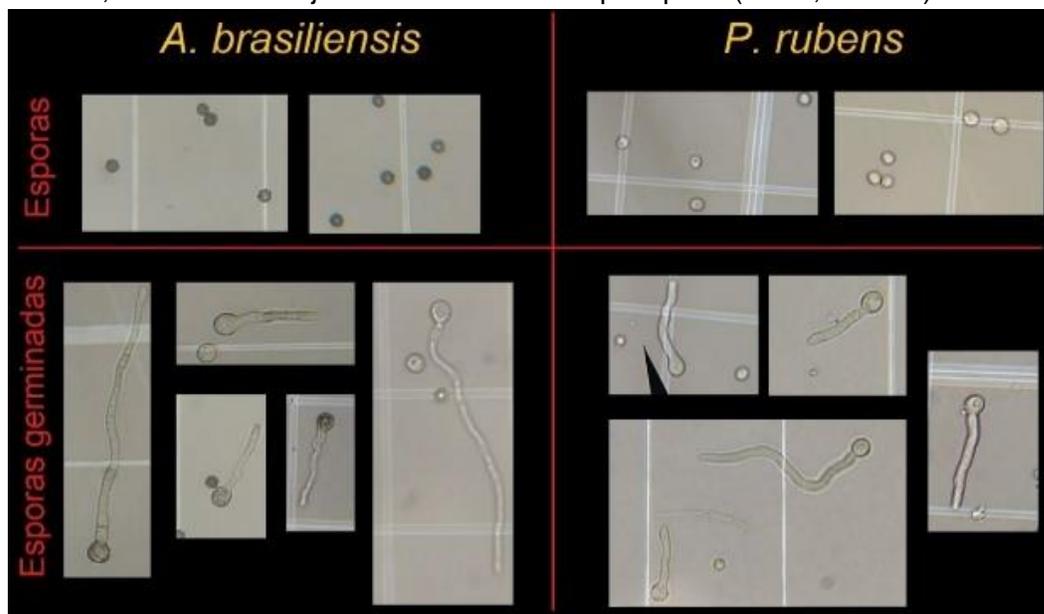
El comportamiento anómalo entre concentración y actividad en los hongos filamentosos fue atribuido a la incompatibilidad observada para las concentraciones de: 0,075, 0,150 y 0,300 % de AB, ya que el precipitado generó una capa adhesiva en el fondo del recipiente, la cual interfirió con el proceso de desarrollo de las esporas, posiblemente debida a la

inmovilización de las mismas, de modo que la reducción de las UFC correspondió a un falso positivo y por ello se observaron valores de mayor inhibición que los generados por la concentración de 0,600 % de AB.

#### iv. Germinación de esporas.

La metodología propuesta para el estudio en germinación de esporas fue aplicada únicamente para las sustancias evaluadas en las fases 2 y 3 de la sección anterior, esto con el fin de correlacionar los resultados de reducción de UFC a diferente pH y concentración con los de inhibición de germinación. La metodología fue llevada a cabo sin contratiempos, en la Figura 4-11 se presentan, a modo de ejemplo, algunas fotografías en las que se diferencia el aspecto de las esporas que no desarrollaron proceso germinativo con las que sí. Los resultados, expresados como porcentaje de inhibición de germinación de esporas, para todas las condiciones de concentración y pH evaluadas, se resumen en la Tabla 4-14, donde además se incluye la información de los cuatro análisis de Tukey aplicados (uno por cada hongo a cada valor de pH). Para el análisis de la tendencia de los datos se realizó la Figura 4-12, en la que se presentan los valores de inhibición para las cinco sustancias, en cuatro gráficas discriminadas por microorganismo y pH.

**Figura 4-11** Fotografías de las esporas de *A. brasiliensis* y *P. rubens*, con y sin proceso germinativo, tomadas en objetivo 40x de microscopio óptico (Leica, DM500).

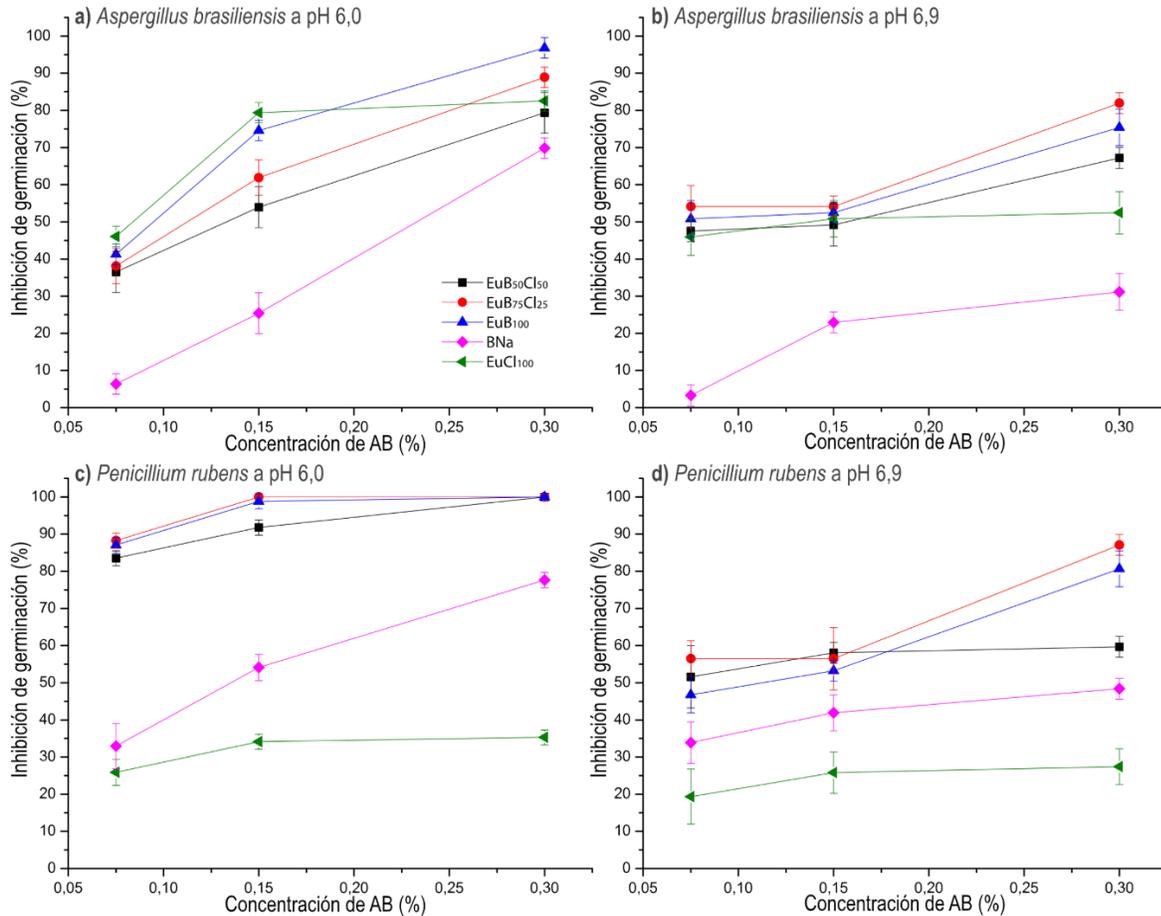


**Tabla 4-14** Inhibición de la germinación de esporas de *A. brasiliensis* y *P. rubens* como respuesta a la aplicación de EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub>, EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub>, EuB<sub>100</sub>, EuCl<sub>100</sub> y BNa a pH 6,0 y pH 6,9 en diferentes concentraciones de AB.

		% Inhibición de germinación de esporas a:			
		0,075 % AB	0,150 % AB	0,300 % AB	
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	pH 6,0	EuB <sub>50</sub> Cl <sub>50</sub>	36,51 (15,06) [H,I]	53,97 (10,19) [F,G]	79,37 (6,93) [B,C,D]
		EuB <sub>75</sub> Cl <sub>25</sub>	38,10 (12,50) [H]	61,90 (7,69) [E,F]	88,89 (3,09) [A,B]
		EuB <sub>100</sub>	41,27 (6,66) [H]	74,60 (3,69) [C,D]	96,83 (2,84) [A]
		BNa	6,35 (43,30) [J]	25,40 (21,65) [I]	69,84 (3,94) [D,E]
		EuCl <sub>100</sub>	46,03 (5,97) [G,H]	79,37 (3,46) [B,C,D]	82,54 (3,33) [B,C]
	pH 6,9	EuB <sub>50</sub> Cl <sub>50</sub>	47,54 (5,97) [C]	49,18 (11,55) [C]	67,21 (4,22) [B]
		EuB <sub>75</sub> Cl <sub>25</sub>	54,10 (10,50) [C]	54,10 (5,25) [C]	81,97 (3,46) [A]
		EuB <sub>100</sub>	50,82 (9,68) [C]	52,46 (5,41) [C]	75,41 (6,52) [AB]
		BNa	3,28 (86,60) [E]	22,95 (12,37) [D]	31,15 (15,79) [D]
		EuCl <sub>100</sub>	45,90 (10,71) [C]	50,82 (9,68) [C]	52,46 (10,83) [C]
<i>Penicillium rubens</i>	pH 6,0	EuB <sub>50</sub> Cl <sub>50</sub>	83,53 (2,44) [D,E]	91,76 (2,22) [B,C]	100,00 (0,00) [A]
		EuB <sub>75</sub> Cl <sub>25</sub>	88,24 (2,31) [C,D]	100,00 (0,00) [A]	100,00 (0,00) [A]
		EuB <sub>100</sub>	87,06 (2,34) [C,D]	98,82 (2,06) [A,B]	100,00 (0,00) [A]
		BNa	32,94 (18,56) [G,H]	54,12 (6,52) [F]	77,65 (2,62) [E]
		EuCl <sub>100</sub>	25,88 (13,64) [H]	34,12 (5,97) [G]	35,29 (5,77) [G]
	pH 6,9	EuB <sub>50</sub> Cl <sub>50</sub>	51,61 (16,24) [B,C]	58,06 (4,81) [B]	59,68 (4,68) [B]
		EuB <sub>75</sub> Cl <sub>25</sub>	56,45 (8,57) [B,C]	56,45 (14,85) [B,C]	87,10 (3,21) [A]
		EuB <sub>100</sub>	46,77 (10,34) [B,C,D]	53,23 (5,25) [B,C]	80,65 (6,00) [A]
		BNa	33,87 (16,50) [D,E,F]	41,94 (11,54) [C,D,E]	48,39 (5,77) [B,C,D]
		EuCl <sub>100</sub>	19,35 (38,19) [F]	25,81 (21,65) [F]	27,42 (17,65) [E,F]

Entre paréntesis valores de coeficiente de variación (CV) y entre corchetes la letra asignada según agrupación del método de Tukey con 95 % de confianza, aplicado de modo independiente por hongo a cada pH [X].

**Figura 4-12** Efecto de la concentración de AB en la inhibición de la germinación de esporas de *A. brasiliensis* y *P. rubens* para EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub>(■), EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub>(●), EuB<sub>100</sub>(▲), EuCl<sub>100</sub>(◄) y BNa(◆) a pH 6,0 y 6,9.



La tendencia general de la figura evidencia reducción del efecto inhibitorio al disminuir la concentración de AB y al aumentar el pH. Como elemento común, se observa que los resultados de benzoato de sodio, en las 4 gráficas de la figura, fueron inferiores a los asociados a los tres complejos entre EuE y AB, de hecho, en las agrupaciones de Tukey prácticamente ninguno de los datos de BNa compartió letra de agrupación con alguno de los datos de los CPE mencionados, indicando que las diferencias fueron estadísticamente significativas. De modo semejante, se observa que EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub> tiende a presentar una menor respuesta inhibitoria que los otros dos complejos, sin embargo, para este caso no se detectan diferencias estadísticamente significativas respecto a EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub> y EuB<sub>100</sub>, excepto para dos de los datos (*P. rubens*, pH 6,0 a 0,150 % de AB y en *P. rubens*, pH 6,9 a 0,300 % de AB) en los que la actividad sí fue significativamente inferior. Para EuCl<sub>100</sub> se observa

que el efecto dependió del microorganismo en estudio: frente a *A. brasiliensis* la respuesta fue similar a la generada por los demás complejos, en cambio frente a *P. rubens* fue mucho menor, incluso por debajo de la inhibición de benzoato de sodio; hecho que llama la atención porque en los estudios de reducción de UFC a diferente concentración de AB y pH 6,9 (Ver Figura 4-10) el ionómero  $\text{EuCl}_{100}$  contó con mayor actividad antifúngica frente a *P. rubens* que frente a *A. brasiliensis*, sugiriendo que para *Penicillium rubens* el efecto inhibitorio de  $\text{EuCl}_{100}$  es ejercido en una etapa posterior a la germinación, como en el desarrollo del micelio.

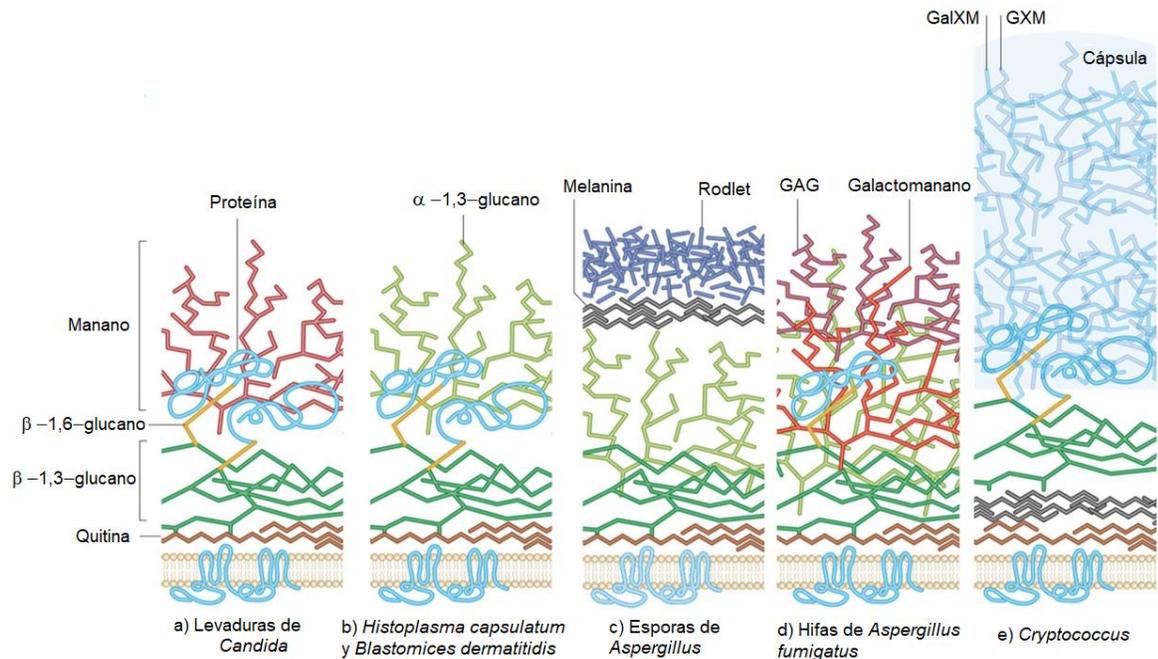
Los resultados de los CPE a pH 6,9 presentaron un comportamiento parecido en los dos hongos (excepto para  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$  al 0,300 % de AB), mientras que, a pH 6,0 evidenciaron diferencias entre los microorganismos: siendo *P. rubens* más sensible a los complejos que *A. brasiliensis*, ya que el valor del porcentaje de inhibición del primero estuvo entre 83 y 100% y del segundo entre 36 y 96%. Estos resultados están en línea con las CMI determinadas en los estudios de dilución en caldo y con los de reducción de UFC a diferente pH y diferente concentración.

Para entender las diferencias generales encontradas entre microorganismos, se decidió realizar un análisis focalizado en la pared celular de los hongos, sin desconocer la existencia de procesos metabólicos al interior de la célula que contribuyen a la actividad antimicótica de AB, como el reportado por Hunter y Segel para *Penicillium chrysogenum* en el que se descubrió su capacidad para inhibir la captación de aminoácidos [303].

La pared celular es mucho más que la capa más externa de los hongos, es un organelo dinámico cuya composición afecta, en gran medida, el funcionamiento de la célula; muchos de los componentes principales de la pared son conservados en diferentes familias de hongos, mientras que otros son específicos de cada especie [304]; por ello llama la atención que los resultados observados para la levadura presentaron diferencias considerables con los reportados para los hongos filamentosos, que entre sí contaron con resultados relativamente semejantes, fenómeno que podría relacionarse con las diferencias de composición de la pared atribuidas a la taxonomía de los hongos, ya que *C. albicans* pertenece a la clase *Saccharomycetes*, mientras que *A. brasiliensis* y *P. rubens* a *Eurotiomycetes* [305]. La pared celular de la mayoría de las especies de hongos consta de una base de  $\beta$ -(1,3) glucano y quitina, a la que se suman otros polímeros como glicoproteínas que dependen del microorganismo [306]; por ejemplo, *C. albicans* cuenta con

una capa externa de proteínas altamente manosiladas que se unen a la base de glucano-quitina mediante remanentes tipo glicosilfosfatidilinositol, mientras que la pared celular de esporas y de hifas aéreas de hongos filamentosos cuentan con proteínas altamente hidrofóbicas que protegen la célula. Para ilustrar las diferencias de pared celular se incluye la Figura 4-13 en la que se representan los componentes principales para cinco hongos patógenos diferentes.

**Figura 4-13.** Organización estructural de la pared celular de algunos hongos patógenos.



Fuente: Adaptado de Gow N y col [304].

En la representación de la pared celular de la levadura se observa que es una de las que cuenta con menor cantidad de capas poliméricas, este hecho se relaciona con los resultados de los estudios de reducción de las UFC ya que fue precisamente *C. albicans* la que exhibió mejor respuesta antimicótica, demostrando que, a menor grosor de la pared celular, mayor actividad antimicótica, incluso en este microorganismo fue en el único en el que se reportó un efecto fungicida.

Para los hongos *A. brasiliensis* y *P. rubens* no existen estudios tan específicos —como los de *C. albicans*— de la composición de la pared celular, en parte debido a la reclasificación taxonómica de ambos y además porque los reportes hallados hacen alusión a la estructura

química de los elementos monoméricos de la pared y no de los polímeros [307–309]. Sin embargo, es posible suponer que la pared celular de *P. rubens* cuenta con un mayor porcentaje de glicoproteínas en su capa externa ya que los enlaces fosfodiéster asociados, le confieren carga negativa adicional a la superficie de la célula del hongo [310]. Esto juega un papel fundamental en el efecto del polímero EuE sobre los hongos y aún más, si se tiene en cuenta que este PE actúa como agente antimicrobiano policatiónico y como tal su modo de acción consiste en adsorción sobre la superficie de la célula, difusión a través de la pared e interacción con la membrana citoplasmática [311], fenómeno que se reflejó en la presencia de actividad en el ionómero  $\text{EuCl}_{100}$  y al posible efecto de sinergia evidenciado en la respuesta de algunos de los complejos, superior al presentado por benzoato de sodio, a las mismas condiciones de estudio.

### 4.3 Conclusiones

Para la determinación de las propiedades antimicóticas en el presente estudio, se encontró que:

- ☞ Las dispersiones acuosas de todos los CPE (al 0,5% de AB) exhibieron actividad antimicótica, frente a los microorganismos *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis* y *Penicillium rubens*, al utilizar la metodología de difusión en agar. La respuesta dependió del pH de cada dispersión, siendo de mayor proporción para los sistemas con más acidez debido al mecanismo de acción de AB.
- ☞ Para comparar las actividades antimicóticas de las diferentes composiciones de CPE, obtenidas entre EuE y AB, es indispensable realizar los estudios a la misma condición de pH.
- ☞ La esterilización por calor húmedo de las dispersiones de los CPE no altera su efecto antimicótico, por ello es posible realizar el ajuste de pH previo a este proceso.
- ☞ El efecto de los CPE es de tipo fungistático para los hongos filamentosos y fungicida para la levadura.
- ☞ La determinación de CMI frente a los tres hongos, por dilución en caldo a pH 6,0, evidenció que la respuesta frente a la levadura es indiferente a la composición del

CPE, mientras que, para los hongos filamentosos, a mayor porcentaje del contraíón benzoato y cloruro, mayor fue la actividad.

- ☞ Los estudios de crecimiento en caldo, con recuento de UFC viables en el tiempo final de incubación, permitieron obtener información más discriminada para cada uno de los CPE que los de CMI. Los resultados a pH 6,0 demostraron nuevamente, la independencia de la respuesta en *C. albicans*, dado que todas las composiciones presentaron la reducción total del número de células, mientras que, para los hongos filamentosos la reducción logarítmica de las UFC osciló entre 1,4 y 4,0, dependiendo directamente del porcentaje de grupos DMAE neutralizados con AB y con HCl, siendo los complejos  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$ ,  $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$  y  $\text{EuB}_{100}$  los más promisorios.
- ☞ Al realizar la evaluación de actividad para el ionómero  $\text{EuCl}_{100}$ , empleando la metodología de recuento de UFC viables la respuesta fue —para la mayoría de los casos— menor a la exhibida por los CPE, pero superior a la de benzoato de sodio. Resultado de gran interés ya que no existen reportes previos del efecto antimicótico para EuE.
- ☞ La evaluación del efecto de pH y concentración, en los estudios de recuento de UFC viables, para los complejos promisorios ( $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$ ,  $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$  y  $\text{EuB}_{100}$ ), evidenció la disminución de la actividad con el aumento de pH para los tres hongos, manteniendo, en términos generales, la jerarquía:  $\text{CPE} > \text{EuCl}_{100} > \text{BNa}$ , la cual se conservó al reducir la concentración de AB. También se encontró que la actividad de los CPE —de mayor a menor— fue: *C. albicans* > *P. Rubens* > *A. brasiliensis*.
- ☞ Los ensayos de inhibición de la germinación de esporas de los hongos filamentosos, realizados en los tres CPE promisorios, BNa y  $\text{EuCl}_{100}$  a pH 6,0 y 6,9., demostraron que los complejos son superiores en actividad al BNa. Para  $\text{EuCl}_{100}$  los resultados dependen del hongo: en *A. brasiliensis* son comparables con los resultados de los CPE, mientras que, en *P. Rubens* son inclusive menores que los de BNa. Aunque no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre los complejos evaluados,  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$  presentó un efecto de inhibición ligeramente menor.

- 
- ☞ Las diferencias en actividad de los CPE, presentadas entre los tres microorganismos pueden ser atribuidas a las variaciones en las estructuras poliméricas de la pared celular de cada hongo.



## 5 Correlación entre propiedades fisicoquímicas y actividad antimicótica.

En el proceso de investigación de agentes antimicrobianos es una práctica común la evaluación de posibles asociaciones entre propiedades fisicoquímicas y actividad, esto con el fin de orientar su desarrollo de modo racional y reconocer las variables que desempeñan un papel crítico en el mecanismo de acción. En la Tabla 5-1 se presentan, a modo de ejemplo, algunos estudios al respecto.

**Tabla 5-1** Estudios en los que relacionan propiedades fisicoquímicas con actividad antimicrobiana.

<b>Autores</b>	<b>Año</b>	<b>Agente Estudiado</b>	<b>Variable FQ<sup>1</sup></b>	<b>Variable actividad</b>	<b>Método para evaluar la asociación</b>
Arnoldi A. y col [312].	1990	Isoflavonoides fitoalexinas	Coefficiente de reparto	Inhibición de crecimiento radial	Gráfica de actividad vs Log P <sub>o/w</sub>
Hsiao C-H y col [313].	1999	17 ácidos orgánicos	- Grupos polares - Número de dobles enlaces - Tamaño molecular - Solubilidad	CMI	Regresión de mínimos cuadrados parciales y análisis del coeficiente de determinación (R <sup>2</sup> )
Fitzgerald D. y col [314].	2005	6 análogos estructurales de la vainillina	Coefficiente de reparto	CMI	Gráfica de actividad vs Log P <sub>o/w</sub> y regresión lineal con análisis de R <sup>2</sup>
Musiol R. y col [3].	2006	Derivados de la quinolina	Lipofilicidad (Log K)	CMI <sub>80</sub>	Gráfica de actividad vs lipofilicidad.
Yien L. y col [315]	2012	Nanopartículas de quitosano	- Tamaño de partícula - Potencial Zeta	CMI <sub>90</sub>	Análisis comparativo de los datos organizados en una tabla.
Pasquet J y col [316].	2013	Partículas de óxido de zinc	- Tamaño del cristal - Área específica - Tamaño de poro - Distribución de tamaño de partícula. ¿	CMI	Gráficas de la actividad vs cada propiedad FQ.

<sup>1</sup> FQ: *Fisicoquímica*.

De la tabla se observa que la CMI es el factor, por excelencia, empleado para representar la variable de efecto antimicrobiano; asimismo que las herramientas utilizadas para la identificación de posibles correlaciones son bastante amplias e incluyen: el análisis básico de los datos consignados en tablas, la elaboración de gráficas del tipo: “*Actividad vs propiedades fisicoquímicas*” y el análisis por regresión lineal e interpretación de los coeficientes de correlación o de determinación.

Para determinar la existencia de asociación lineal entre dos variables cuantitativas existen varios métodos, entre los cuales el análisis de correlación de Pearson es uno de los más utilizados; este se realiza mediante la obtención del “Coeficiente de Correlación de Pearson” ( $r_{XY}$ ) calculado con la Ecuación 5-1, en donde  $S_X$  y  $S_Y$  corresponden a la desviación estándar de las variables X y Y, respectivamente, y  $S_{XY}$  a la covarianza entre X y Y [317].

$$\text{Coeficiente de correlación de Pearson} = r_{XY} = \frac{S_{XY}}{S_X S_Y} \quad (5-1)$$

El  $r_{XY}$  solo toma valores comprendidos entre -1 y 1: vale 0 cuando no existe una relación lineal entre X y Y; y corresponde a  $\pm 1$  cuando la variable es una transformación lineal de la otra, es decir que en cuanto el valor absoluto del coeficiente es mayor, la relación lineal entre las dos variables es más fuerte. El signo positivo refleja una “relación directa” ya que valores mayores de la variable X tienden a corresponder, a valores mayores de la variable Y, en consecuencia, el signo negativo indica una “relación inversa” ya que menores valores de la variable X corresponden a mayores de la variable Y. Debe tenerse en cuenta que el coeficiente de correlación de Pearson solo detecta relaciones lineales entre dos variables y no de tipo curvilíneo, como: cuadrático, exponencial o potencial; por lo anterior un valor de 0 no excluye la posibilidad de que las variables tengan otras relaciones entre sí, por ello es importante la inspección de la representación gráfica de la dispersión de datos [317]. Cabe mencionar, que no existe un consenso sobre la escala para categorizar los valores intermedios de  $r_{XY}$  y por tanto la interpretación es relativa al tipo de datos analizados y a los resultados usuales reportados por investigaciones semejantes.

Por otra parte, es fundamental diferenciar correlación de causalidad, ya que la asociación lineal entre dos variables cuantitativas no implica una relación tipo causa-efecto de las

mismas, por tanto, la interpretación de los resultados deber ser suficientemente cuidadosa para evitar falsas conclusiones.

## 5.1 Metodología

La correlación entre propiedades fisicoquímicas y actividad antimicótica de los CPE se realizó en dos etapas:

### i. Selección de las variables

Consistió en la revisión de los resultados de los Capítulos 3 y 4 del documento, posterior elección de la variable de actividad antimicótica y la escogencia de las variables fisicoquímicas que tengan a lugar, considerando las condiciones a las que se llevó a cabo el estudio antimicrobiano seleccionado.

### ii. Determinación de las correlaciones

Se realizó mediante la representación gráfica de las variables elegidas (actividad antimicótica en función de cada propiedad fisicoquímica), seguido de la regresión lineal, obtención de la ecuación de la recta y coeficiente de correlación de Pearson ( $r_{xy}$ ). Para los casos en los que la correlación fue alta, se incluyó la recta de la regresión en la gráfica.

## 5.2 Presentación y discusión de los resultados

### i. Selección de las variables

**Variable de actividad antimicótica.** Se eligió el factor de reducción logarítmico de UFC, a pH 6,0 y a 0,6 % de AB, en vista de la disponibilidad de información para las diez composiciones de CPE (ver Tabla 4-11). No se consideró adecuado utilizar CMI, ya que los resultados fueron poco variables entre sí debido a las diluciones dobles seriadas (ver Tabla 4-8). Tampoco se creyó apropiado realizar las correlaciones con los resultados de difusión en agar (halos de inhibición), ya que ese estudio se hizo sin ajuste de pH y por tanto sería erróneo adjudicar las diferencias de respuesta a las propiedades fisicoquímicas del sistema, teniendo en cuenta la importancia del pH en el mecanismo de acción del ácido benzoico.

Para una segunda fase de estudios de correlación, aplicado únicamente a los tres complejos:  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$ ,  $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$  y  $\text{EuB}_{100}$ , se utilizó el factor de reducción logarítmico de UFC al 0,6 % de AB y a pH 6,9 (Tabla 4-12) y el porcentaje de inhibición de la germinación de esporas al 0,3 % de AB a los valores de pH de 6,0 y 6,9 (Tabla 4-14).

**Variables fisicoquímicas.** De las evaluadas en el Capítulo 3 se eligieron aquellas que correspondieran a resultados cuantitativos, así:

- ☞ Temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) para DSC (Tabla 3-3).
- ☞ Cantidad máxima aceptada en agua (expresada como % de AB) para solubilidad (Tabla 3-9).
- ☞  $\text{Log } K_{cc}$ , para la distribución de especies y constante de afinidad (Tabla 3-11).
- ☞  $\Delta \text{pH}$ , para el desplazamiento de AB por intercambio iónico (Tabla 3-12).
- ☞ Pseudo-potencial zeta ( $\text{p-}\zeta$ ), para la evaluación de la carga de superficie (Tabla 3-15).
- ☞ Porcentaje de AB liberado en el punto final y constante de liberación de Higuchi ( $K_H$ ), para el comportamiento de liberación, a las condiciones en las que se llevó a cabo el estudio de actividad: 0,6% de AB y pH 6,0 (Tabla 3-25 y Tabla 3-26). Para una segunda fase de estudios de correlación, aplicado únicamente a los tres complejos:  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$ ,  $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$  y  $\text{EuB}_{100}$ , se empleó la información de % de AB liberado y  $K_H$  a 0,6% de AB y pH 6,9 (Figura 3-35 y Tabla 3-27).

Para las correlaciones con  $\text{p-}\zeta$  no fue posible utilizar la misma condición de concentración que en el estudio de actividad, ya que superaba los valores recomendados para el equipo empleado, por ello se realizaron al 0,06% de AB con el fin de observar la tendencia de los resultados a una misma concentración del preservante.

## ii. Determinación de las correlaciones

Los resultados se presentan en 3 secciones (A, B y C) en función de las variables analizadas y los CPE empleados.

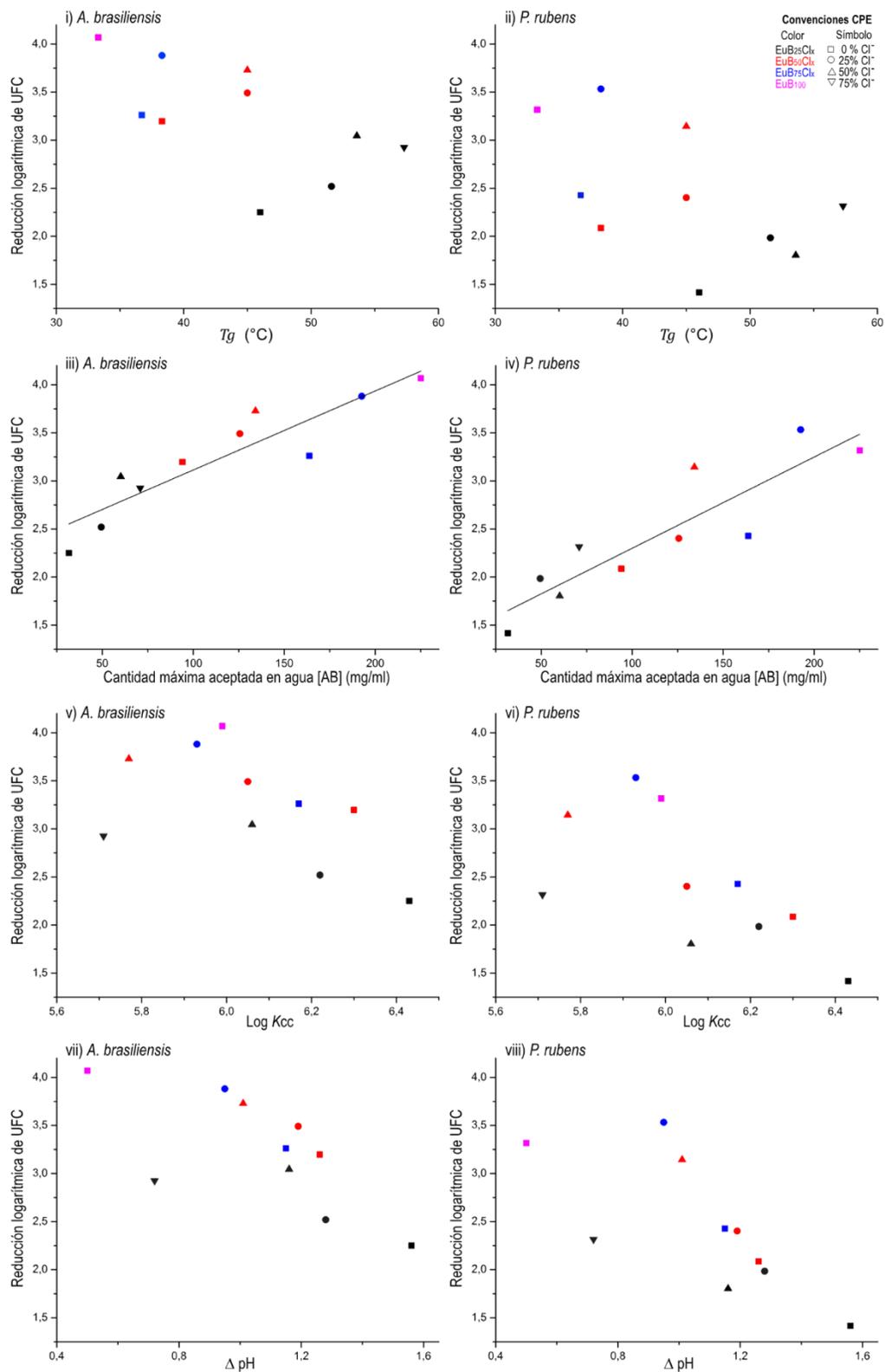
**SECCIÓN A.**

Corresponde a las correlaciones de *reducción logarítmica de UFC* (a pH 6,0 y 0,6 % de AB) frente a las siete variables fisicoquímicas de los diez CPE. No se realizó para el microorganismo *C. albicans* ya que todas las composiciones arrojaron el mismo resultado (Tabla 4-11), de modo que para la levadura se encontró que, a las condiciones de estudio, los resultados de actividad eran independientes de la composición. En la Figura 5-1 se presentan las gráficas con las correlaciones mencionadas, en estas se identificó cada complejo mediante color y tipo de símbolo. El análisis de la regresión lineal y la información de coeficiente de correlación de Pearson para cada gráfica se incluye en la Tabla 5-2, asimismo el concepto de la correlación, que fue dado utilizando una de las escalas propuestas por Martínez R y col [318], que indica:

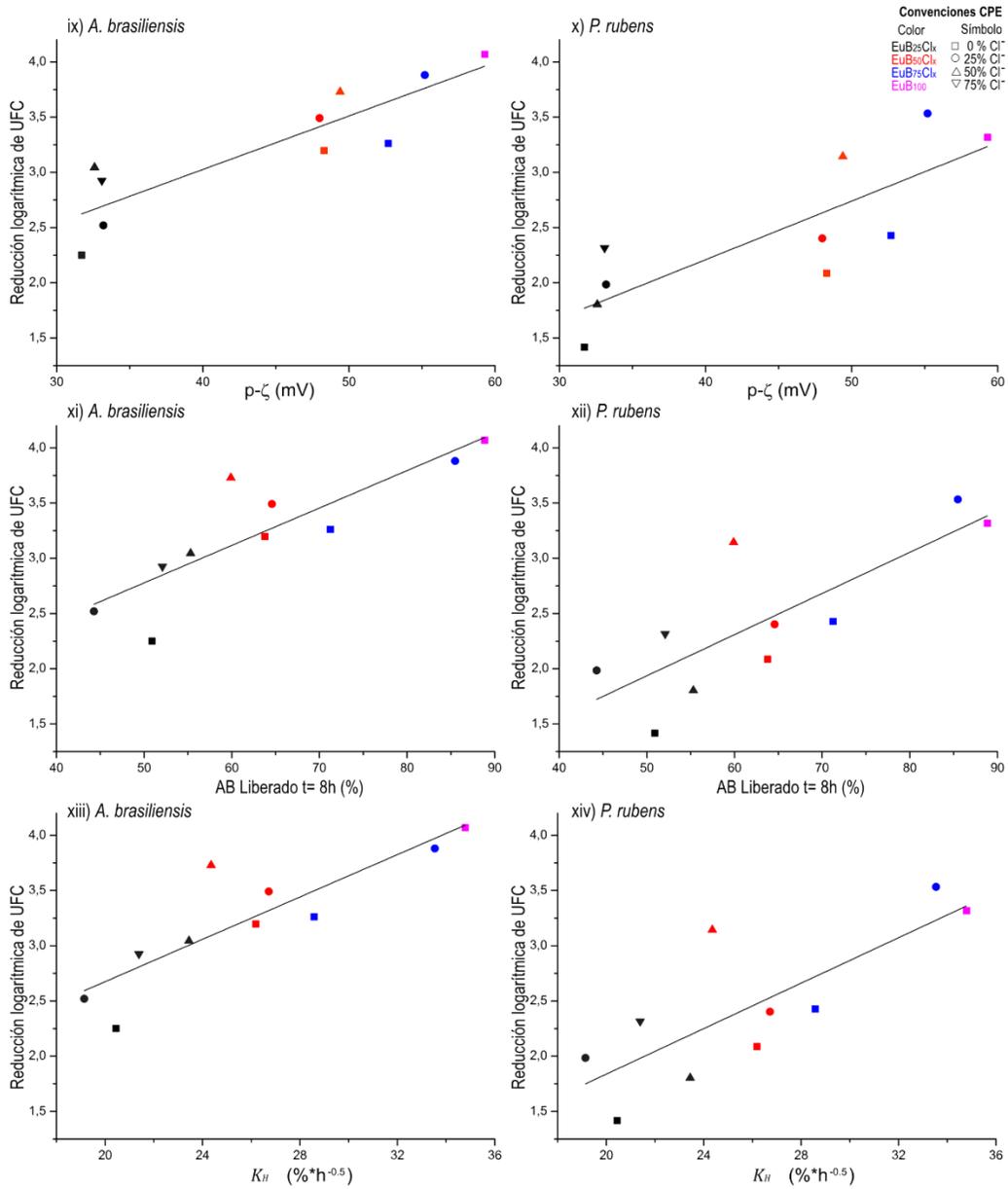
- Perfecta  $|r_{xy}| = 1$
- Excelente  $0,9 \leq |r_{xy}| < 1$
- Buena  $0,8 \leq |r_{xy}| < 0,9$
- Regular  $0,5 \leq |r_{xy}| < 0,8$
- Mala  $|r_{xy}| < 0,5$

Aun cuando se mencionó que la interpretación del valor  $r_{xy}$  es relativa a la investigación en cuestión, se consideró útil la escala descrita para los fines del presente estudio. Para los casos en los que el valor absoluto del coeficiente de correlación de Pearson fue superior a 0,8, es decir, correlaciones catalogadas como buenas o excelentes, se incluyó en la gráfica la recta de la regresión, de modo excepcional se hizo lo mismo para las dos variables fisicoquímicas de liberación en *P. rubens*, puesto que los valores estuvieron cerca del límite. En total, las variables que contaron con un nivel de correlación lineal aceptables fueron: “solubilidad” definida como la cantidad máxima aceptada en agua y expresada en % de AB, pseudo-potencial zeta y las dos variables asociadas a liberación (porcentaje de AB liberado en el tiempo final del ensayo y constante de liberación de Higuchi). Se observa la misma tendencia de resultados para los dos hongos filamentosos, evidenciando que la influencia de las propiedades fisicoquímicas fue independiente del microorganismo.

**Figura 5-1** Influencia de varias propiedades fisicoquímicas en la actividad antimicótica de los diez CPE frente a *Aspergillus brasiliensis* y *Penicillium rubens* a pH 6,0.



**Figura 5-1 (Cont.)** Influencia de varias propiedades fisicoquímicas en la actividad antimicótica de los diez CPE.



Las variables que no arrojaron una correlación lineal aceptable fueron:

- ☞ Temperatura de transición vítrea, muy posiblemente debido a que es una propiedad que mide una transición desde el estado sólido y no en dispersión, por ello su comportamiento no se ve reflejado en la actividad.

- ☞ Constante de afinidad, puesto que su determinación se realizó sin ajuste de pH, ya que representa la distribución de especies en el estado de equilibrio de la dispersión, además fue determinada a una concentración diferente (al 0,5 % de EuE).
- ☞ El cambio de pH por desplazamiento de AB debido al intercambio iónico, al igual que la variable anterior fue determinado a condiciones de pH diferentes, debido a la naturaleza propia del ensayo y también se llevó a cabo a la concentración de 0,5 % de AB.

**Tabla 5-2** Información asociada a la regresión lineal (pendiente e intercepto de la recta), coeficiente de correlación de Pearson ( $r_{xy}$ ) y concepto de la correlación de las gráficas incluidas en la Figura 5-1.

ID	Microrganismo	FQ <sup>1</sup>	Pendiente	Intercepto	$r_{xy}$	Concepto
i	<i>A. brasiliensis</i>	$T_g$	$-0,0447 \pm 0,0206$	$5,2287 \pm 0,9290$	-0,6095	Regular
ii	<i>P. rubens</i>	$T_g$	$-0,0464 \pm 0,0260$	$4,5072 \pm 1,1734$	-0,5335	Regular
iii	<i>A. brasiliensis</i>	"So" <sup>2</sup>	$0,0082 \pm 0,0013$	$2,2942 \pm 0,1671$	0,9146	Excelente
iv	<i>P. rubens</i>	"So" <sup>2</sup>	$0,0095 \pm 0,0017$	$1,3557 \pm 0,2220$	0,8911	Buena
v	<i>A. brasiliensis</i>	$\text{Log } K_{cc}$	$-1,4417 \pm 0,7509$	$11,9781 \pm 4,5556$	-0,5617	Regular
vi	<i>P. rubens</i>	$\text{Log } K_{cc}$	$-1,9559 \pm 0,8224$	$14,3019 \pm 4,9893$	-0,6436	Regular
vii	<i>A. brasiliensis</i>	$\Delta \text{pH}$	$-1,3491 \pm 0,4885$	$4,6912 \pm 0,5447$	-0,6986	Regular
viii	<i>P. rubens</i>	$\Delta \text{pH}$	$-1,6660 \pm 0,5535$	$4,2390 \pm 0,6173$	-0,7287	Regular
ix	<i>A. brasiliensis</i>	$\text{p-}\zeta$	$0,0484 \pm 0,0090$	$1,0896 \pm 0,4094$	0,8851	Buena
x	<i>P. rubens</i>	$\text{p-}\zeta$	$0,0529 \pm 0,0132$	$0,0929 \pm 0,5987$	0,8182	Buena
xi	<i>A. brasiliensis</i>	%AB <sub>liberado</sub>	$0,0339 \pm 0,0073$	$1,0803 \pm 0,4764$	0,8535	Buena
xii	<i>P. rubens</i>	% AB <sub>liberado</sub>	$0,0372 \pm 0,0101$	$0,0733 \pm 0,6606$	0,7922	Regular
xiii	<i>A. brasiliensis</i>	$K_H$ liberación	$0,0958 \pm 0,0193$	$0,7590 \pm 0,5080$	0,8690	Buena
xiv	<i>P. rubens</i>	$K_H$ liberación	$0,1028 \pm 0,0285$	$-0,2149 \pm 0,7494$	0,7874	Regular

<sup>1</sup> FQ: Variable fisicoquímica; <sup>2</sup>"So" Solubilidad determinada como cantidad máxima aceptada en agua. Nota: Por fines prácticos, las unidades de la pendiente y del intercepto no fueron incluidas, corresponden a las asociadas para cada propiedad fisicoquímica.

En cuanto a las variables en las que se encontró una correlación lineal aceptable, se puede afirmar que:

- ☞ "Solubilidad" definida como la cantidad máxima aceptada en agua y expresada en % de AB. Aunque no existe un efecto diferencial de la solubilidad a las condiciones

del ensayo de actividad, ya que los diez complejos eran solubles, los resultados de la correlación muestran que aquellos con mayor capacidad para mantenerse solubles en agua, son los mismos con mejores resultados antimicóticos, sugiriendo que la dispersión a nivel molecular facilita la interacción con los microorganismos.

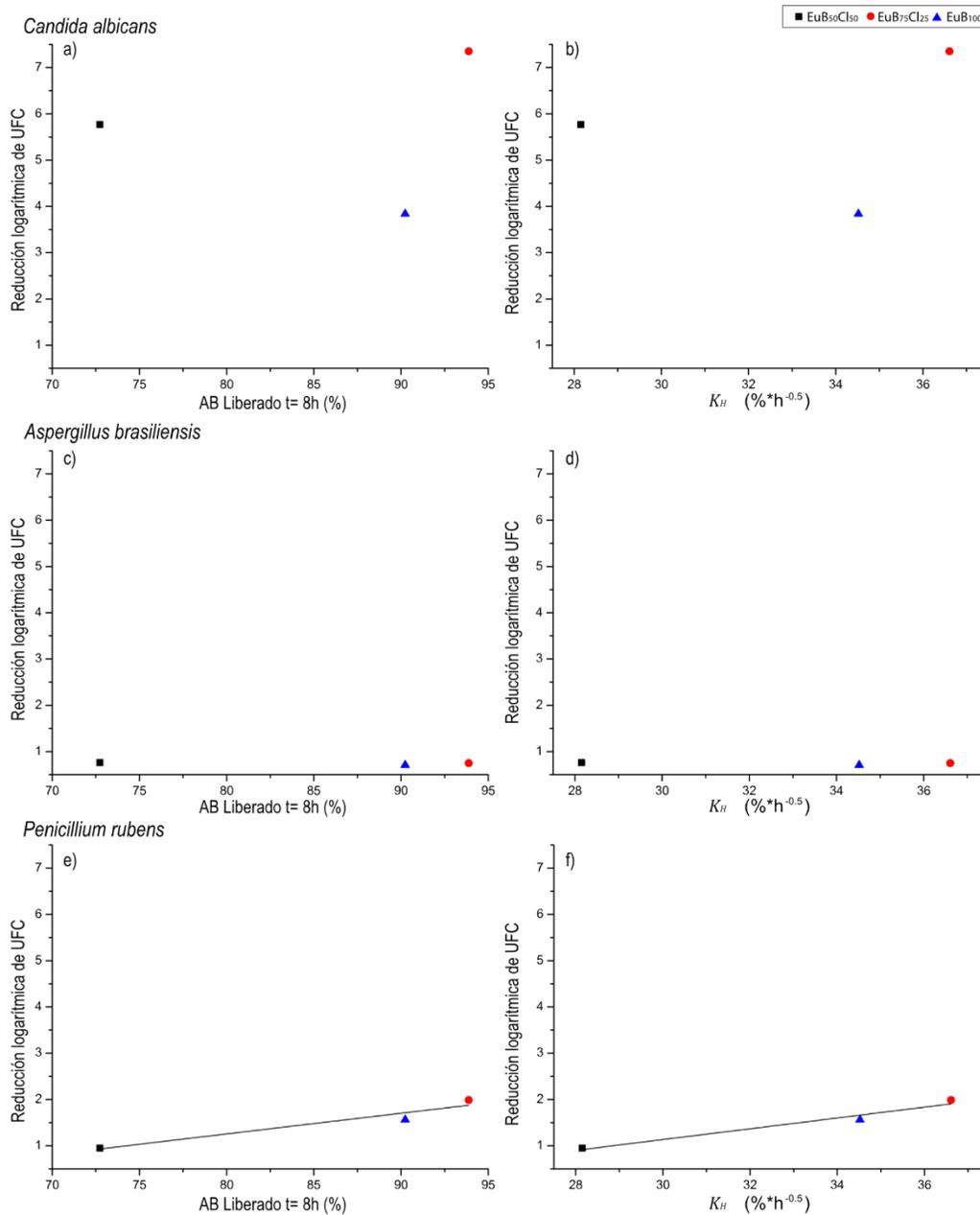
- ☞ Pseudo-potencial zeta ( $p-\zeta$ ). La naturaleza catiónica del PE y su interacción con estructuras celulares de carga negativa en la superficie de los microorganismos, explican la relación directa entre  $p-\zeta$  y actividad observada para los dos hongos filamentosos; por ello para esta variable es posible confirmar la causalidad de la correlación; incluso para bacterias y hongos se ha reportado que PE con cargas positivas facilitan el ingreso de agentes antimicrobianos como consecuencia de los daños inducidos a la membrana celular [119,319,320]. Esto podría ser explicado porque la membrana plasmática cargada negativamente es considerada el blanco principal de policationes, por tanto, aquellos sistemas con una carga de superficie mayor, interactuarán más efectivamente con el hongo [315].
- ☞ Las dos variables asociadas a liberación: porcentaje total de AB liberado y constante de liberación de Higuchi ( $K_H$ ). Estas correlaciones son de gran importancia, ya que tanto el ensayo de actividad, como el de liberación se llevaron a cabo a las mismas condiciones —0,6 % de AB y pH de 6,0—por lo que la relación directa entre variables demuestra que los CPE que causan mayores tasas de liberación del preservante, como era de esperarse, son los mismos que poseen efectos antimicóticos más pronunciados, esto es debido a la mayor disponibilidad del preservante para ingresar a la célula. Los hallazgos para estas dos variables posicionan al ensayo *in-vitro*, de liberación mediante celdas bicompartimentales de Franz, como una excelente herramienta para predecir resultados de actividad antimicótica de CPE de EuE frente a los dos hongos filamentosos y asimismo para optimizar la composición de los complejos.

### **SECCIÓN B.**

Corresponde a las correlaciones de *reducción logarítmica de UFC* (a pH 6,9 y 0,6 % de AB) de los complejos:  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$ ,  $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$  y  $\text{EuB}_{100}$ , frente a las dos variables asociadas a liberación. En este caso sí se incluyó *C. albicans* ya que arrojó resultados diferenciados; de modo semejante a la sección anterior, los resultados se presentan como las gráficas de

los datos correlacionados (Figura 5-2) y la información asociada a la regresión, el coeficiente de correlación de Pearson y el concepto en la Tabla 5-3.

**Figura 5-2** Influencia las variables de liberación ( $\% AB_{\text{Liberado}}$  y  $K_H$ ) en la actividad antimicótica de los CPE:  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$  (■),  $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$  (●) y  $\text{EuB}_{100}$  (▲), frente a *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis* y *Penicillium rubens* a pH 6,9.



De los tres microorganismos en estudio solo *P. rubens* obtuvo un concepto favorable de correlación. Para la levadura el  $r_{xy}$  ni siquiera superó 0,2, indicando nuevamente que los

resultados de actividad en *C. albicans* son independientes de las variables estudiadas, en este caso las relacionadas con liberación. Como se describió en el capítulo 4, muy posiblemente esto es debido a la naturaleza de la superficie celular, que se caracteriza por la presencia de una menor cantidad de estructuras poliméricas y en consecuencia una carga electronegativa inferior. Para *A. brasiliensis* tampoco se encontró una correlación aceptable, en este caso fue debido a la baja actividad exhibida por los tres complejos a pH de 6,9, por tanto, las diferencias en las variables de liberación no representaron ningún cambio en la reducción del número de UFC. En cuanto a los resultados de *P. rubens* se observa que mantuvieron el efecto de la sección A, incluso el concepto fue catalogado como “Excelente” para las dos variables, sin embargo, por tratarse de un análisis realizado únicamente con la información de tres de los complejos y no diez, como en la sección previa, la correlación pierde cierto grado de robustez, que le confiere una mayor cantidad de datos. La relación directa para este microorganismo indica que, a mayor tasa de liberación, mayor actividad, aún a pH 6,9.

**Tabla 5-3** Información asociada a la regresión lineal (pendiente e intercepto de la recta), coeficiente de correlación de Pearson ( $r_{xy}$ ) y concepto de la correlación de las gráficas incluidas en la Figura 5-2.

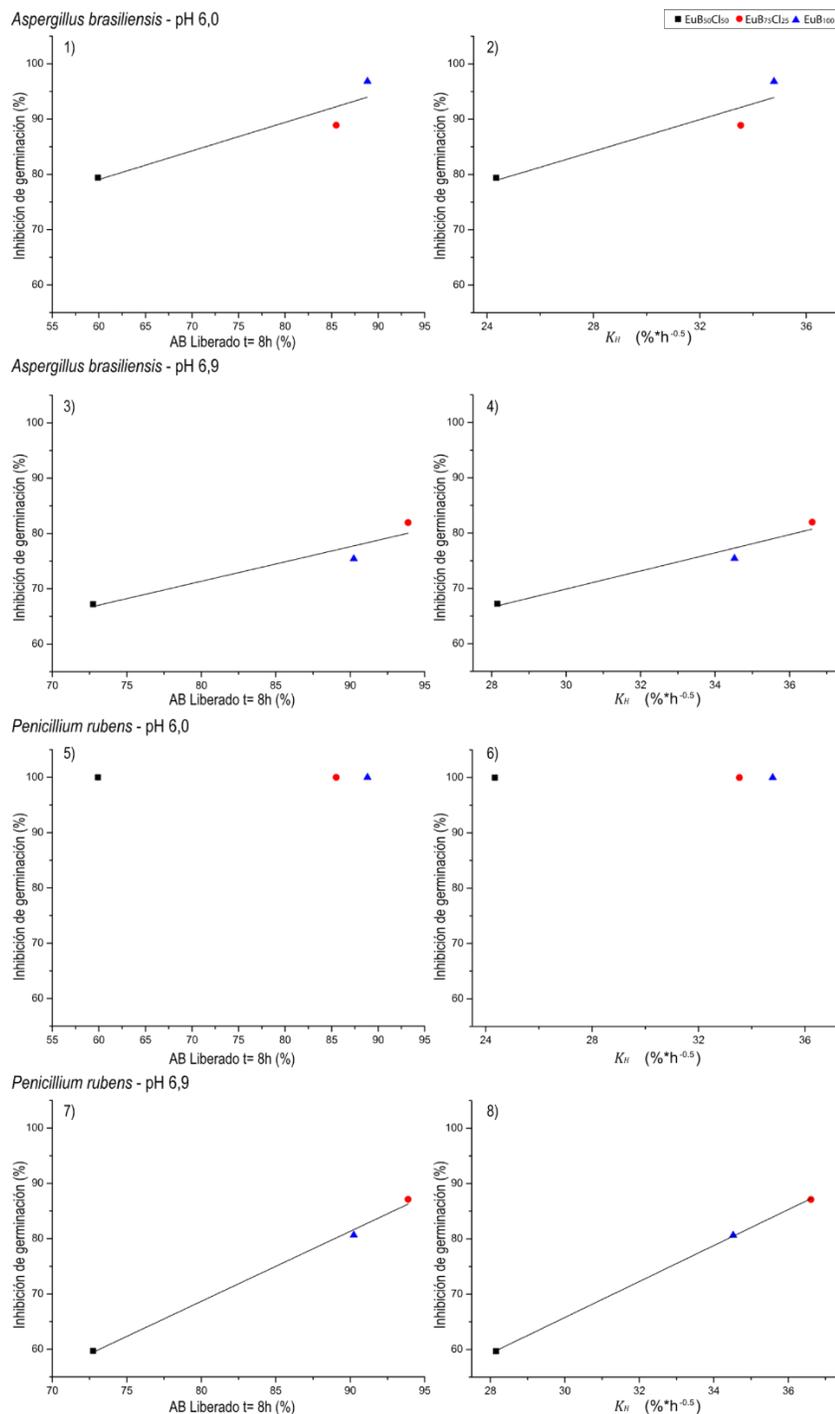
ID	Microorganismo	FQ	Pendiente	Intercepto	$r_{xy}$	Concepto
a	<i>C. albicans</i>	% AB <sub>liberado</sub>	0,0162 ± 0,1547	4,2677 ± 13,3218	0,1040	Mala
b	<i>C. albicans</i>	$K_H$ liberación	0,0722 ± 0,3923	3,2651 ± 13,0600	0,1809	Mala
c	<i>A. brasiliensis</i>	% AB <sub>liberado</sub>	-0,0012 ± 0,0020	0,8451 ± 0,1717	-0,5244	Regular
d	<i>A. brasiliensis</i>	$K_H$ liberación	-0,0027 ± 0,0053	0,8307 ± 0,1778	-0,4567	Mala
e	<i>P. rubens</i>	% AB <sub>liberado</sub>	0,0447 ± 0,0120	-2,3236 ± 1,0324	0,9658	Excelente
f	<i>P. rubens</i>	$K_H$ liberación	0,1166 ± 0,0218	-2,3578 ± 0,7246	0,9830	Excelente

### SECCIÓN C.

Se realizó utilizando como variable de actividad antimicótica, el porcentaje de inhibición de germinación de esporas de los hongos filamentosos y como variables fisicoquímicas, las asociadas a la liberación de AB, a condiciones de pH de 6,0 y 6,9, para los CPE: EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub>, EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub> y EuB<sub>100</sub>. Los resultados se presentan en la Figura 5-3 y en la Tabla 5-4 en la misma disposición utilizada en las secciones previas. La concentración empleada para el estudio de actividad fue de 0,3 % de AB y no de 0,6 % de AB, ya que en estudios previos (resultados no presentados) se encontró que el porcentaje de inhibición a las 24 horas era del 100%, hecho que no permitía establecer diferencias entre composiciones; incluso, para

*P. rubens* a pH 6,0 al 0,3% de AB, se observó tal evento y por ello no se logró realizar ninguna correlación al respecto.

**Figura 5-3** Influencia las variables de liberación (% AB<sub>Liberado</sub> y  $K_H$ ) en la inhibición de germinación de esporas de *Aspergillus brasiliensis* y *Penicillium rubens*, por parte de los CPE: EuB<sub>50</sub>Cl<sub>50</sub> (■), EuB<sub>75</sub>Cl<sub>25</sub> (●) y EuB<sub>100</sub> (▲), a pH 6,0 y 6,9.



**Tabla 5-4** Información asociada a la regresión lineal (pendiente e intercepto de la recta), coeficiente de correlación de Pearson ( $r_{xy}$ ) y concepto de la correlación de las gráficas incluidas en la Figura 5-3.

ID	pH	FQ	Pendiente	Intercepto	$r_{xy}$	Concepto
1	6,0	% AB <sub>liberado</sub>	$0,5157 \pm 0,1971$	$48,0961 \pm 15,6010$	0,9341	Excelente
2		$K_H$ liberación	$1,4342 \pm 0,5424$	$44,0546 \pm 16,9456$	0,9354	Excelente
3	6,9	% AB <sub>liberado</sub>	$0,6255 \pm 0,1920$	$21,3056 \pm 16,5334$	0,9560	Excelente
4		$K_H$ liberación	$1,6377 \pm 0,3664$	$20,6679 \pm 12,1974$	0,9759	Excelente
5	6,0	% AB <sub>liberado</sub>	0	100	N.A	N.A
6		$K_H$ liberación	0	100	N.A	N.A
7	6,9	% AB <sub>liberado</sub>	$1,2658 \pm 0,0826$	$-32,5682 \pm 7,1123$	0,9979	Excelente
8		$K_H$ liberación	$3,2530 \pm 0,0407$	$-31,8438 \pm 1,3563$	0,9999	Excelente

Para estas seis correlaciones se obtuvo un concepto de “Excelente”, debido en parte a la menor cantidad de datos utilizados, como se describió previamente. Estos resultados demuestran que el efecto de liberación no sólo tiene impacto general, exhibido como reducción del número de UFC de los hongos filamentosos, sino que adicionalmente influye desde el proceso germinativo; de modo que mayores tasas de liberación repercuten en porcentajes más altos de inhibición de la germinación.

### 5.3 Conclusiones

Para la determinación de las posibles correlaciones entre las propiedades fisicoquímicas de los CPE obtenidos y su actividad antimicótica, se encontró que:

- ☞ De las siete variables fisicoquímicas estudiadas: temperatura de transición vítrea, “solubilidad” como cantidad máxima aceptada en agua, constante de afinidad, diferencia de pH por desplazamiento de AB, pseudo-potencial zeta ( $p-\zeta$ ), porcentaje de AB liberado en el punto final y constante de liberación de Higuchi; aquellas que presentaron una buena correlación de relación directa, con los estudios de actividad —realizados mediante recuento de UFC viables, a pH 6,0, para *A. brasiliensis* y *P. rubens*— fueron “solubilidad”,  $p-\zeta$  y las dos variables de liberación. La causalidad de la correlación con  $p-\zeta$  se adjudicó a la interacción entre las cargas positivas de los CPE con las estructuras cargadas negativamente de la superficie y membrana

plasmática de los hongos, mientras que, la causalidad de las dos variables de liberación se asoció con la mayor disponibilidad del activo para ingresar a la célula.

- ☞ Los estudios de liberación a pH 6,9 evidenciaron correlación con la actividad antimicótica —realizada mediante recuento de UFC viables, a pH 6,9— únicamente para el hongo *Penicillium rubens*.
- ☞ El efecto antimicótico exhibido por los CPE frente a *C. albicans* no presentó ningún tipo de correlación con las variables fisicoquímicas estudiadas.
- ☞ El porcentaje de inhibición de germinación de esporas y las variables de liberación presentan correlaciones, “excelentes” (en la mayoría de los casos) para los dos hongos filamentosos.

# Conclusiones y recomendaciones

## Conclusiones

En la presente investigación se encontró que:

- ☞ Para la obtención de CPE entre Eudragit® E100 y ácido benzoico mediante el método de evaporación por solvente, los factores: tipo de secado, elección y volumen de solvente, tiempo de interacción de los componentes y concentración de HCl, no cuentan con un efecto significativo en la condensación iónica del complejo; por ello, las condiciones para la obtención de diez composiciones de CPE —distintas en porcentaje de contraión benzoato y/ cloruro— fueron seleccionadas en función de un menor impacto ambiental y una mayor facilidad para el experimentador. La metodología de obtención diseñada permitió la preparación reproducible de los diez CPE, los cuales evidenciaron la formación de la interacción iónica entre polielectrolito y activo por FTIR.
- ☞ Todas las propiedades fisicoquímicas evaluadas (patrón de difracción de rayos X, temperatura de transición vítrea, solubilidad, constante de afinidad, desplazamiento de AB por intercambio iónico, evaluación de la carga de superficie y comportamiento de liberación) demostraron dependencia de la composición de los CPE, siendo los más promisorios, aquellos con mayor porcentaje del contraión benzoato, ya que contaron, entre otros, con los valores más altos de “solubilidad”, de  $p\text{-}\zeta$  y las tasas más altas de liberación.
- ☞ La composición de los diez CPE no afectó la actividad antimicótica de *Candida albicans*, mientras que, para *Aspergillus brasiliensis* y *Penicillium rubens*, se evidenció, por la información de CMI y de recuento de UFC viables, que a mayor porcentaje del contraión benzoato en la composición, mayor es el efecto sobre los hongos. También se demostró que el ionómero EuCl<sub>100</sub> cuenta con actividad frente

a los tres microorganismos, la cual fue, en la mayoría de los casos, menor a la exhibida por los CPE, pero superior a la de benzoato de sodio.

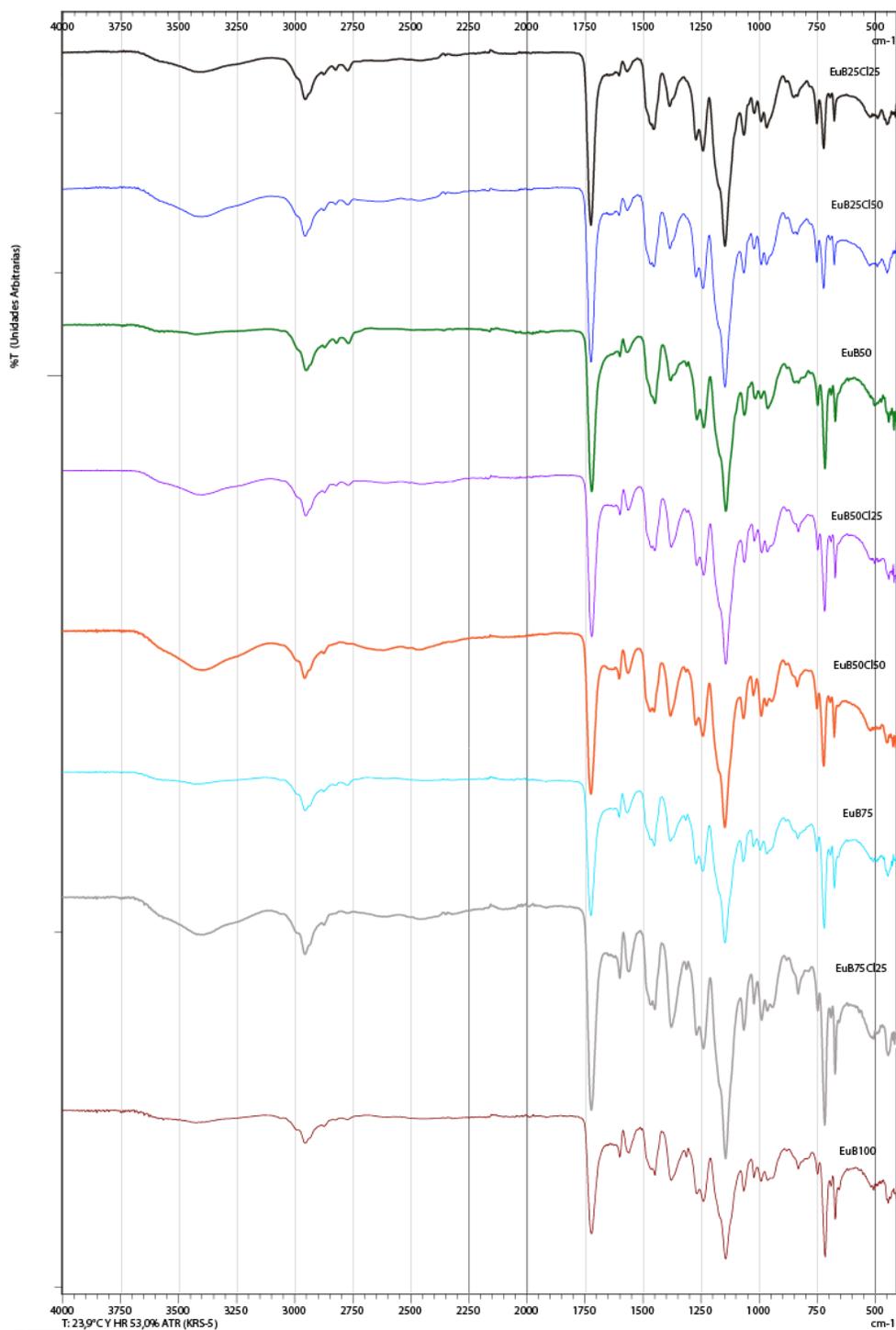
- ☞ El efecto antimicótico exhibido por los CPE frente a *C. albicans* no presentó ningún tipo de correlación con las propiedades fisicoquímicas. Para *A. brasiliensis* y *P. rubens*, las variables que demostraron una buena correlación de relación directa, con los estudios de actividad, realizados mediante recuento de UFC viables, a pH 6,0, fueron “solubilidad”,  $p-\zeta$  y las dos variables de liberación. La causalidad de la correlación con  $p-\zeta$  se adjudicó a la interacción entre las cargas positivas de los CPE con las estructuras cargadas negativamente de la superficie y membrana plasmática de los hongos, mientras que, la causalidad de las dos variables de liberación se asoció con la mayor disponibilidad del activo para ingresar a la célula.

## Recomendaciones

- ☞ Con el fin de profundizar en los hallazgos asociados a la actividad antimicótica que exhibieron los CPE y el ionómero  $\text{EuCl}_{100}$  frente a los microorganismos *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis* y *Penicillium rubens* en la presente investigación, se recomienda realizar estudios específicos de microscopía electrónica y de citometría de flujo, en aras de determinar el efecto de los sistemas polielectrolito en la pared celular y/o la membrana plasmática de los microorganismos.
- ☞ Evaluar otros métodos de obtención de los CPE (que sean escalables), como la extrusión por fusión o el secado por aspersion, con el fin de corroborar que producto del cambio en el método de obtención no se alteran las propiedades fisicoquímicas, ni la actividad antimicótica de los complejos.
- ☞ Realizar un estudio semejante al de la presente investigación para los CPE más promisorios, que evalúe la actividad antibacteriana.
- ☞ Determinar si producto de la complejación del AB con EuE, se disminuye el efecto de algunas de las conocidas desventajas del preservante que limitan su uso, como la sensibilización.

## **Anexo A: Espectros IR de los complejos restantes**

**Figura A 1** Espectros IR de los complejos  $\text{EuB}_{25}\text{Cl}_{25}$ ,  $\text{EuB}_{25}\text{Cl}_{50}$ ,  $\text{EuB}_{50}$ ,  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{25}$ ,  $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$ ,  $\text{EuB}_{75}$ ,  $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$  y  $\text{EuB}_{50}$ ,  $\text{EuB}_{100}$ .



# **Anexo B: Activación de las cepas y preparación de inóculos.**

A continuación, se presenta la metodología al respecto.

## **1. Activación de las cepas.**

Para la activación de las cepas utilizadas se siguieron las instrucciones del fabricante, para ello se realizó la siembra del hisopo impregnado con la muestra comercial en placas con el respectivo agar de cultivo (AA19 para la levadura y PDA para los hongos filamentosos), las cuales fueron incubadas así: 24 horas y 35°C para *C. albicans*; y cinco días a 25°C para *A. brasiliensis* y *P. rubens*. Una vez transcurrido el periodo de incubación se realizó un segundo repique, el cual fue realizado de manera semejante al inicial. Del crecimiento en placa de los microorganismos en el segundo repique, se obtuvo la dispersión de levaduras o de esporas en agua pectonada, a la que se le adicionó como agente crioprotector glicerol en una proporción de 30% v/v para la obtención de las cepas de reserva, y se congeló a una temperatura de -5°C.

## **2. Preparación de inóculo de *C. albicans*.**

Se sembró una alícuota procedente de las cepas de reserva en una placa con agar antibiótico 19 y se incubó por veinticuatro horas a una temperatura de 35°C. Se preparó el inóculo “picando” cinco colonias de diámetro aproximado de un milímetro de la superficie de la placa y se suspendieron en agua estéril. La dispersión se homogenizó por quince segundos haciendo uso de un agitador vortex (IKA® Vortex Genius 3), luego se ajustó la concentración de esporas con ayuda de hemocitómetro (cámara de Neubauer) previa adición de azul de metileno para la tinción de las células.

### **3. Preparación de inóculo de los hongos filamentosos.**

Se procedió de manera semejante que para la levadura: inicialmente se sembró una alícuota de la cepa de reserva en el agar de papa y dextrosa (PDA) y se incubó por cinco días a 25°C, este medio indujo la formación de las esporas. Para facilitar su recolección, se introdujo el asa de cultivo en Tween 20 y se pasó por encima de estas. Luego se resuspendieron en agua, se dejaron sedimentar las partículas durante tres a cinco minutos y se transfirió el sobrenadante a otro tubo, que fue homogenizado por quince segundos con ayuda del agitador vortex (IKA® Vortex Genius 3). Con la cámara de Neubauer se ajustó la concentración de esporas.

## Bibliografía

- [1] Santa C F and Lopez Osorio B L 2013 Materiales Poliméricos En Nanomedicina: Transporte Y Liberación Controlada De Fármacos *Rev. la Acad. Colomb. Ciencias Exactas, Físicas y Nat.* **37** 115–24
- [2] Quinteros D A, Rigo V R, Kairuz A F J, Olivera M E, Manzo R H and Allemandi D A 2008 Interaction between a cationic polymethacrylate (Eudragit E100) and anionic drugs *Eur. J. Pharm. Sci.* **33** 72–9
- [3] Musiol R, Jampilek J, Buchta V, Silva L, Niedbala H, Podeszwa B, Palka A, Majerz-Maniecka K, Oleksyn B and Polanski J 2006 Antifungal properties of new series of quinoline derivatives *Bioorganic Med. Chem.* **14** 3592–8
- [4] Michaels A S 1965 Polyelectrolyte complexes *Ind. Eng. Chem.* **57** 32–40
- [5] Bungenberg de Jong H G 1932 The coacervation and its significance for the biology *Protoplasma* **15** 110–73
- [6] Lankalapalli S and Kolapalli V R M 2009 Polyelectrolyte Complexes: A Review of their Applicability in Drug Delivery Technology. *Indian J. Pharm. Sci.* **71** 481–7
- [7] Dakhara S and Anajwala C 2010 Polyelectrolyte complex: A pharmaceutical review *Syst. Rev. Pharm.* **1** 121
- [8] Higuchi T, Kuramoto R, Kennon L, Flanagan T L and Polk A 1954 Possible utilization of polyelectrolytes in enhancing drug absorption. *J. Am. Pharm. Assoc. Am. Pharm. Assoc. (Baltim).* **43** 646–51
- [9] Kennon L and Higuchi T 1956 Interaction Studies of Cationic Drugs with Anionic Polyelectrolytes I: Sodium Carboxymethylcellulose *J. Am. Pharm. Assoc. (Scientific ed.)* **45** 157–60
- [10] Schlichting D A 1962 Ion Exchange Resin Salts for Oral Therapy I: Carbinoxamine *J. Pharm. Sci.* **51** 134–6
- [11] Kawashima Y, Handa T, Kasai A, Takenaka H, Lin S Y and Ando Y 1985 Novel Method for the Preparation of Controlled-Release Theophylline Granules Coated with a Polyelectrolyte Complex of Sodium Polyphosphate-Chitosan *J. Pharm. Sci.* **74** 264–8
- [12] Albano A, Phuapradit W, Sandhu H and Shah N 2002 Stable complexes of poorly soluble compounds in ionic polymers
- [13] de la Torre P M, Enobakhare Y, Torrado G and Torrado S 2003 Release of amoxicillin from polyionic complexes of chitosan and poly(acrylic acid). Study of polymer/polymer and polymer/drug interactions within the network structure. *Biomaterials* **24** 1499–506
- [14] Win P P, Shin-ya Y, Hong K-J and Kajiuchi T 2003 Formulation and characterization of pH sensitive drug carrier based on phosphorylated chitosan (PCS) *Carbohydr. Polym.* **53** 305–10
- [15] Tapia C, Escobar Z, Costa E, Sapag-Hagar J, Valenzuela F, Basualto C, Gai M N and Yazdani-Pedram M 2004 Comparative studies on polyelectrolyte complexes

- and mixtures of chitosan-alginate and chitosan-carrageenan as prolonged diltiazem clorhydrate release systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **57** 65–75
- [16] Jimenez-Kairuz A F, Llabot J M, Allemandi D A and Manzo R H 2005 Swellable drug-polyelectrolyte matrices (SDPM) *Int. J. Pharm.* **288** 87–99
- [17] Shiraishi S, Imai T and Otagiri M 1993 Controlled release of indomethacin by chitosan-polyelectrolyte complex: optimization and in vivo/in vitro evaluation *J. Control. Release* **25** 217–25
- [18] Realdon N, Ragazzi E, Zotto M D and Fini G D 1998 Possibilities of Conveying a Cationic Drug in Carbomer Hydrogels *Drug Dev. Ind. Pharm.* **24** 337–43
- [19] Sriwongjanya M and Bodmeier R 1998 Effect of ion exchange resins on the drug release from matrix tablets. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **46** 321–7
- [20] Mi F-L, Shyu S-S, Kuan C-Y, Lee S-T, Lu K-T and Jang S-F 1999 Chitosan-Polyelectrolyte complexation for the preparation of gel beads and controlled release of anticancer drug. I. Effect of phosphorous polyelectrolyte complex and enzymatic hydrolysis of polymer *J. Appl. Polym. Sci.* **74** 1868–79
- [21] Konar N and Kim C 1999 Drug release from drug-polyanion complex tablets: poly(acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonate sodium -co- methyl methacrylate). *J. Control. Release* **57** 141–50
- [22] Rolfes H, Van D and Truter P 2001 Method of making controlled release particles of complexed polymers
- [23] Pillai O and Panchagnula R 2001 Polymers in drug delivery *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5** 447–51
- [24] Takka S, Rajbhandari S and Sakr A 2001 Effect of anionic polymers on the release of propranolol hydrochloride from matrix tablets *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **52** 75–82
- [25] P.M V 2014 *Polyelectrolytes: Thermodynamics and Rheology*
- [26] Aulton M E and Cooper J W (John W 2002 *Pharmaceutics : the science of dosage form design* (Churchill Livingstone)
- [27] Bhise K S, Dhumal R S, Shailesh B, Paradkar A R and Kadam S S 2010 Effect of Oppositely Charged Polymer and Dissolution Media on Rheology of Spray-Dried Ionic Complexes *AAPS PharmSciTech* **11** 226–32
- [28] Zhiqiang S, Newton C, Jianwen M and Milford N 2010 Polyelectrolyte complexes as thickeners for high ionic strength salt solutions
- [29] Agresti C, Tu Z, Ng C, Yang Y and Liang J F 2008 Specific interactions between diphenhydramine and alpha-helical poly(glutamic acid)--a new ion-pairing complex for taste masking and pH-controlled diphenhydramine release. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **70** 226–33
- [30] Lu M Y, Borodkin S, Woodward L, Li P, Diesner C, Hernandez L and Vadnere M 1991 A polymer carrier system for taste masking of macrolide antibiotics. *Pharm. Res.* **8** 706–12
- [31] Chun M-K and Choi H-K 2004 Preparation and characterization of enrofloxacin/carbopol complex in aqueous solution *Arch. Pharm. Res.* **27** 670–5
- [32] Ying M, Lake L, Borodkin S, Township L and County L 1989 Antibiotic-polymer compositions
- [33] Sharma V, Chopra H and Deharadun I M T 2010 Role of taste and taste masking of bitter drugs in pharmaceutical industries-an overview. *Int J Pharm Pharm. Sci.* **2** 14–8
- [34] Jimenez-Kairuz A F, Allemandi D A and Manzo R H 2004 The improvement of

- aqueous chemical stability of a model basic drug by ion pairing with acid groups of polyelectrolytes *Int. J. Pharm.* **269** 149–56
- [35] Esteban S L, Manzo R H and Alovero F L 2009 Azithromycin loaded on hydrogels of carbomer: Chemical stability and delivery properties *Int. J. Pharm.* **366** 53–7
- [36] Gavhane Yogeshku N, Shinde Vikram R, Bhagat Abhimanyu K and Yadav Adhikrao V 2010 Stability enhancement of Aloe-Gel by formulating polyelectrolyte complex beads *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2** 66–9
- [37] Sankalia M G, Mashru R C, Sankalia J M and Sutariya V B 2007 Reversed chitosan–alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: Optimization and physicochemical characterization *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **65** 215–32
- [38] Coquelet C, Lakhchaf N, Pages B, Persin M, Rao L S, Sarrazin J and Tarrago G 1996 Association between benzalkonium chloride and a poly( acrylic acid) gel. Study by microfiltration and membrane dialysis *J. Memb. Sci.* **120** 287–93
- [39] Ketelson L, Howard A, Nissanke L and Luck M 2009 Interaction control of cationic biocides using labile anionic polyelectrolytes
- [40] Gad S C, Wiley Online Library. and Wiley InterScience (Online service) 2009 *Drug safety evaluation* (Wiley)
- [41] Katdare A and Chaubal M V 2009 *Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery systems* (Informa Healthcare)
- [42] Weiner M L and Kotkoskie L A 2000 *Excipient toxicity and safety* (M. Dekker)
- [43] Vilches A P, Jimenez-Kairuz A, Alovero F, Olivera M E, Allemandi D A and Manzo R H 2002 Release kinetics and up-take studies of model fluoroquinolones from carbomer hydrogels. *Int. J. Pharm.* **246** 17–24
- [44] Hg vob H F, Mark N M and Bikales C G 1987 *Encyclopedia of polymer science and engineering. 2nd edition. vol 2* (New York: John Wiley and Sons, A Willey Interscience Publishers)
- [45] Manning G S 1972 Polyelectrolytes *Annu. Rev. Phys. Chemistry* **23** 117–40
- [46] Imai N and Mandel M 1982 Theory of the polyion diffusion constant in polyelectrolyte solutions containing low molar mass electrolyte *Macromolecules* **15** 1562–6
- [47] Koetz J, Beitz T and Tiersch B 1999 Self assembled polymer-surfactant systems *J. Dispers. Sci. Technol.* **20** 139–63
- [48] Gennaro A R, Remington J P (Joseph P and Belluci S 2003 *Dispersiones Coloidales Remington Farmacia* (Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana) pp 334–65
- [49] Philipp B, Dautzenberg H, Linow K-J, Kötz J and Dawydoff W 1989 Polyelectrolyte complexes — recent developments and open problems *Prog. Polym. Sci.* **14** 91–172
- [50] Tsuchida E 1994 Formation of Polyelectrolyte Complexes and Their Structures *J. Macromol. Sci. Part A* **31** 1–15
- [51] Dautzenberg H 2001 Polyelectrolyte complex formation in highly aggregating systems: Methodical aspects and general tendencies. *Physical chemistry of polyelectrolytes, Surfactant Science Series*, (New York: Dekker) pp 743–92
- [52] Takka S 2003 Propranolol hydrochloride–anionic polymer binding interaction *Farm.* **58** 1051–6
- [53] Gärdlund L, Wågberg L and Norgren M 2007 New insights into the structure of polyelectrolyte complexes *J. Colloid Interface Sci.* **312** 237–46
- [54] Hamman J H 2010 Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier

- materials in drug delivery systems *Mar. Drugs* **8** 1305–22
- [55] Dinu I A, Mihai M and Dragan E S 2010 Comparative study on the formation and flocculation properties of polyelectrolyte complex dispersions based on synthetic and natural polycations *Chem. Eng. J.* **160** 115–21
- [56] Le Cerf D, Pepin A S, Niang P M, Cristea M, Karakasyan-Dia C and Picton L 2014 Formation of polyelectrolyte complexes with diethylaminoethyl dextran: Charge ratio and molar mass effect *Carbohydr. Polym.* **113** 217–24
- [57] Liu H, Wang P, Zhang X, Shen F and Gogos C G 2010 Effects of extrusion process parameters on the dissolution behavior of indomethacin in Eudragit®E PO solid dispersions *Int. J. Pharm.* **383** 161–9
- [58] Siyawamwaya M, Choonara Y E, Bijukumar D, Kumar P, Du Toit L C and Pillay V 2015 A Review: Overview of Novel Polyelectrolyte Complexes as Prospective Drug Bioavailability Enhancers *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* **64** 955–68
- [59] Thünemann A F, Müller M, Dautzenberg H, Joanny J-F and Löwen H 2001 Polyelectrolyte Complexes *Advances in Polymer Science* (Springer Berlin Heidelberg) pp 113–71
- [60] Flores M, Morillo M and Crespo M L 1997 Deterioration of raw materials and cosmetic products by preservative resistant microorganisms *Int. Biodeterior. Biodegradation* **40** 157–60
- [61] Ravita T D, Tanner R S, Ahearn D G, Arms E L and Crockett P W 2009 Post-consumer use efficacies of preservatives in personal care and topical drug products: relationship to preservative category *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **36** 35–8
- [62] Troy D B and Beringer P 2006 *Remington: The science and practice of pharmacy*. (Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins Eds)
- [63] Denyer S P and Hugo W B (William B 2004 *Hugo and Russell's pharmaceutical microbiology* (Massachussets: Wiley-Blackwell)
- [64] Lundov M D, Moesby L, Zachariae C and Johansen J D 2009 Contamination versus preservation of cosmetics: A review on legislation, usage, infections, and contact allergy *Contact Dermatitis* **60** 70–8
- [65] Weiss J, Gaysinsky S, Davidson M and McClements J 2009 Nanostructured Encapsulation Systems: Food Antimicrobials *Global issues in food science and technology* (New York: El Sevier Inc) pp 425–79
- [66] Bromberg L 2003 Intelligent polyelectrolytes and gels in oral drug delivery *Curr Pharm Biotechnol* **4** 339–49
- [67] Rowe R C, Sheskey P J and Owen S C 2006 *Handbook of pharmaceutical excipients* ed P Press (London: American Pharmacists Association and Pharmaceutical Press)
- [68] Annamalai M, Assmus M, Bar H, Bull R, Chen R and Dassinger T 2008 *Eudragit® Application Guidelines* (Alemania: Evonik Industries)
- [69] Evonik Nutrition and Care GmbH 2015 Eudragit E100, Eudragit E PO and Eudragit E 12,5. Specification and Test Methods *Evonik Tech. Inf.* **INFO 7.1/E** 1–6
- [70] Lin S Y, Chen K S and Run-Chu L 2000 Organic esters of plasticizers affecting the water absorption, adhesive property, glass transition temperature and plasticizer permanence of Eudragit acrylic films *J. Control. Release* **68** 343–50
- [71] Guzmán M L, Manzo R H and Olivera M E 2012 Eudragit E100 as a drug carrier: The remarkable affinity of phosphate ester for dimethylamine *Mol. Pharm.* **9** 2424–33

- [72] Quinteros D A, Tártara L I, Palma S D, Manzo R H and Allemandi D A 2014 Ocular delivery of flurbiprofen based on Eudragit E-flurbiprofen complex dispersed in aqueous solution: Preparation, characterization, in vitro corneal penetration, and ocular irritation *J. Pharm. Sci.* **103** 3859–68
- [73] Valizadeh H, Zakeri-Milani P, Barzegar-Jalali M, Mohammadi G, Danesh-Bahreini M-A, Adibkia K and Nokhodchi A 2007 Preparation and Characterization of Solid Dispersions of Piroxicam with Hydrophilic Carriers *Drug Dev. Ind. Pharm.* **33** 45–56
- [74] Alasino R V., Leonhard V, Bianco I D and Beltramo D M 2012 Eudragit E100 surface activity and lipid interactions *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **91** 84–9
- [75] Alasino R V., Bianco I D, Vitali M S, Zarzur J A and Beltramo D M 2007 Characterization of the inhibition of enveloped virus infectivity by the cationic acrylate polymer eudragit e100 *Macromol. Biosci.* **7** 1132–8
- [76] Ausar S F, Bianco I D, Castagna L F, Alasino R V. and Beltramo D M 2003 Interaction of a cationic acrylate polymer with caseins: Biphasic effect of Eudragit E100 on the stability of casein micelles *J. Agric. Food Chem.* **51** 4417–23
- [77] Alasino R V., Ausar S F, Bianco I D, Castagna L F, Contigiani M and Beltramo D M 2005 Amphipathic and membrane-destabilizing properties of the cationic acrylate polymer Eudragit® E100 *Macromol. Biosci.* **5** 207–13
- [78] Chipley J R 2005 Chapter 2: Sodium Benzoate and Benzoic Acid *Antimicrobials in food* ed P M Davinson, J Sofos and A . Branen (Boca Ratón) p 11moieties
- [79] Sieber R, Bütikofer U and Bosset J O 1995 Benzoic acid as a natural compound in cultured dairy products and cheese *Int. Dairy J.* **5** 227–46
- [80] Indrayanto G, Syahrani A, Mugihardjo, Rahman A, Soeharjono, Tanudjojo W, Susanti S, Yuwono M and Ebel S 1999 Benzoic Acid *Anal. Profiles Drug Subst. Excipients* **26** 1–46
- [81] Pundir R K and Jain P 2010 Screening for antifungal activity of commercially available chemical food preservatives *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **5** 25–7
- [82] Tfouni S A V and Toledo M C F 2002 Determination of benzoic and sorbic acids in Brazilian food *Food Control* **13** 117–23
- [83] Brul S and Coote P 1999 Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms *Int. J. Food Microbiol.* **50** 1–17
- [84] Bautista Erazo D E 2015 *Determinación de la eficacia antibiótica de los complejos de asociación ampicilina-polímero PAM 18Na2 en cepas de Staphylococcus aureus* (Universidad ICESI)
- [85] Nacucchio M C, Bellora M J G, Sordelli D and Aquino D 1985 Enhanced Liposome-Mediated Activity of Piperacillin Against Staphylococci *Antimicrob. Agents Chemother.* **27** 137–9
- [86] Schumacher I and Margalit R 1997 Liposome-Encapsulated Ampicillin : Physicochemical and Antibacterial Properties *J. Pharm. Sci.* **86** 635–41
- [87] Fontana G, Pitarresi G, Tomarchio V, Carlisi B, Luigi P and Biagio S 1998 Preparation , characterization and in vitro antimicrobial activity of ampicillin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles *Biomaterials* **19** 1009–17
- [88] Yu B G, Okano T, Kataoka K, Sardari S and Kwon G S 1998 In vitro dissociation of antifungal efficacy and toxicity for aspartate ) micelles *J. Control. Release* **56** 285–91
- [89] Beaulac C, Sachtelli S and Lagace J 1998 In-vitro bactericidal efficacy of sub-MIC concentrations of liposome-encapsulated antibiotic against gram-negative and gram-positive bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **41** 35–41
- [90] Kim H J, Michael Gias E L and Jones M N 1999 The adsorption of cationic

- liposomes to Staphylococcus aureus biofilms *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **149** 561–70
- [91] Patel J S, Patel S V., Talpada N P and Patel H A 1999 Bioactive polymers: Synthesis, release study and antimicrobial properties of polymer bound Ampicillin *Die Angew. Makromol. Chemie* **271** 24–7
- [92] Şenel S, İkinci G, Kaş S, Yousefi-Rad A, Sargon M F and Hincal A A 2000 Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery *Int. J. Pharm.* **193** 197–203
- [93] Furneri P M, Fresta M, Puglisi G and Tempera G 2000 Ofloxacin-loaded liposomes: In vitro activity and drug accumulation in bacteria *Antimicrob. Agents Chemother.* **44** 2458–64
- [94] Lavasanifar A, Samuel J, Sattari S and Kwon G S 2002 Block Copolymer Micelles for the Amphotericin B *Pharm. Res.* **19** 418–22
- [95] Carafa M, Marianecchi C, Lucania G, Marchei E and Santucci E 2004 New vesicular ampicillin-loaded delivery systems for topical application: Characterization, in vitro permeation experiments and antimicrobial activity *J. Control. Release* **95** 67–74
- [96] Wu W, Wieckowski S, Pastorin G, Benincasa M, Klumpp C, Briand J P, Gennaro R, Prato M and Bianco A 2005 Targeted delivery of amphotericin B to cells by using functionalized carbon nanotubes *Angew. Chemie - Int. Ed.* **44** 6358–62
- [97] Drulis-Kawa Z, Gubernator J, Dorotkiewicz-Jach A, Doroszkiewicz W and Kozubek A 2006 A comparison of the in vitro antimicrobial activity of liposomes containing meropenem and gentamicin *Cell. Mol. Biol. Lett.* **11** 360–75
- [98] Ruggeri V, Francolini I, Donelli G and Piozzi A 2007 Synthesis, characterization, and in vitro activity of antibiotic releasing polyurethanes to prevent bacterial resistance *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **81A** 287–98
- [99] Turos E, Reddy G S K, Greenhalgh K, Ramaraju P, Abeylath S C, Jang S and Lim D V 2007 Penicillin-bound polyacrylate nanoparticles: Restoring the activity of  $\beta$ -lactam antibiotics against MRSA *Biomaterials* **17** 3468–72
- [100] Tin S, Sakharkar K R, Lim C S and Sakharkar M K 2009 Activity of Chitosans in combination with antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* *Int. J. Biol. Sci.* **5** 153–60
- [101] Chamundeeswari M, Sobhana S S L, Jacob J P, Kumar M G, Devi M P, Sastry T P and Mandal A B 2010 Preparation, characterization and evaluation of a biopolymeric gold nanocomposite with antimicrobial activity *Biotechnol. Appl. Biochem.* **55** 29–35
- [102] Huynh T T N, Padois K, Sonvico F, Rossi A, Zani F, Pirot F, Doury J and Falson F 2010 Characterization of a polyurethane-based controlled release system for local delivery of chlorhexidine diacetate *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **74** 255–64
- [103] Chakraborty S P, Sahu S K, Mahapatra S K, Santra S, Bal M, Roy S and Pramanik P 2010 Nanoconjugated vancomycin: new opportunities for the development of anti-VRSA agents *Nanotechnology* **21** 105103
- [104] Arenas Fernández T, Lucía C, Arango M, Salamanca C H, Consuelo M and Flórez J 2012 Actividad del (2E)-3-(2, 3-dimetoxifenil)-1-(4-metilfenil) prop-2-en-1-ona en presencia del poli(ácido maleico-co-2-vinil-pirrolidona) sobre un aislamiento clínico de *Staphylococcus aureus* productor de  $\beta$ -lactamasas *Iatreia* **25** 12–9
- [105] Cui X, Gu Y, Li L, Wang H, Xie Z, Luo S, Zhou N, Huang W and Rahaman M N 2013 In vitro bioactivity, cytocompatibility, and antibiotic release profile of gentamicin sulfate-loaded borate bioactive glass/chitosan composites *J. Mater. Sci.*

- Mater. Med.* **24** 2391–403
- [106] Krone, Volker; Magerstadt M and Walch, Axel; Groner, Albrecht; Hoffmann D 1994 Pharmacological composition containing polyelectrolyte complexes in microparticulate form and at least one active agent
- [107] Nurkeeva Z S, Khutoryanskiy V V, Mun G A, Sherbakova M V, Ivaschenko A T and Aitkhozhina N A 2004 Polycomplexes of poly(acrylic acid) with streptomycin sulfate and their antibacterial activity *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **57** 245–9
- [108] Pandey R and Khuller G K 2004 Chemotherapeutic potential of alginate-chitosan microspheres as anti-tubercular drug carriers *J. Antimicrob. Chemother.* **53** 635–40
- [109] Yu S H, Mi F L, Wu Y B, Peng C K, Shyu S S and Huang R N 2005 Antibacterial activity of chitosan-alginate sponges incorporating silver sulfadiazine: Effect of ladder-loop transition of interpolyelectrolyte complex and ionic crosslinking on the antibiotic release *J. Appl. Polym. Sci.* **98** 538–49
- [110] Bigucci F, Luppi B, Cerchiara T, Sorrenti M, Bettinetti G, Rodriguez L and Zecchi V 2008 Chitosan/pectin polyelectrolyte complexes: Selection of suitable preparative conditions for colon-specific delivery of vancomycin *Eur. J. Pharm. Sci.* **35** 435–41
- [111] Gómez-Burgaz M, García-Ochoa B and Torrado-Santiago S 2008 Chitosan-carboxymethylcellulose interpolymer complexes for gastric-specific delivery of clarithromycin. *Int. J. Pharm.* **359** 135–43
- [112] Seleem M N, Jain N, Pothayee N, Ranjan A, Riffle J S and Sriranganathan N 2009 Targeting *Brucella melitensis* with polymeric nanoparticles containing streptomycin and doxycycline *FEMS Microbiol. Lett.* **294** 24–31
- [113] Zan X and Su Z 2010 Polyelectrolyte multilayer films containing silver as antibacterial coatings *Thin Solid Films* **518** 5478–82
- [114] Moskowitz J S, Blaisse M R, Samuel R E, Hsu H-P, Harris M B, Martin S D, Lee J C, Spector M and Hammond P T 2010 The effectiveness of the controlled release of gentamicin from polyelectrolyte multilayers in the treatment of *Staphylococcus aureus* infection in a rabbit bone model *Biomaterials* **31** 6019–30
- [115] Marineli D M, Frattini A, Luque A ; G, Biasoli ;, Olivieri A C and Leonardi D *Films based on Chitosan/Carbopol Polyelectrolyte Complex containing econazole nitrate for the treatment of cutaneous candidiasis*
- [116] Ranjan A, Pothayee N, Seleem M, Jain N, Sriranganathan N, Riffle J S and Kasimanickam R 2010 Drug delivery using novel nanoplexes against a salmonella mouse infection model *J. Nanoparticle Res.* **12** 905–14
- [117] Olivera, María; Giacobbe, Laura Luciani; Ramírez Rigo, María; Romáñuk C 2011 Desarrollo de nuevos sistemas de liberación modificada y administración oral para el tratamiento de la tuberculosis *Rev Argent Salud Pública* **2** 11
- [118] Arora S, Gupta S, Narang R K and Budhiraja R D 2011 Amoxicillin loaded chitosan-alginate polyelectrolyte complex nanoparticles as mucopenetrating delivery system for *H. pylori* *Sci. Pharm.* **79** 673–94
- [119] Romero V L, Pons P, Bocco J L, Manzo R H and Alovero F L 2012 Eudragit E100® potentiates the bactericidal action of ofloxacin against fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa* *FEMS Microbiol. Lett.* **334** 102–10
- [120] Cheow W S and Hadinoto K 2012 Green preparation of antibiotic nanoparticle complex as potential anti-biofilm therapeutics via self-assembly amphiphile-polyelectrolyte complexation with dextran sulfate *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **92** 55–63
- [121] Barajas S J 2014 *Evaluación del efecto antimicrobiano producido por el polímero anfifílico PAM -18 Na asociado a ampicilina en cepas de Staphylococcus aureus.*

- (Universidad ICESI)
- [122] Doñate Ureña N 2015 *Aplicación de recubrimientos antibacterianos y antibiopelícula sobre las lentes de contacto terapéuticas* (Universitat Politècnica de Catalunya)
- [123] Bajpai S K, Jyotishi P and Bajpai M 2016 Synthesis of nanosilver loaded chitosan / poly ( acrylamide-co-itaconic acid ) based inter-polyelectrolyte complex films for antimicrobial applications *Carbohydr. Polym.* **154** 223–30
- [124] Angulo Nieva D C 2016 *Determinación del efecto antimicrobiano producido por el complejo ampicilina-sal sódica del poli (ácido maleico-alt-isobutileno) PAM-4Na sobre diferentes cepas de Staphylococcus aureus* (Universidad ICESI)
- [125] Dutta P K, Tripathi S, Mehrotra G K and Dutta J 2009 Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications *Food Chem.* **114** 1173–82
- [126] Dobias J, Chudackova K, Voldrich M and Marek M 2000 Properties of polyethylene films with incorporated benzoic anhydride and/or ethyl and propyl esters of 4-hydroxybenzoic acid and their suitability for food packaging *Food Addit Contam* **17** 1047–53
- [127] Jin T and Zhang H 2008 Biodegradable polylactic acid polymer with nisin for use in antimicrobial food packaging *J. Food Sci.* **73**
- [128] Rico Peña D C and Torres J A 1991 Sorbic Acid and Potassium Sorbate Permeability of an Edible Methylcellulose-Palmitic Acid Film: Water Activity and pH Effects *J. Food Sci.* **56** 497–9
- [129] Chen M-J and Weng Y-M 1999 Edible coating as preservative carriers to inhibit yeast on taiwanese-style fruit preserves. **19** 89–96
- [130] Chen M-C, Yeh G H-C and Chiang B-H 1996 Antimicrobial and Physicochemical Properties of Methylcellulose and Chitosan Films Containing a Preservative *J. Food Process. Preserv.* **20** 379–90
- [131] Ouattara B, Simard R E, Piette G, Begin A and Holley R A 2000 Diffusion of Acetic and Propionic Acids from Chitosan-based Antimicrobial Packaging Films *J. Food Sci.* **65** 768–73
- [132] A. Cagri, Z. Ustunol E T R 2001 Antimicrobial, Mechanical, and Moisture Barrier Properties of Low pH Whey Protein-based Edible Films Containing p-Aminobenzoic or Sorbic Acids *J. Food Sci.* **66** 865–70
- [133] Janes M E, Kooshesh S and Johnson M 2002 Control of *Listeria monocytogenes* on the Surface of Refrigerated , Ready-to-eat Chicken Coated with Edible Zein Film Coatings Containing Nisin and / or Calcium Propionate *J. Food Sci.* **67** 0–3
- [134] Dawson P L, Carl G D, Acton J C and Han I Y 2002 Effect of lauric acid and nisin-impregnated soy-based films on the growth of *Listeria monocytogenes* on turkey bologna. *Poult. Sci.* **81** 721–6
- [135] Pranoto Y, Rakshit S K and Salokhe V M 2005 Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin *LWT - Food Sci. Technol.* **38** 859–65
- [136] Váscquez M B, Flores S K, Campos C A, Alvarado J and Gerschenson L N 2009 Antimicrobial activity and physical properties of chitosan-tapioca starch based edible films and coatings *Food Res. Int.* **42** 762–9
- [137] Salleh E, Muhamad I and Khairuddin N 2009 Structural characterization and physical properties of antimicrobial (AM) starch-based films *World Acad. Sci. ...* **3** 428–36
- [138] Guillard V, Issouppov V, Redl A and Gontard N 2009 Food preservative content

- reduction by controlling sorbic acid release from a superficial coating *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **10** 108–15
- [139] Desai, Suketu; Nelms D 1997 Preserved ophthalmic drug compositions containing polymeric quaternary ammonium compounds **US 5603929**
- [140] Jimenez-Kairuz A, Allemandi D A and Manzo R H 2003 Equilibrium properties and mechanism of kinetic release of metoclopramide from carbomer hydrogels *Int. J. Pharm.* **250** 129–36
- [141] Arduzzo M S, Manzo R H and Jimenez-Kairuz a. F 2010 Comparative study of three structurally related acid polyelectrolytes as carriers of basic drugs: Carbomer, Eudragit L-100 and S-100 *Supramol. Chem.* **22** 289–96
- [142] Baena A. Y, Manzo R H and Ponce D'Leon Q. L F 2011 Preparation and physicochemical characterization of some polyelectrolyte-diclofenac complexes *Vitae* **18** 305–11
- [143] Zoppi A, Linck Y G, Monti G A, Genovese D B, Jimenez Kairuz Á F, Manzo R H and Longhi M R 2012 Studies of pilocarpine: Carbomer intermolecular interactions *Int. J. Pharm.* **427** 252–9
- [144] Ramírez-Rigo M V., Olivera M E, Rubio M and Manzo R H 2014 Enhanced intestinal permeability and oral bioavailability of enalapril maleate upon complexation with the cationic polymethacrylate Eudragit E100 *Eur. J. Pharm. Sci.* **55** 1–11
- [145] Salamanca C H, Castillo D F, Villada J D and Rivera G R 2017 Physicochemical characterization of in situ drug-polymer nanocomplex formed between zwitterionic drug and ionomeric material in aqueous solution *Mater. Sci. Eng. C* **72** 405–14
- [146] Adarme T C and Rincones M P 2008 *Evaluación de cuatro antimicrobianos para el control de levaduras contaminantes de un proceso de fermentación de ácido cítrico* (Pontificia Universidad Javeriana)
- [147] Levinskaite L 2012 Susceptibility of food-contaminating Penicillium genus fungi to some preservatives and disinfectants *Ann. Agric. Environ. Med.* **19** 85–9
- [148] Wen L, Haddad M, Fernandez I, Espinoza G, Ruiz C, Neyra E, Bustamante B and Rojas R 2011 Actividad antifúngica de cuatro plantas usadas en la medicina tradicional Peruana. *Rev. la Soc. Química del Perú* **77** 199–204
- [149] Duque Betancur N 2008 *Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de Miconia caudata, Miconia sp, Clidemia hirta y Hamelia patens; frente a los hongos Aspergillus niger y Candida albicans* (Universidad Tecnológica de Pereira)
- [150] Huamaní Achata M H and ; Ruiz Quiroz J R 2005 *Determinación de la actividad antifúngica contra Candida albicans y Aspergillus niger de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú.* (Universidad Nacional Mayor de San Marcos)
- [151] Tequida-meneses M, Cortez-rocha M, Rosas- E C and Corrales-maldonado S L C 2002 Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de Aspergillus flavus , Aspergillus niger , Penicillium Fusarium moniliforme y Fusarium poae *Rev. Iberoam. Micol.* **01** 84–8
- [152] Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J and Perez-Álvarez J 2008 Antibacterial activity of lemon (Citrus lemon L.), mandarin (Citrus reticulata L.), grapefruit (Citrus paradisi L.) and orange (Citrus sinensis L.) essential oils *J. Food Saf.* **28** 567–76
- [153] Raju H, Nagamani T S, Chandrappa S, Ananda H, Vinaya K, Thimmegowda N R, Byregowda S M and Rangappa K S 2010 Synthesis of 1-(4-methoxybenzyl)-3-cyclopropyl-1H-pyrazol-5-amine derivatives as antimicrobial agents. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **25** 537–43

- [154] Olivera M E, Manzo R H, Alovero F and Alvaro F 2017 Polyelectrolyte-drug ionic complexes as nanostructured drug carriers to design solid and liquid oral delivery systems *Nanostructures for Oral Medicine* ed E Andronesco and A Grumezescu (Amsterdam: Elsevier) pp 365–408
- [155] Alarcón L P, Baena Y and Manzo R H 2017 Interaction between DNA and drugs having protonable basic groups: Characterization through affinity constants, drug release kinetics, and conformational changes *Sci. Pharm.* **85**
- [156] Baena Y, Dallos L J, Manzo R H and Ponce D 'león L F 2011 Estandarización de celdas de Franz para la realización de ensayos de liberación de fármacos a partir de complejos con polielectrolitos *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm* **40** 174–88
- [157] Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare of the Council of Europe 2002 *European Pharmacopoeia* ed Council of Europe (Strasbourg, France)
- [158] Battistini F D, Flores-Martin J, Olivera M E, Genti-Raimondi S and Manzo R H 2014 Hyaluronan as drug carrier. the in vitro efficacy and selectivity of Hyaluronan-Doxorubicin complexes to affect the viability of overexpressing CD44 receptor cells *Eur. J. Pharm. Sci.* **65** 122–9
- [159] Saderra Jorba L 1993 *El secreto de la calidad japonesa : el diseño de experimentos clásico, Taguchi y Shainin* (Barcelona: Marcombo)
- [160] Merck 2017 Ficha de datos de seguridad de Acetona 1–34
- [161] Merck 2016 *Ficha de datos de seguridad de Etanol 96%*
- [162] Lin S Y, Yu H L and Li M J 1999 Formation of six-membered cyclic anhydrides by thermally induced intramolecular ester condensation in Eudragit E film *Polymer (Guildf)*. **40** 3589–93
- [163] Juppo A M, Boissier C and Khoo C 2003 Evaluation of solid dispersion particles prepared with SEDS *Int. J. Pharm.* **250** 385–401
- [164] Villada J D 2015 *Obtención y caracterización estructural por FTIR de los materiales ionoméricos clorhidrato, acetato y formiato de Eudragit E-100 con diferentes grados de ionización.* (Universidad ICESI)
- [165] Hayashi S and Umemura J 1974 Disappearances of COOH infrared bands of benzoic acid *J. Chem. Phys.* **60** 2630–3
- [166] Hayashi, Soichi; Kimura N C 1966 Infrared Spectra and Molecular Configuration of Benzoic Acid (Special Issue on Physical Chemistry) *Bull. Inst. Chem. Res. - Kyoto Univ.* **44** 335–40
- [167] Yariv S, Russell J D and Farmer V C 1966 Infrared Study of the Adsorption of Benzoic Acid and Nitrobenzene in Montmorillonite *Isr. J. Chem.* **4** 201–13
- [168] The United States Pharmacopeial-Convention 2007 *Farmacopea de los Estados Unidos de América, USP NF 2007.* vol 1 (Baltimore)
- [169] Malvern Instruments 2009 *Zetasizer Nano User Manual* ed Malvern Instruments Ltd (Malvern, Worcestershire)
- [170] Yamamura S and Momose Y 2003 Characterization of monoclinic crystals in tablets by pattern-fitting procedure using X-ray powder diffraction data *Int. J. Pharm.* **259** 27–37
- [171] Pons Siepermann C A, Huang S and Myerson A S 2017 Nucleation Inhibition of Benzoic Acid through Solution Complexation *Cryst. Growth Des.* **17** 2646–53
- [172] Ogata S, Tagaya H, Karasu M and Kadokawa J 2000 New preparation method for organic–inorganic layered compounds by organo derivatization reaction of Zn(OH)<sub>2</sub> with carboxylic acids *J. Mater. Chem.* **10** 321–7
- [173] Heiden S, Tröbs L, Wenzel K-J and Emmerling F 2012 Mechanochemical

- synthesis and structural characterisation of a theophylline-benzoic acid cocrystal (1 : 1) *CrystEngComm* **14** 5128
- [174] Maruyama S A, Lisboa S, Pereira L and Wypych F 2012 Alkaline earth layered benzoates as reusable heterogeneous catalysts for the methyl esterification of benzoic acid *Quim Nov.* **35** 1510–6
- [175] Valizadeh H, Nokhodchi A, Qarakhani N, Zakeri-Milani P, Azarmi S, Hassanzadeh D and Löbenberg R 2004 Physicochemical Characterization of Solid Dispersions of Indomethacin with PEG 6000, Myrj 52, Lactose, Sorbitol, Dextrin, and Eudragit® E100 *Drug Dev. Ind. Pharm.* **30** 303–17
- [176] Aitken-nichol C, Zhang F and McGinity J W 1996 Hot melt extrusion of acrylic films *Pharm. Res.* **13** 804–8
- [177] Pradhan R, Kim S Y, Yong C S and Kim J O 2016 Preparation and characterization of spray-dried valsartan-loaded Eudragit®E PO solid dispersion microparticles *Asian J. Pharm. Sci.* **11** 744–50
- [178] He H, Yang R and Tang X 2010 In vitro and in vivo evaluation of fenofibrate solid dispersion prepared by hot-melt extrusion *Drug Dev. Ind. Pharm.* **36** 681–7
- [179] Jung J Y, Yoo S D, Lee S H, Kim K H, Yoon D S and Lee K H 1999 Enhanced solubility and dissolution rate of itraconazole by a solid dispersion technique *Int. J. Pharm.* **187** 209–18
- [180] Six K, Leuner C, Dressman J, Verreck G, Peeters J, Blaton N, Augustijns P, Kinget R and Van den Mooter G 2002 Thermal properties of hot-stage extrudates of itraconazole and eudragit E100. Phase separation and polymorphism *J. Therm. Anal. Calorim.* **68** 591–601
- [181] Moneghini M, Carcano A, Zingone G and Perissutti B 1998 Studies in dissolution enhancement of atenolol. Part I *Int. J. Pharm.* **175** 177–83
- [182] Li J, Lee I W, Shin G H, Chen X and Park H J 2015 Curcumin-Eudragit® e PO solid dispersion: A simple and potent method to solve the problems of curcumin *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **94** 322–32
- [183] Winter K and Barton D 1969 The thermal decomposition of benzoic acid
- [184] Parker M J 2000 5.09 - Test Methods for Physical Properties *Comprehensive Composite Materials, Volume 5* (Elsevier) pp 183–226
- [185] ASTM International 2008 ASTM E1356 Standard Test Method for Assignment of the Glass Transition Temperatures by Differential Scanning Calorimetry *ASTM Int.* **08** 1–4
- [186] Seyler R J 1994 *Assignment of the glass transition temperature*
- [187] Amelian A and Winnicka K 2017 Polymers in pharmaceutical taste masking applications *Polimery* **6**
- [188] Quinteros D A, Manzo R H and Allemandi D A 2010 Design of a colonic delivery system based on - cationic - complexes *Drug Deliv.* **17** 208–13
- [189] Palena M C, García M C, Manzo R H and Jimenez-Kairuz A F 2015 Self-organized drug-interpolyelectrolyte nanocomplexes loaded with anionic drugs. Characterization and in vitro release evaluation *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **30** 45–53
- [190] Lee H -K, Hajdu J and McGoff P 1991 Propranolol:methacrylic acid copolymer binding interaction *J. Pharm. Sci.* **80** 178–80
- [191] Qi S, Gryczke A, Belton P and Craig D Q M 2008 Characterisation of solid dispersions of paracetamol and EUDRAGIT® E prepared by hot-melt extrusion using thermal, microthermal and spectroscopic analysis *Int. J. Pharm.* **354** 158–67
- [192] Jenquin M R, Liebowitz S M, Sarabia R E and McGinity J W 1989 Physical and

- chemical factors influencing the release of drugs from acrylic resin films. *J. Pharm. Sci.* **79** 811–6
- [193] Wu C and McGinity J W 1999 Non-traditional plasticization of polymeric films *Int. J. Pharm.* **177** 15–27
- [194] Repka M A, Gerding T G, Repka S L and McGinity J W 1999 Influence of plasticizers and drugs on the physico-mechanical properties of hydroxypropylcellulose films prepared by hot melt extrusion. *Drug Dev. Indust. Pharm.* **25** 625–33
- [195] Zhang J, Bunker M, Parker A, Madden-Smith C E, Patel N and Roberts C J 2011 The stability of solid dispersions of felodipine in polyvinylpyrrolidone characterized by nanothermal analysis *Int. J. Pharm.* **414** 210–7
- [196] Tong P, Taylor L S and Zografi G 2002 Influence of alkali metal counterions on the glass transition temperature of amorphous indomethacin salts *Pharm. Res.* **19** 649–54
- [197] Lin S Y, Cheng W T, Wei Y S and Lin H L 2011 DSC-FTIR microspectroscopy used to investigate the heat-induced intramolecular cyclic anhydride formation between Eudragit e and PVA copolymer *Polym. J.* **43** 577–80
- [198] Sinko P J 2011 *Martin's Physical Pharmacy And Pharmaceutical Sciences. Physical Chemical and Biopharmaceutical Principles in the Pharmaceutical Sciences* ed P J Sinko (New Jersey)
- [199] Tao J, Sun Y, Zhang G G Z and Yu L 2009 Solubility of small-molecule crystals in polymers: D-Mannitol in PVP, indomethacin in PVP/VA, and nifedipine in PVP/VA *Pharm. Res.* **26** 855–64
- [200] Oguchi T, Matsumoto K, Yonemochi E, Nakai Y and Yamamoto K 1995 Dissolution studies in organic solvents for evaluating hydrogen-bond matrix of cellulose in the ground mixture *Int. J. Pharm.* **113** 97–102
- [201] Aceves J M, Cruz R and Hernandez E 2000 Preparation and characterization of Furosemide-Eudragit controlled release systems *Int. J. Pharm.* **195** 45–53
- [202] Jimenez-kairuz A, Allemandi D and Manzo R H 2002 Mechanism of Lidocaine Release From Carbomer ± Lidocaine Hydrogels *J. Pharm. Sci.* **91** 267–72
- [203] Quinteros D A, Manzo R H and Allemandi D A 2011 Interaction between Eudragit® E100 and anionic drugs: Addition of anionic polyelectrolytes and their influence on drug release performance *J. Pharm. Sci.* **100** 4664–73
- [204] Kindermann C, Matthée K, Strohmeyer J, Sievert F and Breitzkreutz J 2011 Tailor-made release triggering from hot-melt extruded complexes of basic polyelectrolyte and poorly water-soluble drugs *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **79** 372–81
- [205] Kislalioglu M S, Khan M A, Blount C, Goettsch R W and Bolton S 1991 Physical characterization and dissolution properties of ibuprofen: Eudragit coprecipitates *J. Pharm. Sci.* **80** 799–804
- [206] H. Suzuki, N. Miyamoto, T. Masada, E. Hayakawa K I 1996 Solid dispersions of benidipine hydrochloride. I. Preparations using different solvent systems and dissolution properties *Cehm. Pharm. Bull.* **44** 364–71
- [207] Orienti I, Bigucci F, Gentilomi G and Zecchi V 2001 Self-assembling poly(vinyl alcohol) derivatives, interactions with drugs and control of release *J. Pharm. Sci.* **90** 1435–44
- [208] Orienti I, Zuccari G, Carosio R and G. Montaldo P 2009 Improvement of aqueous solubility of fenretinide and other hydrophobic anti-tumor drugs by complexation with amphiphilic dextrans *Drug Deliv.* **16** 389–98

- [209] Qian F, Huang J and Hussain M A 2010 Drug–Polymer Solubility and Miscibility: Stability Consideration and Practical Challenges in Amorphous Solid Dispersion Development *J. Pharm. Sci.* **99** 2941–7
- [210] Cheow W S and Hadinoto K 2012 Self-assembled amorphous drug-polyelectrolyte nanoparticle complex with enhanced dissolution rate and saturation solubility *J. Colloid Interface Sci.* **367** 518–26
- [211] Moustafine R I, Salachova A R, Frolova E S, Kemenova V A and Van Den Mooter G 2009 Interpolyelectrolyte complexes of Eudragit® E PO with sodium alginate as potential carriers for colonic drug delivery: Monitoring of structural transformation and composition changes during swellability and release evaluating *Drug Dev. Ind. Pharm.* **35** 1439–51
- [212] Quinteros D A, Allemandi D A and Manzo R H 2012 Equilibrium and release properties of aqueous dispersions of non-steroidal anti-inflammatory drugs complexed with polyelectrolyte eudragit E 100 *Sci. Pharm.* **80** 487–96
- [213] Alarcón Ramirez L P 2017 *Estudio de la Interacción entre los Grupos Fosfato del Ácido Desoxirribonucleico y Fármacos modelo que poseen Grupos Básicos* (Universidad Nacional de Córdoba)
- [214] Leuner C and Dressman J 2000 Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **50** 47–60
- [215] Jimenez Kairuz A F 2004 *Investigación y desarrollo de nuevos materiales con potencial uso en tecnología farmacéutica para diseño de sistemas terapéuticos.* (Universidad Nacional de Córdoba)
- [216] Higuchi T and Kuramoto R 1954 Study of possible complex formation between macromolecules and certain pharmaceuticals. I. Polyvinylpyrrolidone with sulfathiazole, procaine hydrochloride, sodium salicylate, benzyl penicillin, chloramphenicol, mandelic acid, caffeine, theophylline, and c *J. Am. Pharm. Assoc. (Scientific ed.)* **43** 393–7
- [217] Plaizier-Vercammen J A and De Neve R E 1982 Interaction of povidone with aromatic compounds III: Thermodynamics of the binding equilibria and interaction forces in buffer solutions at varying pH values and varying dielectric constant *J. Pharm. Sci.* **71** 552–6
- [218] Ramírez Rigo M V, Allemandi D A and Manzo R H 2004 A Linear Free Energy Relationship Treatment of the Affinity between Carboxymethylcellulose and Basic Drugs *Mol. Pharm.* **1** 383–6
- [219] Battistini F D, Olivera M E and Manzo R H 2013 Equilibrium and release properties of hyaluronic acid-drug complexes *Eur. J. Pharm. Sci.* **49** 588–94
- [220] Guzman M L, Soria E A, Laino C, Manzo R H and Olivera M E 2016 Reduced food interaction and enhanced gastrointestinal tolerability of a new system based on risedronate complexed with Eudragit E100: Mechanistic approaches from in vitro and in vivo studies *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **107** 263–72
- [221] Zhang F 2016 Physicochemical properties and mechanisms of drug release from melt-extruded granules consisting of chlorpheniramine maleate and Eudragit FS *Drug Dev. Ind. Pharm.* **42** 563–71
- [222] Palena M C, Arduzzo M S, Manzo R H and Jimenez-kairuz A F 2010 Polyelectrolytes as Drug Carriers . Analysis by Dynamic Light Scattering of Reconstituted and in-situ Prepared Model Polymethacrylate-Drug Aqueous Dispersions *Open Nanosci J* 1–7
- [223] Porasso R D, Benegas J C, T. van den Hoop M a. G, Paoletti S, van den Hoop M A G T and Paoletti S 2001 Chemical bonding of divalent counterions to linear

- polyelectrolytes: Theoretical treatment within the counterion condensation theory *Phys. Chem. Chem. Phys.* **3** 1057–62
- [224] Banegas J C, Paoletti S and Van den Hoop M 1999 Affinity interactions in counterion-polyelectrolyte systems: competition between different counterions *Macromol. theory simulations* **8** 61–4
- [225] Dautzenberg H and Rother G 2004 Response of Polyelectrolyte Complexes to Subsequent Addition of Sodium Chloride: Time-Dependent Static Light Scattering Studies *Macromol. Chem. Phys.* **205** 114–21
- [226] Palena M C, Manzo R H and Jimenez-Kairuz A F 2012 Self-organized nanoparticles based on drug-interpolyelectrolyte complexes as drug carriers *J. Nanoparticle Res.* **14**
- [227] Dautzenberg H and Kriz J 2003 Response of polyelectrolyte complexes to subsequent addition of salts with different cations *Langmuir* **19** 5204–11
- [228] Dautzenberg H and Jaeger W 2002 Effect of charge density on the formation and salt stability of polyelectrolyte complexes *Macromol. Chem. Phys.* **203** 2095–102
- [229] Antila H S and Sammalkorpi M 2014 Polyelectrolyte decomplexation via addition of salt: Charge correlation driven zipper *J. Phys. Chem. B* **118** 3226–34
- [230] Rusu-Balaita L, Desbrières J and Rinaudo M 2003 Formation of a biocompatible polyelectrolyte complex: Chitosan-hyaluronan complex stability *Polym. Bull.* **50** 91–8
- [231] Baena Aristizábal Y 2011 *Estudio fisicoquímico de la liberación del diclofenac a partir de complejos polielectrolito-fármaco* (Universidad Nacional de Colombia)
- [232] ASTM International 2018 *E2865-12. Standard Guide for “Measurement of Electrophoretic Mobility and Zeta Potential of Nanosized Biological Materials”*
- [233] Delgado A V., González-Caballero F, Hunter R J, Koopal L K and Lyklema J 2007 Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena *J. Colloid Interface Sci.* **309** 194–224
- [234] Ohshima H 2006 Electrophoresis of soft particles: Analytic approximations *Electrophoresis* **27** 526–33
- [235] Ohshima H 2002 Chapter 5, Electrophoresis of Charged particles and Drops. *Interfacial electrokinetics and electrophoresis* (Marcel Dekker, Inc) pp 137–40
- [236] Ohshima H 1995 Electrophoretic mobility of soft particles. *Colloids Surfaces A.* **103** 249–55
- [237] Ohshima H 2006 Chapter 3 Diffuse double layer equations for use in surface complexation models: approximations and limits *Interface Science and Technology* vol 11 (Elsevier Ltd) pp 67–87
- [238] Fujita H H J . 1955 Conductivity of polyelectrolyte solutions when extraneous salt is present *Koninkl. Ned. Akad. Wet. Proc* **B58** 182
- [239] Overbeek, J.Th.G; Stigter D 1956 Electrophoresis of polyelectrolytes with partial drainage. *Recueil* **75** 543–54
- [240] Debye P and Bueche A M 1948 Intrinsic viscosity, diffusion, and sedimentation rate of polymers in solution *J. Chem. Phys.* **16** 573–9
- [241] Fitzgerald E B and Fuoss R M 1954 Polyelectrolytes XI. Electrophoresis in Solutions of poly-4-Vinyl-N-N-butylpyridinium bromide *J. Polym. Sci.* **14** 329–39
- [242] Noda I, Nagasawa M and [UNK]Ota M 1964 Electrophoresis of a Polyelectrolyte in Solutions of High Ionic Strength *J. Am. Chem. Soc.* **86** 5075–9
- [243] De Keizer, A; Van der Drift, W.P.J.T; Overbeek J T . 1975 Electrophoresis of randomly oriented cylindrical particles *Biophys. Chem.* **3** 107–8

- [244] Schellman J A and Stigter D 1977 Electrical double layer, zeta potential, and electrophoretic charge of double-stranded DNA *Biopolymers* **16** 1415–34
- [245] Terajima K, Takahashi T and Nagasawa M 1976 Determination of the Charge Density Distribution of Polyelectrolytes by Electrophoresis *Polym. J.* **8** 449–55
- [246] Van Der Drift W P J ., De Keizer A and Overbeek J T . 1979 Electrophoretic mobility of a cylinder with high surface charge density *J. Colloid Interface Sci.* **71** 67–78
- [247] Burke S E and Barrett C J 2003 Acid - Base Equilibria of Weak Polyelectrolytes in Multilayer Thin Films *Langmuir* **19** 3297–303
- [248] Palacio Ramirez M del M and Reyes Muriel I 2017 *Caracterización fisicoquímica de la sal sódica y potásica del poli (ácido-maleico-alt-octadeceno) con diferentes porcentajes de ionización en medio acuoso.* (Universidad ICESI)
- [249] Palacio Posada M A 2017 *Caracterización Fisicoquímica De Materiales Ionoméricos Clorhidrato, Formiato Y Acetato De Eudragit E-100 Con Diferentes Grados De Ionización En Medio Acuoso* (Universidad ICESI)
- [250] Franz T J 1978 The finite dose technique as a valid in vitro model for the study of percutaneous absorption in man *Curr. Probl. Dermatol.* **7** 58–68
- [251] Bruschi M L 2015 5. Mathematical models of drug release *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems* (Woodhead Publishing) pp 63–86
- [252] Orienti I, Aiedeh K, Gianasi E, Ponti C and Zecchi V 1996 Chitosan-indomethacin conjugates. Effect of different substituents on the polysaccharide molecule on drug release *Arch. Pharm. (Weinheim).* **329** 245–50
- [253] García M C, Cuggino J C, Rosset C I, Páez P L, Strumia M C, Manzo R H, Alovero F L, Alvarez Igarzabal C I and Jimenez-Kairuz A F 2016 A novel gel based on an ionic complex from a dendronized polymer and ciprofloxacin: Evaluation of its use for controlled topical drug release *Mater. Sci. Eng. C* **69** 236–46
- [254] Hugo W B 1999 Historical Introduction *Russell, Hugo and Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization* (Oxford, UK: Wiley-Blackwell) pp 1–4
- [255] Hernández Á 2006 *Aportaciones al estudio de la actividad antimicrobiana de los antisépticos y desinfectantes* (Universitat Autònoma De Barcelona)
- [256] McGinnis, M R; Rinaldi M G 1996 Antifungal drugs: mechanisms of action, drug resistance, susceptibility testing, and assays of activity in biological fluids *Antibiotics in laboratory medicine* (Baltimore: Williams & Wilkins) pp 176–211
- [257] Pfaller M A, Rinaldi M G, Galgiani J N, Bartlett M S, Body B A, Espinel-Ingroff A, Fromtling R A, Hall G S, Hughes C E, Odds F C and al. et 1990 Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34** 1648–54
- [258] Prats Pastor G 2006 *Microbiología clínica* (Bueno aires: Editorial Médica Panamericana)
- [259] Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación 2008 *NTC 5593: Antisépticos y desinfectantes químicos. Conservación de las cepas microbianas utilizadas para la determinación de la actividad bactericida y fungicida* (Bogotá)
- [260] Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación 2010 *NTC 5816: Antisépticos y desinfectantes químicos ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad fungicida o levuricida básica de los antisépticos y desinfectantes químicos. Método de ensayo y requisitos (fase 1)* (Bogotá)
- [261] Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación 2007 *NTC 5540: Antisépticos y desinfectantes químicos. Ensayo cuantitativo de suspensión para la*

- evaluación de la actividad fungicida de los desinfectantes químicos para instrumental utilizado en el sector salud. Metodo de ensayo y requisitos (fase 2, etapa 1)* (Bogotá)
- [262] Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación 2010 NTC 5817: *Antisépticos y desinfectantes químicos. Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad fungicida o levuricida de los antisépticos y desinfectantes químicos utilizados en el área alimentaria, industrial, doméstica e instituc* (Bogotá)
- [263] Alexander B, Procop G, Dufresne P, Fuller J and Ghannoum M 2017 M27 Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts *Clin. Lab. Stand. Inst. 4 th Editi* 1–25
- [264] Alexander B, Procop G, Dufresne P, Espinel-Ingroff A and Fuller J 2017 M38 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi *Clin. Lab. Stand. Inst. 3rd Editio*
- [265] Fernandez Andreu C, Gonzalez Miranda M, Illnait Zaragozi M T and Martínez Machín G 1998 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de anfotericina B en levaduras de interés médico *Rev. Cuba. Med. Trop.* **50** 48–53
- [266] Moreno J 2011 *Actividad antifúngica de los extractos vegetales de Piper eriopodon y Zanthoxylum monophyllum y sus metabolitos secundarios mayoritarios sobre dos hongos fitopatógenos de clavel (Dianthus caryophyllus)* (Universidad Nacional de Colombia)
- [267] Ruiz J and Roque M 2009 Actividad antimicrobiana de cuatro plantas del nor-Oriente Peruano *Cienc. e Investig. Fac. Farm. y Bioquímica UNMSM* **12** 41–7
- [268] Londoño Orozco A, Penieres Carrillo J G, Garcia Tovar C G, Liborio C, Quintero Mora M L, Garcia Vazquez S E and Mendoza Saverda M A 2008 Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja *Apis mellifera* proveniente del estado de México *Tecnol. en Marcha* **21** 49–55
- [269] Tapia C 2009 Actualización en Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana *Rev Chil. Infectol* **26** 144–50
- [270] Hernandez Lauzardo, Ana Niurka; Hernandez Martinez, Maricruz; Velasquez del Valle, Miguel Gerardo; Guerra Sanchez, María Guadalupe; Melo Giorgana G E 2007 Actividad Antifúngica del Quitosano en el Control de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb. : Fr) Vuill. y *Mucor* spp *Rev. Mex. Fitopatol.* **25** 109–13
- [271] Pore R S. 1990 Antibiotic susceptibility testing of *Candida albicans* by flow cytometry. *Curr Microbiol.* **20** 323–328.
- [272] Pore R S 1994 Antibiotic susceptibility testing by flow cytometry. *J. Antimicrob. Chemother.* **34** 613–27
- [273] Merz W G, Fay D, Thumar B and Dixon D 1984 Susceptibility testing of filamentous fungi to amphotericin B by a rapid radiometric method. *J. Clin. Microbiol.* **19** 54–6
- [274] Lundov M D, Moesby L, Zachariae C and Johansen J D 2009 Contamination versus preservation of cosmetics: a review on legislation, usage, infections, and contact allergy *Contact Dermatitis* **60** 70–8
- [275] Smart R and Spooner D F 1972 Microbiological spoilage in pharmaceuticals and cosmetics *J. Soc. Cosmet. Chem. Soc. Cosmet. Chem. Gt. Britain* **23** 721–37
- [276] Kamil O H and Lupuliasa D 2011 Modern aspects regarding the microbial spoilage of pharmaceutical products *Farmacia* **59** 133–46
- [277] Del M, La C D E, Ullán C, Pilar M, M<sup>a</sup> P Y and Mosso A 2000 Calidad

- microbiológica del aire de una zona limpia en una industria farmacéutica *Anal. Real Acad. Farm.* **66** 1–17
- [278] Obuekwe I F and Eichie F 2006 The presence of microorganisms in some common excipients used in tablet formulation *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.* **63** 121–5
- [279] Kadosh D 2017 Morphogenesis in *C. albicans* *Candida albicans: Cellular and Molecular Biology* ed R Prasad (Haryana, India: Springer International Publishing) pp 41–62
- [280] Wilson D 2019 *Candida albicans* *Trends Microbiol.* **27** 188–9
- [281] Mayer F L, Wilson D and Hube B 2013 *Candida albicans* pathogenicity mechanisms *Virulence* **4** 119–28
- [282] Dowd F J 2014 *Candida Albicans Infections Ref. Modul. Biomed. Sci.*
- [283] Baron N C, Costa N T A, Mochi D A and Rigobelo E C 2018 First report of *Aspergillus sydowii* and *Aspergillus brasiliensis* as phosphorus solubilizers in maize *Ann. Microbiol.* **68** 863–70
- [284] Varga J, Kocsube S, Toth B, Frisvad J C, Perrone G, Susca A, Meijer M and Samson R A 2007 *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriolate black *Aspergillus* species with world-wide distribution *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57** 1925–32
- [285] Hamzah N, Singhal N, Padhye L and Swift S 2018 Effect of surfactants on *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 physicochemical properties *J. Environ. Chem. Eng.* **6** 3392–8
- [286] Velasco-Alvarez N, Gutiérrez-Rojas M and González I 2017 Alterations in *Aspergillus brasiliensis* (niger) ATCC 9642 membranes associated to metabolism modifications during application of low-intensity electric current *Bioelectrochemistry* **118** 1–7
- [287] Houbraken J, Frisvad J C and Samson' R A 2011 Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens* *IMA Fungus* **2** 87–95
- [288] Jami M-S, Martín J-F, Barreiro C, Domínguez-Santos R, Vasco-Cárdenas M-F, Pascual M and García-Estrada C 2018 Catabolism of phenylacetic acid in *Penicillium rubens*. Proteome-wide analysis in response to the benzylpenicillin side chain precursor *J. Proteomics* **187** 243–59
- [289] Rodríguez Castro R 2017 *Identificación y caracterización de las enzimas feruloil esterasas PcFaeA y PcFaeB de Penicillium chrysogenum para la valoración de residuos agroindustriales. Escalado y análisis proteómico de la producción de extractos enzimáticos enriquecidos en PcFaeB* (Universidad de León)
- [290] Organización Mundial de la Salud 2005 *Manual de bioseguridad en el laboratorio* ed OMS (Ginebra)
- [291] Gordon M A, Lapa E W and Passero P G 1988 Improved Method for Azole Antifungal Susceptibility Testing *J. Clin. Microbiol.* **26** 1874–7
- [292] Wattier R L and Steinbach W J 2018 Antifungal Agents *Princ. Pract. Pediatr. Infect. Dis.* 1532–1541.e3
- [293] A. Lafi A S, Santhanam J, Khaithir T M N, Musa N F and Huyop F 2018 Determination of Ergosterol as a Potential Biomarker in Pathogenic Medically Important Fungal Isolates *J. Sains Kesihat. Malaysia* **16** 15–21
- [294] Lindquist E and Yang Y 2011 Degradation of benzoic acid and its derivatives in subcritical water *J. Chromatogr. A* **1218** 2146–52
- [295] Cantón Lacasa E, Martín Mazuelos E and Espinel-ingroff A 2004 Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A) *Rev. Iberoam. Micol.* **Enero 2007**

- [296] Eklund T 1985 Inhibition of microbial growth at different pH levels by benzoic and propionic acids and esters of p-hydroxybenzoic acid *Int. J. Food Microbiol.* **2** 159–67
- [297] Stanojevic D, Comic L, Stefanovic O and Solujic-Sukdolak S 2009 Antimicrobial effects of sodium benzoate, sodium nitrite and potassium sorbate and their synergistic action in vitro *Bulg. J. Agric. Sci.* **15** 307–11
- [298] Ostergaard E 1994 Evaluation of the antimicrobial effects of sodium benzoate and dichlorobenzyl alcohol against dental plaque microorganisms. An in vitro study *Acta Odontol. Scand.* **52** 335–45
- [299] Wei Q, Wang X, Cheng J H, Zeng G and Sun D W 2018 Synthesis and antimicrobial activities of novel sorbic and benzoic acid amide derivatives *Food Chem.* **268** 220–32
- [300] Bandelin F J 1958 The effect of pH on the efficiency of various mold inhibiting compounds. *J. Am. Pharm. Assoc.* **47** 691–4
- [301] Huang Y, Wilson M, Chapman B and Hocking A D 2010 Evaluation of the efficacy of four weak acids as antifungal preservatives in low-acid intermediate moisture model food systems *Food Microbiol.* **27** 33–6
- [302] Grube S, Wolfrum U and Langguth P 2008 Characterization of the epithelial permeation enhancing effect of basic butylated methacrylate copolymer-In vitro studies *Biomacromolecules* **9** 1398–405
- [303] Hunter D R and Segel I H 1973 Effect of weak acids on amino acid transport by *Penicillium chrysogenum*: evidence for a proton or charge gradient as the driving force. *J. Bacteriol.* **113** 1184–92
- [304] Gow N A R, Latge J-P and Munro C A 2017 The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function *The Fungal Kingdom* vol 5, ed J Heitman (American Society of Microbiology) pp 267–92
- [305] Houbraken J, de Vries R P and Samson R A 2014 Modern Taxonomy of Biotechnologically Important *Aspergillus* and *Penicillium* Species pp 199–249
- [306] Bowman S M and Free S J 2006 The structure and synthesis of the fungal cell wall *BioEssays* **28** 799–808
- [307] Troy F A and Koffler H 1969 The chemistry and molecular architecture of the cell walls of *Penicillium chrysogenum*. *J. Biol. Chem.* **244** 5563–76
- [308] Hamilton P B and Knight S G 1962 An analysis of the cell walls of *Penicillium chrysogenum* *Arch. Biochem. Biophys.* **99** 282–7
- [309] R Johnston B I 1965 *The Composition of the Cell Wall of Aspergillus niger* (Sturgeon)
- [310] Ruiz-Herrera J, Victoria Elorza M, Valentín E and Sentandreu R 2006 Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity *FEMS Yeast Res.* **6** 14–29
- [311] Ganewatta M S and Tang C 2015 Controlling macromolecular structures towards effective antimicrobial polymers *Polymer (Guildf)*. **63** A1–29
- [312] Arnoldi A and Merlini L 1990 Lipophilicity-antifungal activity relationships for some isoflavonoid phytoalexins *J. Agric. Food Chem* **38** 834–8
- [313] Hsiao C P and Siebert K J 1999 Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria *Int. J. Food Microbiol.* **47** 189–201
- [314] Fitzgerald D J, Stratford M, Gasson M J and Narbad A 2005 Structure–Function Analysis of the Vanillin Molecule and Its Antifungal Properties *J. Agric. Food Chem.* **53** 1769–75

- [315] Yien Ing L, Mohamad Zin N, Sarwar A and Katas H 2012 Antifungal Activity of Chitosan Nanoparticles and Correlation with Their Physical Properties *Int. J. Biomater.* **2012** 1–9
- [316] Pasquet J, Chevalier Y, Bolzinger M-A, Bouvier D, Couval E, Noizet G, Pasquet J and Morlière C 2013 Antimicrobial activity of zinc oxide particles on five micro-organisms of the Challenge Tests related to their physicochemical properties *Int. J. Pharm.* **460** 92–100
- [317] Garriga Trillo A J, Lubin Pigouche P, Merino Merino J M, Recio Saboya P and Suárez Falcón J C 2009 *Introducción al análisis de datos* ed Universidad Nacional de Educación a Distancia (Madrid: Librería UNED)
- [318] Ortega R M, Tuya Pendás L C, Martínez Ortega M, Pérez Abreu A and Cánovas A M 2009 El coeficiente de correlación de los rangos de spearman, Caracterización *Rev. Habanera Ciencias Médicas* **8** 2
- [319] Liu H, Du Y, Wang X and Sun L 2004 Chitosan kills bacteria through cell membrane damage *Int. J. Food Microbiol.* **95** 147–55
- [320] Singh T, Vesentini D, Singh A P and Daniel G 2008 Effect of chitosan on physiological, morphological, and ultrastructural characteristics of wood-degrading fungi *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **62** 116–24