

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación del comportamiento físicoquímico y antimicrobiano de complejos con polielectrolitos

Juan José Carrascal Sanchez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de ciencias, Área Curricular de Farmacia
Bogotá, Colombia
2021

Evaluación del comportamiento fisicoquímico y antimicrobiano de complejos con polielectrolitos

Juan José Carrascal Sanchez

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:

Doctor en Ciencias Farmacéuticas

Directora:

Ph.D., MSc., Química Farmacéutica. Yolima Baena Aristizábal

Profesora Titular

Departamento de Farmacia

Universidad Nacional de Colombia

Codirector:

Ph.D., Químico. León Darío Perez

Profesor Asociado

Departamento de Química

Universidad Nacional de Colombia

Línea de Investigación:

Sistemas conformados por complejos con polielectrolitos

Grupo de Investigación:

SILICOMOBA

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Área Curricular de Farmacia

Bogotá, Colombia

2021

“La ciencia no es perfecta, con frecuencia se utiliza mal, no es más que una herramienta, pero es la mejor herramienta que tenemos: se corrige a sí misma, está siempre evolucionando y se puede aplicar a todo. Con esta herramienta conquistamos lo imposible.”

Carl Sagan

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Juan José Carrascal Sanchez

Fecha 26/11/2021

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional de Colombia y al Departamento de Farmacia, por darme la oportunidad de desarrollarme académicamente. A Colciencias (ahora Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación), por otorgarme la beca de doctorados nacionales 727, que me permitió concluir este proceso.

A la Dra Yolima Baena por su dedicación en la dirección de la tesis, y por ser una excelente amiga con quien se puede contar en todo momento. Al Dr. León Pérez por sus enseñanzas en el laboratorio y sus excelentes explicaciones.

Al Dr. Rodolfo Pinal y a la Dra Teresa Carvajal, por recibirme en el College of Pharmacy of Purdue University, en donde se desarrolló parte de esta investigación.

A la Dra Claudia Parra, por su colaboración para la realización de los ensayos antimicóticos, en la Pontificia Universidad Javeriana.

A mi papá, el Licenciado Osmar Carrascal, por su gran ayuda e interés en mi formación académica. A mi tía Nidia Carrascal, mi tía universal y mi segunda mamá. A mi primo Andrés García, por su apoyo emocional.

A mis compañeros de laboratorio, Lina Sanabria, Leidy Dallos, David Porras, Laura Martínez, Sandra Ojeda, Jors Vargas, Alejandro Güiza y Diana Vásquez por su ayuda y colaboración en todo este proceso.

A mi amigo y colega Marcel Berrio, por hacerme reír y apoyarme en los momentos duros.

De manera especial a Daniela Martínez, por haber estado en los momentos importantes de todo este arduo trabajo.

Resumen

Las interacciones electrostáticas entre un polielectrolito y una molécula ionizable conducen a la formación de un complejo polielectrolítico (CPE), cuyas propiedades fisicoquímicas se diferencian de los materiales de partida. Estas propiedades han sido aprovechadas en el campo farmacéutico y cosmético, con propósitos como la estabilización de moléculas y la mejora de la actividad. El objetivo de este estudio fue caracterizar las propiedades fisicoquímicas y antimicrobianas de CPEs obtenidos entre el Eudragit E100 (Eu) y los ácidos benzoico, salicílico y 4-hidroxibenzoico, con diferentes proporciones estequiométricas de neutralización y producidos mediante extrusión por fusión (HME) y secado por aspersión (SD). Con base en diagramas de fases y un diseño estadístico experimental, se establecieron las condiciones operacionales de las dos metodologías. Las interacciones intermoleculares fueron evidenciadas mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS) y difracción de rayos X en polvo (XRPD). Las propiedades fisicoquímicas temperatura de transición vítrea, desplazamiento químico del N1s, solubilidad cualitativa, pseudo potencial zeta ($F-\zeta$) y el comportamiento de liberación, fueron dependientes de la constitución del CPE y de la metodología de obtención. La actividad antimicrobiana de los CPEs sobre *E.coli*, *S.aureus* y *C.albicans* fue superior en comparación con los materiales de partida, a pH 6.0 y 6.9. La correlación entre el $F-\zeta$ y la actividad antimicrobiana demostró relación directa, independiente del pH y la metodología de obtención. Dicha relación es atribuida a la interacción entre la carga de los CPEs y los componentes de la superficie de la membrana celular, que corresponde al principal mecanismo de acción que fue determinado para estos sistemas. El mayor espectro de acción y su mayor actividad en un rango más amplio de pH, hace que estos complejos puedan ser considerados como una nueva alternativa frente a los preservantes existentes, con aplicación en el campo farmacéutico y cosmético.

Palabras clave: Complejos polielectrolíticos, secado, extrusión, actividad antimicrobiana, preservantes.

Abstract

Evaluation of the physicochemical and antimicrobial behavior of complexes with polyelectrolytes

Electrostatic interactions between a polyelectrolyte and an ionizable molecule led to the formation of a polyelectrolyte complex (PEC), whose physicochemical properties differ from the starting materials. These properties have been applied in the pharmaceutical and cosmetic fields, for purposes such as stabilizing molecules and improving activity. The objective of this study was to characterize the physicochemical and antimicrobial properties of PECs obtained between Eudragit E100 and benzoic, salicylic, and 4-hydroxybenzoic acids, with different stoichiometric proportions of neutralization and produced by hot-melt extrusion (HME) and spray drying (SD). Based on phase diagrams and an experimental statistical design, the operational conditions of the two methodologies were established. Intermolecular interactions were evidenced by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), and X-ray powder diffraction (XRPD). The physicochemical properties, glass transition temperature, N1s chemical shift, qualitative solubility, pseudo zeta potential ($F\text{-}\zeta$), and release behavior were dependent on the constitution of the PEC and the production methodology. The antimicrobial activity of the PECs on *E.coli*, *S.aureus*, and *C.albicans* was superior compared to the starting materials, at pH 6.0 and 6.9. The correlation between $F\text{-}\zeta$ and antimicrobial activity showed a direct relationship, independent of pH and the methodology of obtaining. This relationship is attributed to the interaction between the charge of the PECs and the components of the cell membrane surface, which corresponds to the main mechanism of action that was determined for these systems. The greater spectrum of action and their greater activity in a wider range of pH make that these complexes could be considered as a new alternative to existing preservatives, with application in the pharmaceutical and cosmetic fields.

Keywords: Polyelectrolyte complexes, drying, extrusion, antimicrobial activity, preservatives.

Contenido	Pág.
Resumen	I
Abstract.....	II
Lista de figuras	VIII
Lista de tablas.....	XV
Introducción	1
Objetivos.....	3
Objetivo general.....	3
<i>Objetivos específicos</i>	3
1. Aspectos teóricos	4
1.1 <i>Polielectrolitos</i>	4
1.2 <i>Complejos polielectrolíticos</i>	5
1.3 <i>Formación de complejos polielectrolíticos</i>	6
1.4 <i>Agentes preservantes</i>	9
1.5 <i>Sistemas desarrollados</i>	10
1.6 <i>Propiedades de los compuestos químicos empleados en la obtención de los complejos polielectrolitos</i>	11
1.6.1 <i>Eudragit E100</i>	11
1.6.2 <i>Ácido benzoico</i>	12
1.6.3 <i>Ácido salicílico</i>	12
1.6.4 <i>Ácido 4-hidroxibenzoico</i>	12
1.7 <i>Estado del arte</i>	13
2. Obtención de los complejos	17
2.1 <i>Método de secado por aspersión</i>	18
2.2 <i>Método de extrusión por fusión en caliente</i>	21
2.3 <i>Metodología</i>	24
2.3.1 <i>Materiales</i>	24
2.3.2 <i>Métodos</i>	25
2.3.3 <i>Complejos obtenidos por secado por aspersión</i>	26
2.3.4 <i>Complejos obtenidos por extrusión por fusión en caliente</i>	28
2.3.5.....	30
Variables respuesta evaluadas en los DEE planteados para las dos metodologías.....	30
2.4 <i>Análisis estadístico</i>	31

2.4.1 Tratamiento estadístico de las variables respuesta	31
2.4.2 Tratamiento estadístico del diseño experimental.....	31
2.5 <i>Presentación y discusión de los resultados</i>	31
2.5.1 Complejos obtenidos por secado por aspersión	31
2.5.2 Complejos obtenidos por extrusión por fusión en caliente	40
2.6 <i>Conclusiones</i>	53
3. Determinación de las propiedades fisicoquímicas	55
3.1 <i>Metodología</i>	55
3.1.1 Materiales	55
3.1.2 Métodos.....	56
3.2 <i>Caracterización en el estado sólido</i>	56
3.2.1 Difracción de rayos x en polvo (XRPD).....	56
3.2.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	56
3.2.3 Espectrometría de fotoelectrones inducidos por rayos X (XPS).....	57
3.2.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	57
3.2.5 Distribución de tamaño de partícula.....	57
3.3 <i>Caracterización en dispersión</i>	57
3.3.1 Solubilidad	58
3.3.2 Evaluación del potencial ζ	59
3.3.3 Comportamiento de liberación de los CPEs	59
3.4 <i>Presentación y discusión de los resultados</i>	62
3.5 <i>Caracterización en el estado sólido</i>	62
3.5.1 Difracción de rayos X (XRPD).....	62
3.5.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	67
3.5.3 Espectrometría de fotoelectrones inducidos por rayos X (XPS).....	74
3.5.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	83
3.5.5 Distribución de tamaño de partícula.....	86
3.6 <i>Caracterización en dispersión</i>	88
3.6.1 Solubilidad cualitativa.....	88
3.6.2 Evaluación del potencial ζ	97
3.6.3 Comportamiento de liberación de los CPEs	106
3.7 <i>Conclusiones</i>	128
4. Actividad antimicrobiana	131
4.1 <i>Métodos para la evaluación de la actividad antimicrobiana</i>	133
4.1.3 Estudios complementarios para la evaluación de los cambios en la morfología y potencial ζ en la superficie de las bacterias	137

4.2 Metodología.....	138
4.2.1 Materiales.....	138
4.2.2 Evaluación antibacteriana.....	139
4.3 Evaluación antimicótica.....	141
4.4 Evaluación de la influencia de la presencia de un CPE sobre la morfología y rugosidad de la <i>E.coli</i>	142
4.5 Evaluación de la influencia de la presencia de un CPE sobre del potencial ζ de las dispersiones de <i>E.coli</i>	143
4.6 Análisis estadístico de la reducción logarítmica del crecimiento de las bacterias y la <i>C.albicans</i>	144
4.7 Presentación y discusión de los resultados.....	145
4.7.1 Evaluación antibacteriana.....	145
4.7.2 Análisis estadístico de la reducción logarítmica del crecimiento de las bacterias.....	158
4.7.3 Evaluación antimicótica.....	161
4.7.4 Evaluación estadística de la reducción logarítmica de las colonias de <i>C.albicans</i>	169
4.7.5 Evaluación de la influencia de la presencia un CPE sobre la morfología y rugosidad de la <i>E.coli</i>	170
4.7.6 Evaluación del potencial ζ de las dispersiones de <i>E.coli</i>	175
4.8 Conclusiones.....	177
5. Correlación entre las propiedades fisicoquímicas y la actividad antimicrobiana	179
5.1 Metodología.....	181
5.2 Presentación y discusión de los resultados.....	182
5.2.1 Selección de las variables de la actividad antimicrobiana.....	182
5.2.2 Selección de las variables fisicoquímicas.....	182
5.3 Conclusiones.....	194
Conclusiones y recomendaciones.....	196
Conclusiones.....	196
Recomendaciones.....	197
A. Anexo: Espectros IR de los demás complejos.....	198
B. Anexo: Miscibilidad de los ácidos en Eu y EuCl_{25}	200
C. Anexo: Gráficos para determinación del parámetro de interacción.....	203
D. Anexo: Diagramas de fases para los sistemas AB: EuCl_{25} , AHB:Eu, AHB: EuCl_{25} , AS:Eu, AS: EuCl_{25}	206
E. Anexo: Espectros de XPS para los CPEs obtenidos por SD y HME.....	209

F. Anexo: Activación de las cepas y preparación de inóculos.....	215
G. Anexo: Densidad óptica.....	217
H. Anexo: Productos académicos.....	219
Bibliografía.....	221

Lista de figuras

Figura 1-1 Formación de un CPE a partir de un PE y un ácido orgánico (modificado de Kindermann, 2011) (40).	7
Figura 1-2 Equilibrios involucrados en la formación de un CPE cuando el PE es catiónico.8	
Figura 1-3 Estructura química del polielectrolito Eudragit E100 (60,61).	11
Figura 2-1 Métodos de obtención de complejos polielectrolíticos, adaptado de Olivera 2017 y Mendonsa 2020 (113,117).	18
Figura 2-2 Etapas básicas del secado por aspersión (122).	19
Figura 2-3 Variables que pueden afectar el proceso de secado por aspersión (Modificado de Sosnik 2015 y Paudel 2013) (124,125).	20
Figura 2-4 Representación esquemática del sistema de extrusión por fusión (fuente propia).	21
Figura 2-5 Factores influenciados por los parámetros de proceso en HME. Adaptado de Thiry et al., 2015.(130).	22
Figura 2-6 Complejo polielectrolítico EuB ₁₀₀ obtenido por secado por aspersión.	37
Figura 2-7 Espectros FTIR de los complejos EuB ₁₀₀ y EuB ₇₅ Cl ₂₅ , AB, Eu y la mezcla física entre AB y Eu.	39
Figura 2-8 Termogramas obtenidos por calorimetría diferencial de barrido representativos de las endotermas de disolución / fusión de las composiciones AB/Eu, y AB puro con una rampa de calentamiento de 5 °C/min.	42
Figura 2-9 Gráfico derivado de la Ecuación 2-2 reordenada, empleada para determinar el parámetro de interacción, χ , en el sistema Eu: AB. El valor de χ se estima a partir de la pendiente.	43
Figura 2-10 Diagrama de fases de composición para las mezclas AB:Eu, que muestra las temperaturas experimentales (■), calculadas (—) y la temperatura crítica para el sistema.	44
Figura 2-11 Complejos polielectrolíticos EuB ₁₀₀ (a), EuB ₇₅ Cl ₂₅ (b) y EuHB ₁₀₀ (c) obtenidos por extrusión por fusión.	50
Figura 2-12 Espectro FTIR de Eudragit E100 sin extruir y extruido a 130°C.	51
Figura 2-13 Espectro de FTIR de EuHB ₁₀₀ y EuHB ₇₅ Cl ₂₅ , mezcla física, ácido 4-hidroxibenzoico y Eudragit E100.	52

Figura 3-1 Representación de una celda de Franz y partes que la conforman (fuente: Elaboración propia).	60
Figura 3-2 Patrones de XRPD de los complejos con ácido benzoico (AB) obtenidos por extrusión por fusión (HME) y secado por aspersión (SD), los precursores y la mezcla física.	63
Figura 3-3 Patrones de XRPD de los complejos con ácido salicílico (AS) obtenidos por extrusión por fusión (HME) y secado por aspersión (SD), los precursores y la mezcla física.	63
Figura 3-4 Patrones de XRPD de los complejos con ácido 4-hidroxibenzoico (AHB) obtenidos por extrusión por fusión (HME) y secado por aspersión (SD), los precursores y la mezcla física.....	64
Figura 3-5 Representación de las soluciones sólidas intersticiales adaptada de Sandhu et al., 2014 (170).	66
Figura 3-6 Termogramas de los complejos obtenidos por secado por aspersión (SD) y extrusión por fusión (HME), que incluyen al ácido benzoico (B) y al Eudragit E100 (Eu)..	68
Figura 3-7 Termogramas de los complejos obtenidos por secado por aspersión (SD) y extrusión por fusión (HME), que incluyen al ácido 4-hidroxibenzoico (HB) y al Eudragit E100 (Eu).	69
Figura 3-8 Termogramas de los complejos obtenidos por secado por aspersión (SD) y extrusión por fusión (HME), que incluyen al ácido salicílico (AS) y al Eudragit E100 (Eu).	70
Figura 3-9 Relación entre la T _g (°C) de los complejos y las técnicas de obtención empleadas.	71
Figura 3-10 Representación esquemática de las partículas de los complejos obtenidos por secado por aspersión y extrusión por fusión.	73
Figura 3-11 Espectro de rayos X fotoeléctrico del Eudragit E100.	76
Figura 3-12 Espectro XPS del complejo EuB ₁₀₀ obtenido mediante secado por aspersión y gráfica de la resolución para oxígeno O1s.	77
Figura 3-13 Diferencias en energías de unión para el oxígeno, en los complejos obtenidos por SD y HME, para los grupos C-O y O=C-OH.	78
Figura 3-14 Protonación de una amina terciaria y aumento de la energía de unión.	79
Figura 3-15 Espectro de resolución para el N1s del complejo EuB ₁₀₀ obtenido mediante secado por aspersión.	79

Figura 3-16 Relación entre los pKa de los ácidos utilizados en cada uno de los CPEs obtenidos por HME y SD.....	82
Figura 3-17 Sitio propuesto para los enlaces de hidrógeno entre el Eudragit E100, ácido salicílico, ácido 4-hidroxibenzoico y ácido benzoico.....	83
Figura 3-18 Partículas de los complejos obtenidos por secado por aspersión. a) EuB ₁₀₀ b) EuB ₇₅ Cl ₂₅ c) EuAs ₁₀₀ d) EuAs ₇₅ Cl ₂₅ e) EuHB ₁₀₀ y f) EuHB ₇₅ Cl ₂₅ (5000X a-d) (2500X e y f).	85
Figura 3-19 Partículas de los complejos obtenidos por extrusión por fusión a) EuB ₁₀₀ b) EuB ₇₅ Cl ₂₅ c) EuAs ₁₀₀ d) EuAs ₇₅ Cl ₂₅ e) EuHB ₁₀₀ y f) EuHB ₇₅ Cl ₂₅ (5000X).	86
Figura 3-20 Distribución de tamaño de partícula (D ₉₀ , D ₅₀ y D ₁₀) de los CPEs y EuCl ₁₀₀ obtenidos por secado por aspersión.	88
Figura 3-21 Valores de pH promedio de las dispersiones acuosas de los complejos obtenidos por SD y HME a 0,6% en ácido, en el eje X se presenta el porcentaje de Eudragit E100 en la dispersión.	92
Figura 3-22 Relación de los pH obtenidos de las dispersiones acuosas de los CPEs, producidos por HME y SD a 0,6% en ácido.....	92
Figura 3-23 Cantidad máxima de ácido solubilizado en agua para los CPEs obtenidos por HME y SD.....	96
Figura 3-24 Representación de la estructura de la doble capa eléctrica según el modelo de Gouy-Chapman-Stern (adaptado de la ISO 13099-1) (238).	98
Figura 3-25 Teoría de la electroforesis para partículas esféricas duras, suaves y para polielectrolitos esféricos, y los autores que la desarrollaron (adaptado de Electrophoresis of soft particles Ohshima, Hiroyuki 1995) (240).....	99
Figura 3-26 Efecto del pH sobre el $F-\zeta$ a 25°C para EuB ₁₀₀ obtenido por HME y SD.	102
Figura 3-27 Efecto del pH sobre el $F-\zeta$ a 25°C para EuB ₇₅ Cl ₂₅ obtenido por HME y SD..	103
Figura 3-28 Efecto del pH sobre el $F-\zeta$ a 25°C para EuHB ₁₀₀ obtenido por HME y SD. ...	103
Figura 3-29 Efecto del pH sobre el $F-\zeta$ a 25°C para EuHB ₇₅ Cl ₂₅ obtenido por HME y SD.	104
Figura 3-30 Efecto del pH sobre el $F-\zeta$ a 25°C para EuAs ₇₅ Cl ₂₅ obtenido por HME y SD.	104
Figura 3-31 Relación entre los pKa de los ácidos estudiados y el $F-\zeta$ de las dispersiones de los CPEs a pH 7,0, con 0,06% en ácido.....	106
Figura 3-32 Perfiles de liberación de ácido benzoico en agua, desde los CPEs obtenidos por HME y SD.	112

Figura 3-33 Perfiles de liberación de ácido 4-hidroxibenzoico en agua, desde los CPEs obtenidos por HME y SD.....	112
Figura 3-34 Perfiles de liberación de ácido salicílico en agua, desde los CPEs obtenidos por HME y SD.....	113
Figura 3-35 Equilibrio entre el CPE y un ácido orgánico de bajo peso molecular y, su paso por una membrana semipermeable.....	114
Figura 3-36 Constantes de liberación de Higuchi, de los CPEs obtenidos por HME y SD y, porcentaje de ácido liberado a las ocho horas.....	117
Figura 3-37 Perfiles de liberación del ácido benzoico en buffer pH 6,0, desde los CPEs obtenidos por HME y SD.....	118
Figura 3-38 Perfiles de liberación del ácido 4-hidroxibenzoico en buffer pH 6,0, a partir de los CPEs obtenidos por HME y SD.....	119
Figura 3-39 Perfiles de liberación del ácido salicílico en buffer pH 6,0, a partir de los CPEs obtenidos por HME y SD.....	119
Figura 3-40 Relación entre el porcentaje de Eudragit E100 para cada CPE y porcentaje máximo liberado de activo (t=8h) para los ensayos de liberación a pH 6,0.....	121
Figura 3-41 Perfiles de liberación de ácido benzoico en buffer pH 6,9, desde los CPEs obtenidos por HME y SD.....	123
Figura 3-42 Perfiles de liberación de ácido 4-hidroxibenzoico en buffer pH 6,9, desde los CPEs obtenidos por HME y SD.....	123
Figura 3-43 Perfiles de liberación de ácido salicílico en buffer pH 6,9, desde los CPEs obtenidos por HME y SD.....	124
Figura 3-44 Constantes de velocidad para el modelo de Korsmeyer-Peppas en los diferentes medios usados, para los CPEs obtenidos por HME y SD.....	126
Figura 3-45 Perfiles de liberación del ácido benzoico sin complejar y complejado desde el CPE EuB ₁₀₀ , obtenido por SD y HME. Medios evaluados: agua (pH 5,5), buffer fosfato 6,0 y 6,9.....	127
Figura 4-1 Representación esquemática del procedimiento de microdilución en caldo para bacterias recomendado por CLSI, a pH ajustado a 6,0 o 6,9.....	140
Figura 4-2 Resultados de la metodología de dilución en caldo MHB a pH 6,9, para la determinación de la CMI de EuB ₁₀₀ y EuB ₇₅ Cl ₂₅ obtenidos por HME frente a <i>Escherichia coli</i>	145

Figura 4-3 Resultados de repique en agar TSA incubados a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 20 horas para determinar la CMB de los CPEs EuB ₁₀₀ y EuB ₇₅ Cl ₂₅ , frente a <i>Escherichia coli</i> utilizando caldo MHB ajustado a pH 6,9.	146
Figura 4-4 CMI de los complejos obtenidos por HME y SD a pH 6,0 y 6,9 frente a <i>E.coli</i> y <i>S.aureus</i>	149
Figura 4-5 Reducción logarítmica de UFC de <i>E.coli</i> como respuesta a la aplicación de los CPEs obtenidos por HME a pH 6,0.	154
Figura 4-6 Reducción logarítmica de UFC de <i>E.coli</i> como respuesta a la aplicación de los CPEs obtenidos por HME a pH 6,9.	154
Figura 4-7 Reducción logarítmica de UFC de <i>S.aureus</i> como respuesta a la aplicación de los CPEs obtenidos por HME a pH 6,0.	155
Figura 4-8 Reducción logarítmica de UFC de <i>S.aureus</i> como respuesta a la aplicación de los CPEs obtenidos por HME a pH 6,9.	155
Figura 4-9 Reducción logarítmica de UFC de <i>E.coli</i> como respuesta a la aplicación de los CPEs obtenidos por SD a pH 6,0.	156
Figura 4-10 Reducción logarítmica de UFC de <i>E.coli</i> como respuesta a la aplicación de los CPEs obtenidos por SD a pH 6,9.	157
Figura 4-11 Reducción logarítmica de UFC de <i>S.aureus</i> como respuesta a la aplicación de los CPEs obtenidos por SD a pH 6,0.	157
Figura 4-12 Reducción logarítmica de UFC de <i>S.aureus</i> como respuesta a la aplicación de los CPEs obtenidos por SD a pH 6,9.	158
Figura 4-13 Agrupación de los CPEs obtenidos por HME y EuCl ₁₀₀ con respecto a la reducción de las colonias de <i>E.coli</i> a pH 6,0 y 6,9.....	160
Figura 4-14 Resultados de la metodología dilución en caldo para la determinación CMI de EuAs ₇₅ Cl ₂₅ obtenido por SD frente a <i>Candida albicans</i> , utilizando caldo SDB ajustado a pH 6,0 y 6,9.	162
Figura 4-15 Resultados de repique en agar TSA para determinar la CMF del CPE EuAs ₇₅ Cl ₂₅ obtenido por SD frente a <i>Candida albicans</i> , utilizando caldo SDB ajustado a pH 6,0 y 6,9.	162
Figura 4-16 Efecto de la concentración de ácido en la reducción logarítmica de UFC de <i>C. albicans</i> para los CPEs obtenidos por HME y el ionómero EuCl ₁₀₀ a pH 6,9.	167
Figura 4-17 Efecto de la concentración de ácido en la reducción logarítmica de UFC de <i>C. albicans</i> para los CPEs obtenidos por SD y el ionómero EuCl ₁₀₀ a pH 6,9.	167

Figura 4-18 Efecto de la concentración de ácido en la reducción logarítmica de UFC de <i>C. albicans</i> para los CPEs obtenidos por HME y el ionómero EuCl_{100} a pH 6,0.	168
Figura 4-19 Efecto de la concentración de ácido en la reducción logarítmica de UFC de <i>C. albicans</i> para los CPEs obtenidos por SD y el ionómero EuCl_{100} a pH 6,0.	168
Figura 4-20 Imágenes obtenidas por AFM de una célula de <i>E.coli</i> sin tratamiento, secada a corriente de aire.....	171
Figura 4-21 Imágenes AFM de <i>E. coli</i> , antes y después del tratamiento con $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$ a 37°C y pH 6,9.....	172
Figura 4-22 Análisis de la rugosidad promedio (R_a) de las células de <i>E.coli</i> tratadas y no tratadas con el CPE $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$ a pH 6,9.	174
Figura 4-23 Representación esquemática de la interacción de una punta de AFM con una célula bacteriana sin tratamiento y después del tratamiento. (Adaptado de Laskowski, et al., 2018)(358).....	174
Figura 4-24 Efecto del CPE $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$ sobre el potencial ζ de las dispersiones de <i>Escherichia coli</i> , en solución tampón de fosfato de potasio 0,5 mM a pH 6,9.	175
Figura 5-1 Influencia del pseudo potencial zeta ($F-\zeta$) de las dispersiones de los CPEs obtenidos por HME en la reducción logarítmica de las UFC de <i>E.coli</i> a pH 6,0 y 6,9.	189
Figura 5-2 Influencia del pseudo potencial zeta ($F-\zeta$) de las dispersiones de los CPEs obtenidos por HME en la reducción logarítmica de las UFC de <i>E.coli</i> a pH 6,9.	191
Figura 5-3 Influencia del pseudo potencial zeta ($F-\zeta$) de las dispersiones de los CPEs obtenidos por SD en la reducción logarítmica de las UFC de <i>S.aureus</i> a pH 6,0.	192
Figura 5-4 Influencia del pseudo potencial zeta ($F-\zeta$) de las dispersiones de los CPEs obtenidos por SD en la reducción logarítmica de las UFC de <i>C.albicans</i> a pH 6,9.....	192
Figura 5-5 Influencia de las variables $F-\zeta$ y K_H en la reducción logarítmica de las UFC de <i>E.coli</i> , de los CPEs obtenidos por HME.	193
Figura 5-6 Influencia de las variables $F-\zeta$ y el porcentaje de liberación de ácido en la reducción logarítmica de las UFC de <i>E.coli</i> , de los CPEs obtenidos por HME.	194

Lista de tablas

Tabla 1-1 Polielectrolitos más empleados en el campo farmacéutico y su carga, clasificados de acuerdo con su origen (24).....	4
Tabla 1-2 Clasificación general de los agentes preservantes más utilizados (2).	9
Tabla 1-3 Propiedades fisicoquímicas de los ácidos empleados en este estudio.	12
Tabla 1-4 Complejos con polielectrolitos como sistemas de liberación de compuestos con actividad antimicrobiana.....	13
Tabla 1-5 Patentes de invención con complejos con polielectrolitos empleados como preservantes.....	14
Tabla 2-1 Composiciones y nomenclatura de los complejos a elaborar siguiendo las dos metodologías de procesamiento.....	25
Tabla 2-2 Niveles de las variables asociadas al proceso de secado por aspersión, seleccionados para el diseño estadístico experimental.	27
Tabla 2-3 Matriz del diseño estadístico experimental para secado por aspersión de los complejos.....	27
Tabla 2-4 Diseño estadístico experimental para extrusión por fusión para la obtención de los complejos polielectrolíticos.	28
Tabla 2-5 Niveles de las variables del diseño estadístico experimental para la metodología de extrusión por fusión.	29
Tabla 2-6 Resultados de las variables respuesta del diseño estadístico experimental para los seis complejos obtenidos mediante secado por aspersión.	33
Tabla 2-7 Los valores del estadístico F y p-valor para los factores principales asociados al diseño estadístico experimental.....	33
Tabla 2-8 Resumen del análisis de las variables asociadas al proceso de secado por aspersión.	36
Tabla 2-9 Condiciones seleccionadas para la obtención de los complejos por medio de secado por aspersión.	36
Tabla 2-10 Resultados del experimento final bajo las condiciones de secado seleccionadas, comparadas con los valores máximo y mínimo del diseño estadístico experimental aplicado para la metodología de secado por aspersión.....	37
Tabla 2-11 Señales principales de los complejos, precursores y mezcla física AB: Eu, por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier.	38
Tabla 2-12 Señales importantes de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier, de los ácidos empleados en este estudio.....	39
Tabla 2-13 Señales importantes de FTIR del Eudragit E100.....	40
Tabla 2-14 Parámetros de interacción de Flory-Huggins χ , de temperatura crítica (T_c) y de la temperatura mínima de procesamiento (T_{min}), de los sistemas estudiados.....	44
Tabla 2-15 Resultados de las variables respuesta del diseño estadístico experimental para los seis complejos obtenidos mediante extrusión por fusión.	46
Tabla 2-16 Los valores del estadístico F y p-valor para los factores principales asociados al diseño estadístico experimental.....	46

Tabla 2-17 Resumen del análisis de las variables asociadas al proceso de extrusión por fusión.	48
Tabla 2-18 Condiciones seleccionadas para la obtención de los complejos por medio de extrusión por fusión.	49
Tabla 2-19 Resultados del experimento final bajo las condiciones de extrusión seleccionadas, comparados con los valores máximo y mínimo del DEE aplicado para HME.	49
Tabla 3-1 Intensidad de la señal a 17,8° en los difractogramas obtenidos a partir de los complejos producidos por secado por aspersion y extrusión por fusión.	65
Tabla 3-2 Clasificación de las dispersiones sólidas según el número de fases y el estado del activo disperso.	66
Tabla 3-3 Estudios de XRPD para dispersiones sólidas con Eudragit E100.	66
Tabla 3-4 Picos endotérmicos mostrados para las mezclas físicas del polímero y los ácidos en comparación del polímero sin mezclar, mediante el ensayo de DSC.	71
Tabla 3-5 Posición y porcentaje de área de los átomos de O, C, N y Cl en los activos ácidos, el Eudragit E100 y los complejos.	75
Tabla 3-6 Cambio químico del N1s del Eudragit E100 y los CPEs obtenidos por SD y HME.	80
Tabla 3-7 Tamaño de partícula de los CPEs obtenidos por secado por aspersion.	87
Tabla 3-8 Descripción de la solubilidad cualitativa según la USP.	89
Tabla 3-9 Resultados de la solubilidad y pH, empleando la metodología 2, para los complejos en dispersión al 0,6% en ácido.	91
Tabla 3-10 Solubilidad cualitativa de los diez complejos a una concentración de 0,6 % del ácido, en buffer de fosfatos, a diferentes valores de pH.	93
Tabla 3-11 Solubilidad cualitativa de los diez complejos a una concentración de 0,6 % del ácido en agua, a diferentes valores de pH.	94
Tabla 3-12 Cantidad máxima de complejo aceptada en agua [CPE], concentración de ácido solubilizado [ácido] y porcentaje de ácido correspondiente a la cantidad de CPE, [ácido]%.	95
Tabla 3-13 Valores de pseudo potencial zeta ($F-\zeta$) para los diez complejos en dispersión. Concentración al 0,06 % en ácido y, medio dispersante agua desionizada con 10uL de NaCl 10mM.	101
Tabla 3-14 Modelos matemáticos utilizados para analizar la cinética de liberación de activos.	107
Tabla 3-15 Estudios de liberación de sistemas CPEs en celdas de difusión bicompartimentales.	108
Tabla 3-16 Demostración de las condiciones sink de los ensayos de liberación (Vol donador: 1ml, concentración de complejo: 0,6% en ácido, medio dispersión agua y buffer fosfato de potasio a pH: 6,0 y 6,9).	111
Tabla 3-17 Valores de porcentaje máximo liberado de ácido al t=8h y de pH relacionados con los ensayos de liberación. El pH del medio receptor (agua) en t=0 fue 5,45.	114
Tabla 3-18 Factores de similitud y diferencia, para los perfiles de liberación en agua de los CPEs producidos por HME y SD.	115
Tabla 3-19 Parámetros y coeficientes de determinación de varios modelos cinéticos de liberación para la dispersión de complejos entre Eu y los ácidos AB, AS y AHB (con concentración equivalente en ácido de 0,6 % y agua como medio receptor).	116

Tabla 3-20 Factores de similitud y diferencia, para los perfiles de liberación en buffer pH 6,0 de los CPE producidos por HME y SD.....	120
Tabla 3-21 Factores de similitud y diferencia, para los perfiles de liberación en buffer pH 6,0 de los CPEs producidos por HME y SD, evaluando una misma metodología, pero cambiando la composición del CPE.....	120
Tabla 3-22 Parámetros y coeficientes de determinación de varios modelos cinéticos de liberación para la dispersión de complejos entre Eu y los ácidos AB, AS y AHB, a pH 6,0.	122
Tabla 3-23 Factores de similitud y diferencia, para los perfiles de liberación en buffer pH 6,9 de los CPE producidos por HME y SD.....	124
Tabla 3-24 Factores de similitud y diferencia, para los perfiles de liberación en buffer pH 6,9 de los CPEs producidos por HME y SD, evaluando una misma metodología, pero cambiando la composición del CPE.....	124
Tabla 3-25 Parámetros y coeficientes de determinación de varios modelos cinéticos de liberación para la dispersión de complejos entre Eu y los ácidos AB, AS y AHB, a pH 6,9.	125
Tabla 4-1 Métodos recomendados por la CLSI para evaluación de susceptibilidad de bacterias, hongos y levaduras frente a agentes antimicrobianos (291).	132
Tabla 4-2 CMI y CMB frente a <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> para los diez CPEs, obtenidos por las dos metodologías, a pH 6,9 incubados a 37°C ± 0,5°C por 24 horas en caldo MHB.	147
Tabla 4-3 CMI y CMB frente a <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> para los diez CPEs, obtenidos por las dos metodologías, a pH 6,0 incubados a 37°C ± 0,5°C por 24 horas en caldo MHB.	147
Tabla 4-4 Velocidades de liberación de los CPEs estudiados, calculados en los primeros 90 minutos a partir de los resultados de liberación reportados en capítulo 3.....	150
Tabla 4-5 Reducción logarítmica de UFC de <i>E.coli</i> como respuesta a la aplicación de los CPEs obtenidos por HME, a diferentes concentraciones y a pH 6,0 y 6,9.	151
Tabla 4-6 Reducción logarítmica de UFC de <i>S.aureus</i> como respuesta a la aplicación de los CPEs obtenidos por HME, a diferentes concentraciones y a pH 6,0 y 6,9.....	152
Tabla 4-7 Reducción logarítmica de UFC de <i>E.coli</i> como respuesta a la aplicación de CPEs obtenidos por SD, a diferentes concentraciones y a pH 6,0 y 6,9.	152
Tabla 4-8 Reducción logarítmica de UFC de <i>S.aureus</i> como respuesta a la aplicación de CPEs obtenidos por SD, a diferentes concentraciones y a pH 6,0 y 6,9.	152
Tabla 4-9 Agrupación por reducción logarítmica de UFC de <i>E.coli</i> y <i>S.aureus</i> de los CPEs y EuCl ₁₀₀ en dispersión.....	159
Tabla 4-10 Agrupación estadística de los CPEs (obtenidos por ambas metodologías), teniendo en cuenta la reducción logarítmica de colonias frente a <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> a pH 6,0 y 6,9.	161
Tabla 4-11 CMI y CMF frente a <i>Candida albicans</i> para los diez CPEs, obtenidos por las dos metodologías, en caldo SDB ajustado a pH de 6,0 y 6,9.	163
Tabla 4-12 Valores de CMI del ácido benzoico, ácido salicílico y 4-hidroxibenzoico frente a <i>C. albicans</i> reportados en la literatura.	164

Tabla 4-13 Reducción logarítmica de UFC de <i>Candida albicans</i> como respuesta a la aplicación de CPEs obtenidos por HME a diferentes concentraciones y ajustado a pH 6,0 y 6,9.	165
Tabla 4-14 Reducción logarítmica de UFC de <i>Candida albicans</i> como respuesta a la aplicación de CPEs obtenidos por SD a diferentes concentraciones y ajustado a pH 6,0 y 6,9.	166
Tabla 4-15 Agrupación por reducción logarítmica de UFC de <i>Candida albicans</i> de los CPEs y del EuCl_{100} en dispersión.	169
Tabla 4-16 Agrupación por reducción logarítmica de UFC de <i>Candida albicans</i> de los CPEs y del EuCl_{100} en dispersión, a pH 6,9, mediante la prueba estadística de DMS.	170
Tabla 5-1 Investigaciones en las que se relacionan las propiedades fisicoquímicas con la actividad antimicrobiana.	180
Tabla 5-2 Ecuaciones y el r^2 de la regresión lineal entre la CMI para cada uno de los microorganismos evaluados y las variables fisicoquímicas, de los CPEs obtenidos por SD.	183
Tabla 5-3 Ecuaciones y el r^2 de la regresión lineal entre la CMI para cada uno de los microorganismos evaluados y las variables fisicoquímicas, de los CPEs obtenidos por HME.	183
Tabla 5-4 Interpretación del coeficiente de correlación de Pearson.	185
Tabla 5-5 Coeficientes de correlación de Pearson entre la CMI y las variables fisicoquímicas de los CPEs obtenidos por SD y HME, para los microorganismos en estudio a los pH 6,0 y 6,9.	186
Tabla 5-6 Ecuaciones y el r^2 de la regresión lineal entre la reducción UFC para cada uno de los microorganismos evaluados y las variables fisicoquímicas, de los CPEs obtenidos por SD.	187
Tabla 5-7 Ecuaciones y el r^2 de la regresión lineal entre la reducción logarítmica de las UFC para cada uno de los microorganismos evaluados y las variables fisicoquímicas, de los CPEs obtenidos por HME.	188
Tabla 5-8 Coeficientes de correlación de Pearson entre la reducción logarítmica de las UFC y las variables fisicoquímicas de los CPEs obtenidos por SD y HME, para los microorganismos de estudio a los pH 6,0 y 6,9.	190
Tabla 5-9 Coeficientes de correlación entre el pseudo potencial zeta ($F-\zeta$) y la reducción logarítmica de UFC sin tener en cuenta el pH del medio.	191

Introducción

La gran mayoría de productos farmacéuticos y cosméticos son susceptibles a la contaminación microbiana, produciendo alteraciones fisicoquímicas y representado un riesgo al usuario. Para prevenir esto se adicionan preservantes los cuales son compuestos químicos que eliminan o inhiben el crecimiento de microorganismos (1).

Un preservante antimicrobiano no debe ser tóxico, se espera que tenga buena solubilidad en agua y un amplio espectro de acción con relación al rango de pH. Esta última característica es muy importante, porque el valor de pH de los productos, ya sean farmacéuticos o cosméticos, presentan restricciones en este aspecto (2). Algunos preservantes antimicrobianos han sido modificados químicamente para mejorar sus características y ser más efectivos, como lo fue el caso de los parabenos obtenidos por la esterificación del ácido p-hidroxibenzoico, reemplazando a los ácidos benzoico y salicílico, los cuales tienen limitado su empleo a un pH menor a su valor de pKa (3).

Los parabenos son los preservantes más utilizados a nivel mundial debido a su bajo costo y amplio espectro de acción antimicrobiana (4). En los últimos tiempos en el campo cosmético se ha restringido su uso (5), por el surgimiento de estudios que los clasifican como disruptores endocrinos (6), generando la necesidad de buscar nuevas posibilidades de preservación.

Se disponen de diferentes alternativas a los preservantes convencionales para mantener preservado un producto, entre las que se destacan, el empleo de aceites y extractos naturales (7), azúcares (8), nanopartículas de metales (9) y la aplicación de otras estrategias como la reducción de la actividad de agua (10), la modulación del efecto osmótico (11) y el uso de envases con cierres especiales que evitan la contaminación durante el uso (12). La formación de complejos polielectrolíticos (CPEs), se considera otra opción, ya que permite la modificación de propiedades de moléculas de interés, lo que podría aplicarse al campo de moléculas preservantes, posibilitando la mejora en el espectro de acción y en la disminución de sus limitaciones (13).

La complejación con polielectrolitos (PEs) ha sido descrita y empleada para diferentes aplicaciones, siendo la más conocida la de controlar la liberación de activos, a partir de la formación de sistemas polielectrolito-fármaco (14–20). Los estudios de complejación con agentes preservantes han sido escasos y poco divulgados en la literatura científica, dado que en su mayoría los productos obtenidos son patentados.

La formación de complejos con polielectrolitos es una de las líneas de investigación del grupo SILICOMOBA, del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, grupo en el que se desarrolló este estudio. Trabajos previos en el grupo sobre CPEs con ácido benzoico a escala laboratorio (21,22), constituyen la base de esta tesis. En esta investigación se continuó trabajando con estos sistemas preservantes, empleando los métodos de secado por aspersión y extrusión por fusión, partiendo del polielectrolito Eudragit E100 (Eu) y los ácidos benzoico (AB), salicílico (AS) y 4-hidroxibenzoico (AHB), como contraiones (no empleados de manera simultánea), sistemas a los que se les determinó algunas propiedades fisicoquímicas y su actividad antimicrobiana, con el propósito de desafiar la siguiente hipótesis:

“Es posible mejorar las propiedades fisicoquímicas o la actividad antimicrobiana de los ácidos benzoico, salicílico y 4-hidroxibenzoico mediante la complejación con un polielectrolito catiónico, obtenidos mediante las metodologías de secado por aspersión y extrusión por fusión”.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el comportamiento fisicoquímico y antimicrobiano de complejos obtenidos por interacción entre un polielectrolito catiónico y moléculas ácidas con actividad preservante, relacionadas estructuralmente.

Objetivos específicos

1. Establecer las condiciones de obtención de complejos entre un polielectrolito catiónico y cada uno de los siguientes ácidos: benzoico, salicílico y 4-hidroxibenzoico, empleando las metodologías de secado por aspersión y extrusión por fusión.
2. Evaluar la influencia del ácido utilizado y del método de obtención sobre las propiedades fisicoquímicas de los complejos estudiados.
3. Evaluar la influencia de las variables mencionadas sobre la actividad antimicrobiana de los complejos seleccionados.

1. Aspectos teóricos

1.1 Polielectrolitos

El término polielectrolito (PE) designa una clase de compuestos macromoleculares que, cuando se disuelven en un disolvente con alta constante dieléctrica (generalmente agua), se disocian espontáneamente generando cargas puntuales distribuidas a lo largo de la cadena (23). Los PEs que pueden tener grupos ácidos o básicos en su estructura, tienen la capacidad de establecer un equilibrio químico entre las especies disociada y no disociada en la solución (24), facilitando así las interacciones con moléculas con carga contraria. Hay que tener en cuenta que tanto en el estado sólido como en los disolventes apolares, los contraiones de baja masa molar (CBMM) están fuertemente unidos a los grupos ionizables del polímero y la cadena no tiene carga neta, pero en solución acuosa, los residuos iónicos son solvatados y los CBMM adquieren mayor movilidad, de manera similar a la disolución de una sal simple de masa molar baja (23).

Los PEs pueden ser clasificados de diferentes maneras: según su origen, en naturales, sintéticos y modificados químicamente (semisintéticos); de acuerdo con su composición estructural, en homopolímeros y copolímeros; según su arquitectura molecular, en lineales, ramificados y entrecruzados; por su electroquímica, en ácidos (aniónicos), básicos (catiónicos) y anfóteros (zwitteriónicos); y basados en su solubilidad, en insolubles (resinas de intercambio iónico) y solubles (polímeros hidrofílicos dispersables) (24). Algunos PEs importantes, clasificados según su origen, se relacionan en la Tabla 1-1.

Tabla 1-1 Polielectrolitos más empleados en el campo farmacéutico y su carga, clasificados de acuerdo con su origen (24).

Nombre	Categoría (basado en la carga)
Polielectrolitos naturales	
Ácidos nucleicos	Polianión
Poli (L-lisina)	Policación
Poli (L-glutámico ácido)	Polianión
Carragenina	Polianión
Alginatos	Polianión
Ácido hialurónico	Polianión
Pectina	Polianión
Biopolímeros modificados químicamente	
Derivados de quitosano	Policación

Derivados de celulosa	Polianión o policación
Almidones modificados	Polianión o policación
Derivados de dextrano	Polianión o policación
Polielectrolitos sintéticos	
Poli (vinil-bencil-trialquil-amonio)	Policación
Poli (4-vinil-N-alquil-piridina)	Policación
Poli (acriloilo- oxialquil-trialquil amonio)	Policación
Poli (acrilamido-alquil-trialquil amonio)	Policación
Poli (dialil-dimetil-amonio)	Policación
Poli (ácido estireno sulfónico)	Polianión
Poli (ácido vinil sulfónico)	Polianión
Poli (ácido acrílico o metacrilato)	Polianión o policación
Poli (ácido itacónico)	Polianión
Ácido maleico / dialiamina copolímero	Polianfolito

1.2 Complejos polielectrolíticos

Cuando se da la interacción entre un PE con una molécula orgánica de bajo peso molecular y de carga opuesta, se forma un complejo polielectrolítico (CPE). De otro modo, cuando un PE interactúa con otro PE genera un complejo interpolielectrolítico (CIPE)(25). Pueden existir varios tipos de CPEs tales como: PE-PE, PE-fármaco, PE-fármaco-PE, PE-proteína y PE-surfactantes, entre otras (26). De acuerdo con el tipo de moléculas que conforman al complejo, en todos los casos las interacciones electrostáticas constituyen las principales fuerzas de atracción; sin embargo los enlaces de hidrógeno, las fuerzas ión-dipolo y las interacciones hidrofóbicas, frecuentemente juegan un papel determinante en la estructura final del complejo (27).

Para la obtención de los CPEs se pueden emplear alguno de los siguientes tres métodos:

- El método en solución, el cual es ampliamente utilizado en la síntesis de CPEs, donde los PEs y otras moléculas están completamente disueltas en solventes o en agua antes de que se mezclen entre sí, dándose la formación por la interacción electrostática entre las cargas de las moléculas (ionizadas o no), en solución (28,29). En este método los solventes pueden ser evaporados para obtener el CPE en estado sólido, característica que lo hace fácilmente adaptable al sistema de secado por aspersión.
- El método de extrusión por fusión, el cual usa una extrusora que funde y mezcla el PE y las moléculas sin necesidad de solventes, y es de alto rendimiento a nivel industrial (30).

- El método de autoensamblaje capa por capa, donde se depositan capas sucesivas de polímeros catiónicos y aniónicos sobre un sustrato sólido (p. ej. partículas de sílice), las capas son estabilizadas por las fuerzas electrostáticas en el CPE, dando la posibilidad de que moléculas orgánicas con carga puedan incorporarse en las múltiples capas que se forman (31).

De los métodos mencionados, los dos primeros fueron los que se emplearon en esta tesis. Los CPEs pueden formarse usando relaciones estequiométricas que generen o no “entidades químicas” electroneutrales, siendo esto de suma importancia porque junto a las propiedades intrínsecas del PE determinan las características del CPE formado (32). Cuando no se neutralizan todos los grupos ionizables, por lo general se obtienen CPEs más solubles en agua y con carga. Esto sucede cuando la formación es en dispersión, y depende de las condiciones de concentración de la sal y de las cantidades de poliiones que estén interactuando en la formación del complejo (33,34).

1.3 Formación de complejos polielectrolíticos

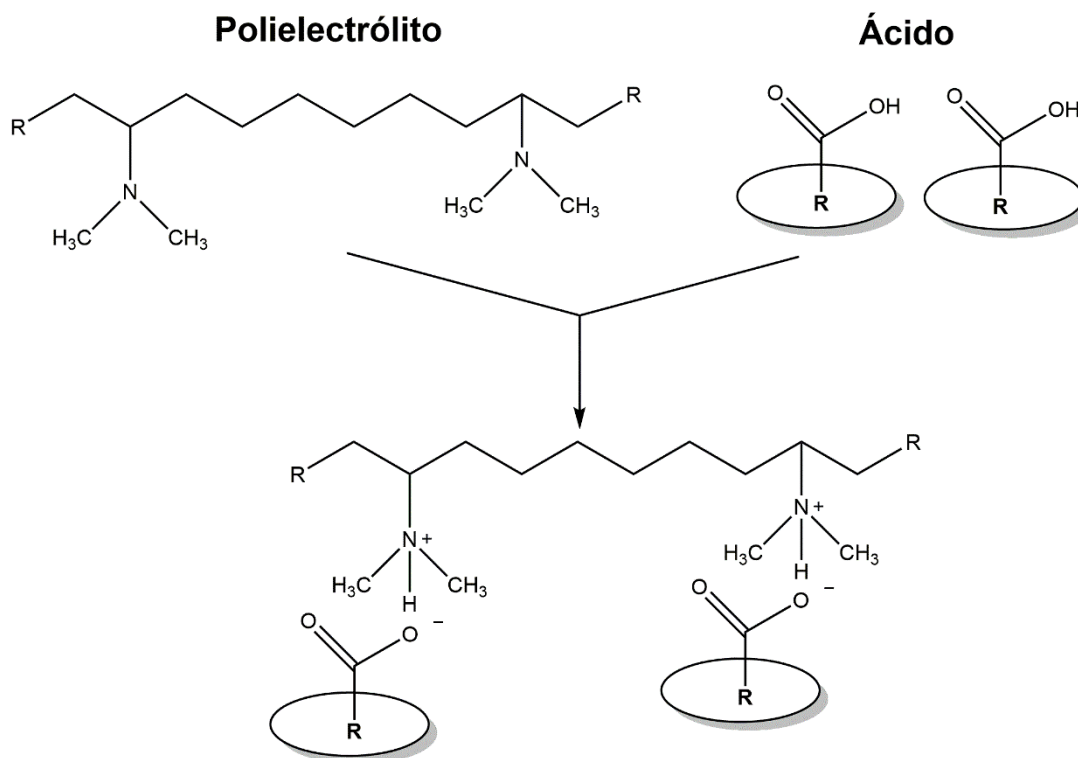
En cuanto a la formación de un CPE, se tiene en cuenta la carga del PE, la constante dieléctrica y la fuerza iónica del medio; existen diferentes teorías que explican lo que ocurre. Los planteamientos de Flory-Huggins (un enfoque basado en el campo medio) y de Debye-Hückel (basados en enfoques termodinámicos estadísticos), son las teorías más frecuentemente utilizadas (35).

En el enfoque de Debye-Hückel, las interacciones entre cargas del mismo signo causan la auto repulsión intramolecular que influye en la interacción y estructura del PE. El enfoque de Flory-Huggins se basa en la teoría de campo medio y la “calidad del solvente”, donde un buen solvente causa una extensión del PE y un mal solvente causa la separación de fases (intra e intermolecular, dependiente de la concentración). Según ambas teorías, se puede decir que la cadena principal del PE se repele entre sí, sin embargo, la fracción cargada del polímero determina el tipo de interacción que va a ocurrir con el contraión. Cuando la fracción cargada es baja, la repulsión es el proceso dominante y la solución se separa en dos fases, mientras que cuando hay partes altamente cargadas del PE, las interacciones de atracción electrostática entre el PE y la molécula de carga opuesta son dominantes y llevan a la formación del complejo (36); el aumento de la entropía debido a la liberación de

contraiones es una de las principales fuerzas impulsoras que determina la espontaneidad del proceso (37). De acuerdo con lo anterior y con estudios experimentales recientes se avala lo expuesto por Müller et al., 2011, quien explica que el proceso de formación del CPE se da por la constitución rápida de partículas primarias, seguido por su agregación para dar lugar a partículas secundarias de mayor tamaño (38).

Para los complejos de interés en esta investigación, la formación del CPE involucra un PE y una molécula orgánica pequeña con cargas opuestas, los grupos ácido y básico generan una interacción produciéndose así una dispersión estable (39). En la Figura 1-1 se ilustra la formación de un CPE a partir de un PE catiónico y una molécula orgánica (ácido).

Figura 1-1 Formación de un CPE a partir de un PE y un ácido orgánico (modificado de Kindermann, 2011) (40).



La interacción de un PE ácido o básico con moléculas orgánicas de menor tamaño que también son electrolitos débiles, produce una alta proporción de condensación contraiónica. La Ecuación 1-1 representa los equilibrios que involucran los grupos ácidos de un PE (RAH), con los grupos básicos de una molécula orgánica de menor tamaño (B).



Donde B y BH^+ son las especies neutras y protonadas de la molécula orgánica de menor tamaño, RAH y RA^- representan las fracciones no disociadas y disociadas de los grupos laterales del PE, y $[RA^-BH^+]$ la fracción condensada de iones opuestos (41). Los equilibrios descritos en la Ecuación 1-1 pueden verse afectados por factores como: el pH, la fuerza iónica del medio de reacción, la densidad de cargas y su distribución en los polímeros, las cantidades de los componentes en la mezcla, el orden de adición de los componentes, el tiempo de interacción antes del secado, la ubicación de los grupos iónicos en los PE, el grado de ionización y la flexibilidad de la cadena polimérica (42,43). La Ecuación 1-2 presenta la forma de calcular la constante de unión o afinidad, K , a partir del equilibrio mostrado en la Ecuación 1-1 (44):

$$K = \frac{[RA^-BH^+]}{[B][RAH]} \quad (1-2)$$

De manera más específica, para un PE catiónico y un activo ácido (AH), como los que se estudiaron en la presente investigación, los equilibrios que se presentan son los de la Figura 1-2 (15), en donde PEH^+ es el PE protonado y PEH^+A^- corresponde al par iónico formado, que representa la manera en la que se espera se encuentre la mayoría del compuesto ácido (AH) (45,46). A partir del conocimiento de esta distribución de especies es posible calcular la concentración de interés.

Figura 1-2 Equilibrios involucrados en la formación de un CPE cuando el PE es catiónico.



La formación de un CPE con moléculas con actividad biológica con características ácidas, de acuerdo con lo presentado en la Figura 1-2, abre la posibilidad de estudiar CPEs con agentes preservantes que sean de esta naturaleza química, siendo este campo específico en el cual se buscó profundizar. A continuación, se destacan algunos de los aspectos más importantes de los agentes preservantes, relevantes en el diseño de productos cosméticos o farmacéuticos.

1.4 Agentes preservantes

El término preservante se define como un agente químico natural o sintético que evita la descomposición de un producto por crecimiento microbiano (47). Se utilizan en la fabricación de medicamentos, cosméticos y alimentos, además de pinturas y otros bienes de consumo, por sus propiedades antibacterianas individuales (destruir e inhibir el crecimiento de bacterias) o antifúngicas (destruir e inhibir el crecimiento de hongos) (48).

Los preservantes se utilizan especialmente en preparaciones líquidas y semisólidas, ya que estas generan un medio excelente para el crecimiento de microorganismos tales como hongos, levaduras y bacterias. Incluso en algunas preparaciones estériles, como soluciones oftálmicas se requiere de la adición de un preservante para mantener las condiciones asépticas durante todo el tiempo de vida útil y especialmente durante su uso (49). En el caso de un producto cosmético, su composición y estabilidad son de especial relevancia en la vida diaria, ya que, en la sociedad actual, el culto a la belleza ha adquirido su máxima expresión y se considera sinónimo de éxito y de felicidad. Esta presión sociocultural, transmitida y potenciada por los medios de comunicación y la publicidad, ha propiciado el consumo masivo de este tipo de productos (50). Debido a este uso más frecuente, los preservantes cobran una mayor importancia por su posibilidad de generar reacciones de sensibilización y efectos indeseables. Por lo tanto, la concentración de preservantes añadidos al producto juega un papel clave siendo la concentración mínima inhibitoria (CMI), uno de los aspectos de mayor relevancia (2), que se espera pudieran disminuirse para los preservantes ácidos estudiados en esta investigación.

Los agentes preservantes pueden agruparse en clases químicas, de acuerdo con el grupo funcional predominante presente en su estructura molecular, como se indica en la Tabla 1-2.

Tabla 1-2 Clasificación general de los agentes preservantes más utilizados (2).

Grupo	Preservante
Ácidos orgánicos, sus sales y ésteres.	Ácido dehidroacético y sus sales, ácido sórbico, ácido salicílico, ácido propiónico y sus sales, ácido benzoico, sus sales y ésteres alquílicos, ácido 4-hidroxibenzoico, sus sales y ésteres (metilparabeno, etilparabeno, etc).

Grupo	Preservante
Aldehídos y compuestos químicos liberadores de formaldehído.	Oximetileno o formalina, imidazolidinil urea, diazolidinil urea, hidroximetilglicinato sódico y bencilhemiformal.
Aminas, amidas, piridinas y sales de benzalconio.	Triclocarbán, hexamidina, dibromo hexamidina, dibromopropamidina, clorhexidina, cloruro de benzalconio, metenammina, Quaternium-15, piritiona sódica, cloruro de cetilpiridinio.
Fenoles y derivados.	Fenol, o-fenilfenol, p-cloro-m-cresol, o-cimen-5-ol, clorofeno y triclosán.
Alcoholes y derivados.	Fenoxietanol, fenoxiisopropanol, alcohol diclorobencílico, alcohol bencílico, clorobutanol, 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol.
Derivados del imidazol.	Climbazol, DMDM hidantoína, imidazolidinil urea y diazolidinil urea.
Otros preservantes.	5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano (bronidox), metildibromo glutaronitrilo, metilcloroisotiazolinona y metilisotiazolinona.

Aunque se tenga una variedad de preservantes, la elección no es fácil dadas las restricciones de los entes reguladores y las limitantes del producto (ya sea farmacéutico o cosmético), como son el pH, color, compatibilidad, vía de administración o sitio de aplicación. Las anteriores restricciones hacen difícil encontrar en un mismo compuesto todas las características óptimas. Para el caso de la FDA la lista de preservantes aprobados es bastante reducida y la posible inclusión de nuevas moléculas en un futuro cercano es improbable, debido a las múltiples exigencias reglamentarias para su aprobación, ya que se trata de sustancias que dependiendo del tipo de producto pueden llegar a tener una ingesta o un uso crónico (51). Por tal razón, el desarrollo de “nuevos preservantes” a partir de CPEs es una alternativa promisoría, ya que se logran modificar características fisicoquímicas de preservantes aprobados, dando la posibilidad de darles una “nueva vida” a excipientes de esta naturaleza que presentan limitaciones en su aplicación; para este estudio con posible aplicación en el campo cosmético.

1.5 Sistemas desarrollados

Los sistemas desarrollados en este trabajo fueron CPEs conformados por un PE catiónico y moléculas orgánicas de menor tamaño con actividad antimicrobiana. Basados en investigaciones previas (46,52–59), se seleccionó como PE al Eu, porque ha demostrado mejorar características fisicoquímicas y de liberación de las moléculas complejadas.

Los agentes preservantes antimicrobianos empleados fueron el AB, partiendo de las investigaciones realizadas por Dallos (2019), quien estudió a escala laboratorio, la

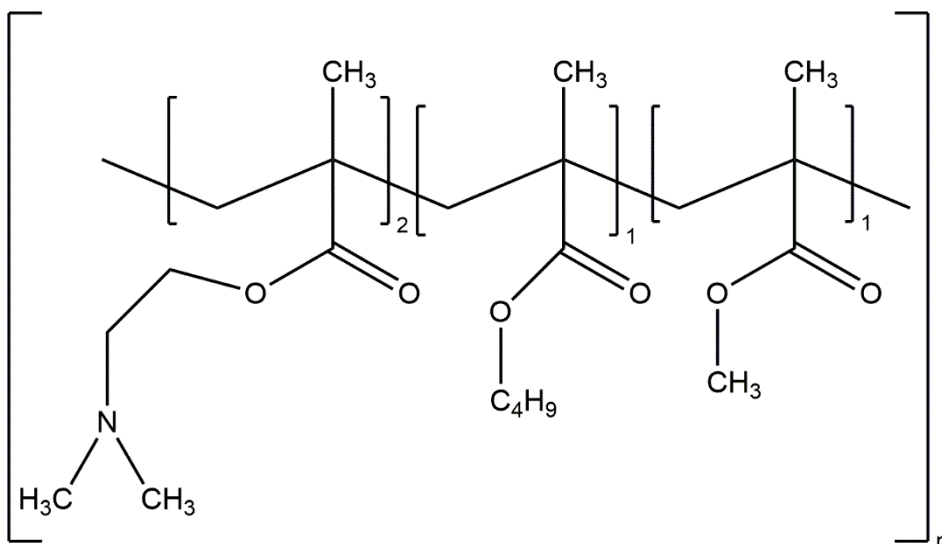
influencia de diferentes relaciones estequiométricas de este ácido y el PE sobre las propiedades fisicoquímicas y antimicóticas de diez CPEs (21). En la presente tesis, además del AB se estudiaron otros ácidos relacionados en cuanto a la estructura química como son, el AS y el AHB, con el fin de evaluar su influencia sobre las propiedades fisicoquímicas y de actividad de los complejos, obtenidos mediante secado por aspersión y extrusión por fusión.

1.6 Propiedades de los compuestos químicos empleados en la obtención de los complejos polielectrolitos

1.6.1 Eudragit E100

El Eu es un polímero catiónico preparado mediante la copolimerización de metacrilato de 2-dimetilaminoetil, metacrilato de butilo y metacrilato de metilo en una relación molar de 2:1:1 (Figura 1-3) (60,61). Es un sólido (gránulos) de color amarillo, con olor característicos parecido al de una amina (61–63). Se emplea principalmente para formar películas de recubrimiento solubles en medio gástrico (64). Posee un peso molecular promedio aproximado de 47000 g/mol, valor alcalino de 180 mg KOH/g de polímero (65) y su temperatura de transición vítrea (T_g) es de 48,5°C (66).

Figura 1-3 Estructura química del polielectrolito Eudragit E100 (60,61).



1.6.2 Ácido benzoico

El AB es un sólido cristalino blanco, su actividad como antifúngico se demostró por primera vez en 1875 (67). Se emplea como preservante en alimentos, productos farmacéuticos y cosméticos, y pierde su actividad a valores de pH superiores a 5,0. Esto se sustenta en su valor de pKa el cual es de 4,2, lo que implica que a este valor de pH sólo se contaría con el 50% de la especie ácida, que es la responsable de la actividad (68).

1.6.3 Ácido salicílico

El AS se encuentra como cristales aciculares o polvo blanco cristalino. Se emplea a menudo, en combinación con AB y otros agentes antimicóticos, para el tratamiento tópico de infecciones fúngicas. El AS tiene poca actividad antibacteriana, pero se ha buscado mejorarla como se muestra en la investigación de Yang et al., 2016, en la que se aumentó su actividad empleando microencapsulación (20). Este ácido tiene actividad queratolítica y afecta procesos metabólicos en las células como el consumo de oxígeno, la función mitocondrial y en algunos casos la transcripción de genes (68–70).

1.6.4 Ácido 4-hidroxibenzoico

El AHB es un polvo cristalino granular blanco. Es un antimicótico clásico pero muy poco utilizado, aunque también se ha usado como agente saborizante (71). Se emplea principalmente como base para la preparación de sus ésteres, conocidos como parabenos, que se utilizan como preservantes en diferentes tipos de industrias (72).

En la Tabla 1-3 se muestran las estructuras químicas y algunas de las propiedades fisicoquímicas de los ácidos estudiados.

Tabla 1-3 Propiedades fisicoquímicas de los ácidos empleados en este estudio.

Propiedades					
Peso molecular (g/mol)	Punto de fusión (°C)	pKa (25°C)	Solubilidad en agua (mg/ml)	Log P	Estructura química

Ácido benzoico	122,12	122,4	4,19	3,4	1,87	
Ácido 4-hidroxibenzoico	138,12	214,5	4,54	5,0	1,58	
Ácido salicílico	138,12	158,0	2,97	2,2	2,26	

1.7 Estado del arte

Los CPEs se han estudiado con diversas aplicaciones, y específicamente en el campo farmacéutico, estas se han direccionado principalmente a los sistemas de liberación de sustancias activas. En la literatura científica se ha profundizado ampliamente sobre las propiedades fisicoquímicas de los CPEs, obtenidos por diferentes métodos y utilizando diferentes materiales de partida, no obstante, los estudios no han analizado cómo varían estas propiedades en función del cambio de estructura química cuando se complejan compuestos químicamente relacionados. En cuanto a la aplicación de los CPEs como sistemas de liberación de preservantes, ha sido una funcionalidad muy poco investigada en los campos farmacéutico y cosmético, encontrando algunos estudios en el campo alimenticio, en los que se ha explorado, por ejemplo, el diseño de sistemas de liberación modificada de conservantes para la obtención de envases activos (77,78).

En la Tabla 1-4 se presentan algunas investigaciones en las que los CPEs han sido estudiados como sistemas para la liberación de compuestos con actividad antimicrobiana, que podrían considerarse como punto de referencia para el desarrollo del sistema preservante, resaltando que en estos casos la aplicación está enfocada hacia enfermedades infecciosas.

Tabla 1-4 Complejos con polielectrolitos como sistemas de liberación de compuestos con actividad antimicrobiana.

Polielectrolito	Compuesto	Método de síntesis	Efecto dado por el complejo	País
Carboximetilcelulosa	Polímero de cloruro de guanidinio.	Evaporación del solvente.	Se obtuvo un CPE que aumenta la resistencia	China (79)

14 Evaluación del comportamiento fisicoquímico y antimicrobiano de complejos con polielectrolitos

			del papel al agua y además proporciona actividad antimicrobiana.	
Alginato (Alg) / N,N,N-trimetilquitosano	Ácido cafeico.	Evaporación del solvente.	Núcleo revestido con CIPE, liberación modulada.	Bulgaria (80)
Carboximetilcelulosa	Polímero basado en guanidina.	Evaporación del solvente.	La formación del CIPE mejora la actividad de la guanidina.	Canada (81)
Unipeptine™	Lisozima.	Evaporación del solvente (secado por aspersión).	Limitación de los sitios activos de la enzima.	Francia (82)
Quitosano / Copolímero de acrilamida	Nanopartículas de plata.	Evaporación del solvente.	Se obtuvo una película de un CIPE, cargado con nanopartículas de plata con actividad antimicrobiana.	India (83)
ε-poli-l-lisina	Diocil sulfosuccinato sódico.	Evaporación del solvente.	Actividad antibacteriana.	China (84)
Ácido hialurónico	Colistina	Evaporación del solvente (secado por aspersión).	Actividad antibacteriana.	Federación Rusa (85)
Quitosano / Alginato de sodio	Aceite esencial de menta	Método en solución.	Actividad antibacteriana.	Irán (86)

Para los desarrollos tecnológicos que tienen como punto de partida a los CPEs que incluyen compuestos químicos con actividad antimicrobiana, es más frecuente encontrar información en patentes de invención que en artículos científicos. Su aplicación se da hacia diferentes campos como la construcción, los materiales biomédicos, los alimentos, la industria textil, etc. En la Tabla 1-5 se presenta un recuento cronológico de algunas patentes relacionadas con CPEs empleados como sistemas preservantes y, además, cómo han variado las aplicaciones de las invenciones a través del tiempo, pasando de ser sistemas antimicrobianos con una única función a ser sistemas polifuncionales y con aplicaciones biomédicas específicas.

Tabla 1-5 Patentes de invención con complejos con polielectrolitos empleados como preservantes.

Número Patente	Producto patentado	Solicitante	País	Año
1142629	CPE de preservación para dispersiones o emulsiones.	ROHM & HAAS	EUA (87)	1969
EP0528035	Agente antibacterial contenido en un CPE.	Iatron Laboratories, Inc	Japón (88)	1993
53300287	Novedoso polímero antimicrobiano, conservante cosmético y farmacéutico.	Alcon Laboratories, Inc.	EUA (89)	1994

Número Patente	Producto patentado	Solicitante	País	Año
5578598	Un agente antimicrobiano incluido en un CPE.	Iatron Laboratories, Inc	EUA (90)	1996
6017561	Composición limpiadora con actividad germicida, que incluye una molécula cuaternaria y un polímero aniónico.	The Clorox Company	EUA (91)	2000
WO2004100664	Composición que está formada por un copolímero ácido y un agente antimicrobiano, para inhibición de crecimiento de microorganismo sobre superficies.	Arch UK Biocides Limited	EUA (92)	2004
20060183822	Composición que contiene un copolímero anfótero y un CPE, para aplicaciones cosméticas y recubrimientos de fármacos.	Connolly Bove Lodge & Hutz Llp.	EUA (93)	2006
20070243237	Película de recubrimiento delgada que es un CPE, el cual se aplica a materiales teniendo propiedades biocidas.	Khaled, Mazen et al.	EUA (94)	2007
20080206293	Apósitos para heridas y un agente bioactivo (doxiciclina).	Quick-Med Technologies, INC.	EUA (95)	2008
9352068	CPE como material para la protección de heridas.	The Florida State University Research Foundation, Inc.	EUA (96)	2016
8545862	Polielectrolitos aniónicos se utilizan como agentes de unión para reducir la solubilidad de polielectrolitos catiónicos antimicrobianos.	Quick-Med Technologies, Inc.	EUA (97)	2013
9,273,220	Composiciones acuosas de CPEs con tensioactivos que contienen opcionalmente, agentes biocidas u oxidantes, que pueden proporcionar protección de la superficie de los artículos tratados.	The Clorox Company	EUA* (98)	2016

* EUA = Estados Unidos de América

En cuanto a la evaluación del método de obtención de CPEs, ésta ha sido abordada superficialmente, ya que las investigaciones se han enfocado principalmente en la modificación del comportamiento de liberación o de la solubilidad de la molécula que se desea complejar, más que en la metodología de obtención.

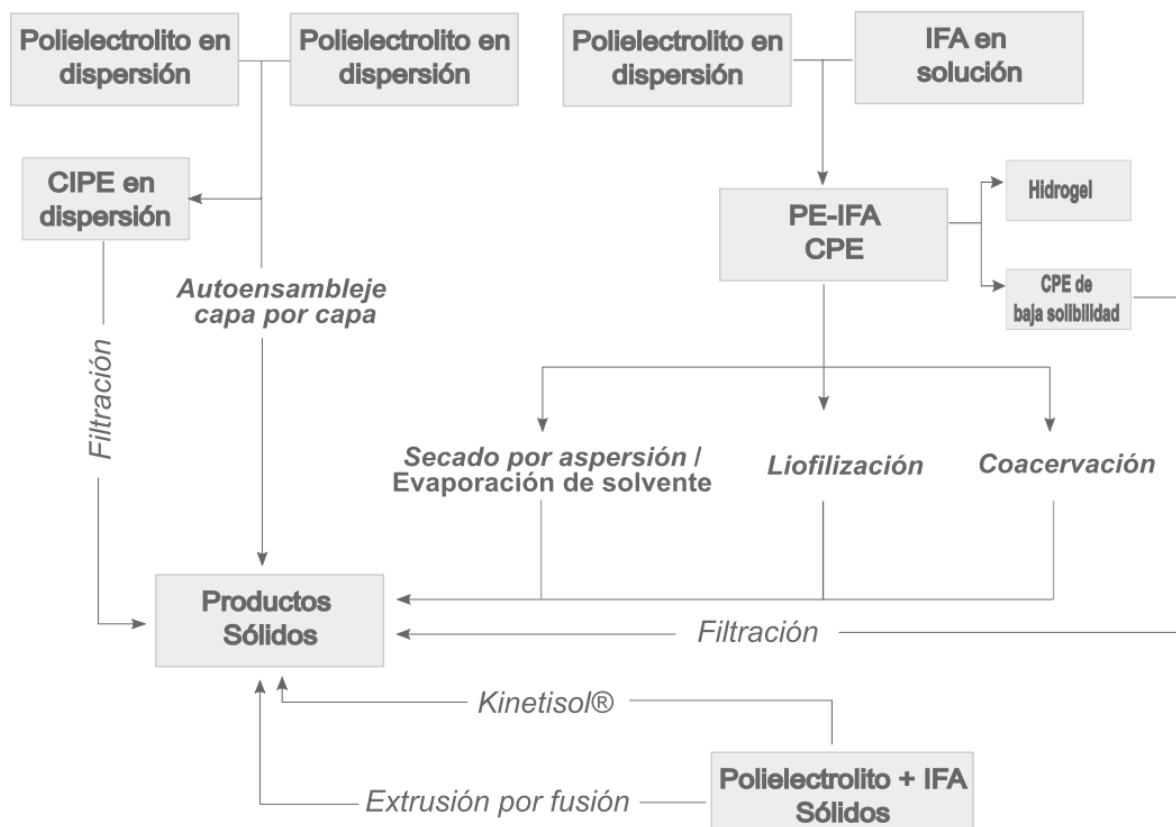
Los sistemas obtenidos por secado por aspersion (Spray Dry, SD) y por extrusión por fusión (Hot melt extrusión, HME), en la mayoría de las investigaciones han sido estudiados para evaluar aplicaciones de los CPEs como transportadores de fármacos (99–105). Aunque se pueden encontrar investigaciones donde se evalúa la actividad antimicrobiana del CPE o la de un preservante que ha sido incluido en la matriz de este, las metodologías empleadas son diferentes a HME y SD (106–112).

2. Obtención de los complejos

Los complejos polielectrolíticos se pueden obtener después de su formación en dispersión (hidrogeles) o en estado sólido, lo que dependerá de la metodología empleada y de la aplicación buscada (113). La selección de la metodología de obtención del CPE, depende en gran medida de las características fisicoquímicas del PE y del ingrediente farmacéutico activo (IFA) y va a influir de manera importante en las propiedades finales del complejo (29). En la Figura 1-4 se muestran los métodos empleados para la obtención de CPEs y CIPEs, en los que los materiales de partida pueden estar en solución o en estado sólido. Aunque, la mayoría de los procedimientos mostrados en la Figura 2-1 tienen en dispersión los materiales de partida, al final los sistemas son llevados al estado sólido. Los procedimientos de extrusión por fusión y Kinetisol® (que se explica más adelante), parten de materiales en el estado sólido, lo cual trae algunas ventajas con respecto a los otros procedimientos como el no uso de solventes orgánicos y la producción continua a escala industrial (114,115).

Kinetisol® es una tecnología de alto cizallamiento adaptada de la industria del plástico, que opera según el principio de fusión para preparar dispersiones sólidas. Esta técnica implica un principio combinatorio novedoso de fuerza cortante y fricción para la transformación rápida de la mezcla en un estado fundido para producir una dispersión sólida homogénea (116). Aunque las investigaciones demuestran potencial de la tecnología para la producción de dispersiones sólidas en la industria farmacéutica, no hay investigaciones que detallen cómo impacta la tecnología en el desarrollo de CPEs.

Figura 2-1 Métodos de obtención de complejos polielectrolíticos, adaptado de Olivera 2017 y Mendonsa 2020 (113,117).



En este estudio se aplicaron dos metodologías, la de secado por aspersion (partiendo de los componentes en dispersión) y extrusión por fusión (partiendo de los componentes en el estado sólido). Esta selección de las metodologías tuvo en consideración los estudios previos en los que se demostró la formación de CPEs entre Eu y moléculas orgánicas de bajo peso molecular (20–22,40,52,118–120), y la posibilidad de contar con procesos que fueran escalables a nivel industrial.

2.1 Método de secado por aspersion

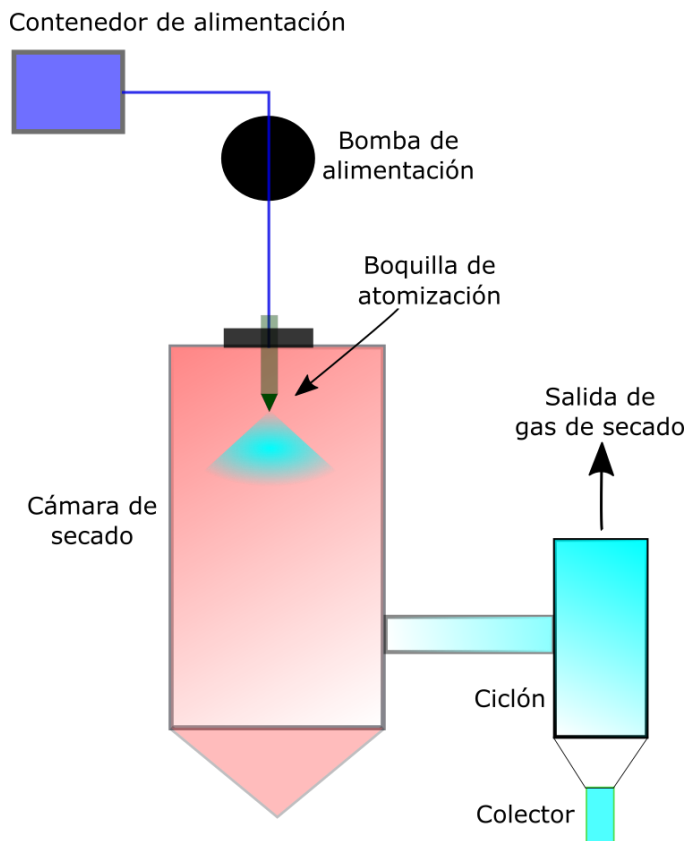
El secado por aspersion es una metodología basada en la transformación de un fluido en un polvo seco, mediante la atomización del fluido en una corriente de gas de secado en caliente (121). Involucra cuatro pasos:

- (i) atomización de la alimentación líquida,
- (ii) secado de la aspersion con el gas caliente (nitrógeno o aire),
- (iii) formación de partículas secas,

- (iv) separación y recolección del producto seco.

En la Figura 2-2 se muestra el esquema básico y los procesos relacionados con un equipo de secado por aspersion. El proceso comienza con la toma del fluido, que está incluido en un recipiente, mediante una bomba peristáltica. Este fluido pasa hacia el atomizador o boquilla, generando unas gotas a escala micrométrica. Las gotas se secan rápidamente por acción del flujo de gas caliente, dando lugar a la formación de partículas secas que son atrapadas por medio de un ciclón. Finalmente, las partículas se depositan en un vaso recolector.

Figura 2-2 Etapas básicas del secado por aspersion (122).

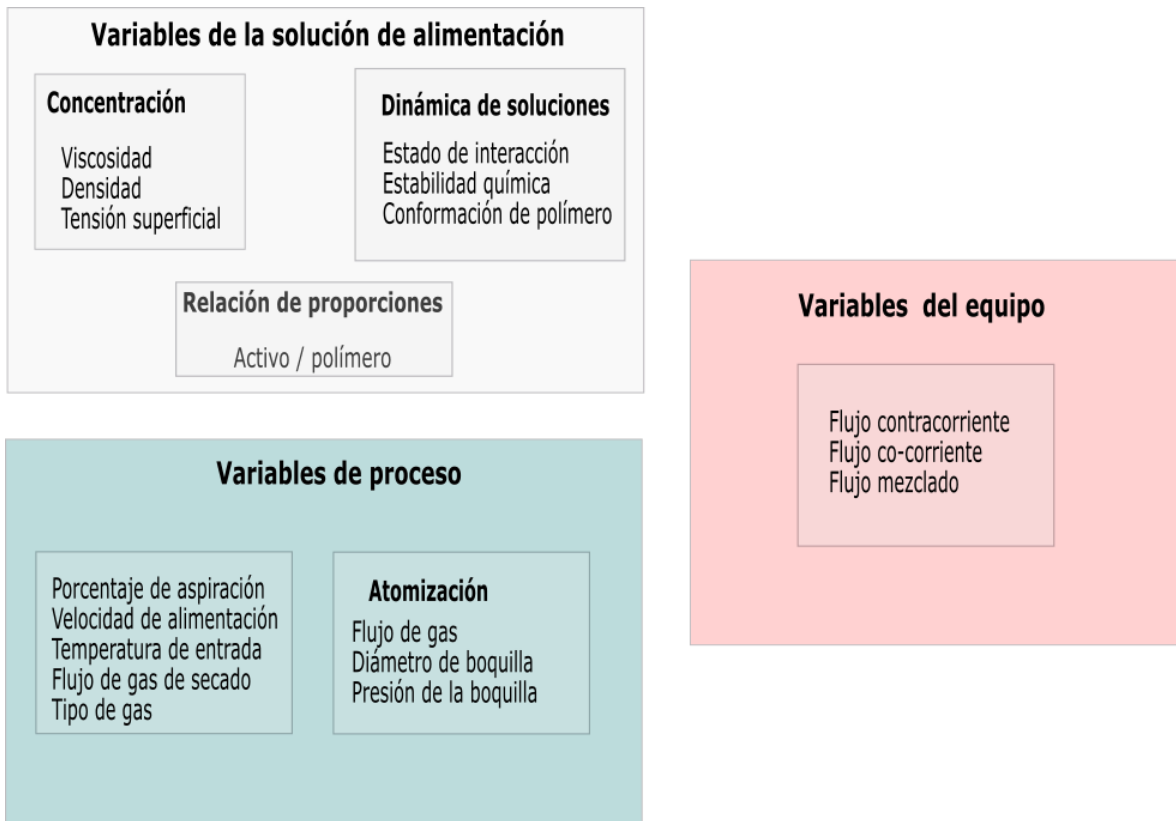


La operación del proceso de secado por aspersion puede estar configurada en bucle abierto o bucle cerrado. El primero usa aire para secar, que no es recirculado, mientras que el bucle cerrado emplea un gas inerte que se recircula. El bucle abierto es preferido cuando se quiere un mejor costo beneficio, se emplea agua como solvente y el material a secar es estable frente a la oxidación (123). En cuanto al modo cerrado, este es de elección cuando

se emplean solventes orgánicos (ya que elimina el riesgo de explosión) y para evitar el deterioro de las sustancias sensibles al oxígeno (124).

Las variables que afectan las características de un producto (para este caso un CPE) pueden estar relacionadas con el proceso, con las propiedades del fluido de alimentación o con las asociadas al diseño del equipo (Figura 2-3).

Figura 2-3 Variables que pueden afectar el proceso de secado por aspersión (Modificado de Sosnik 2015 y Paudel 2013) (124,125).



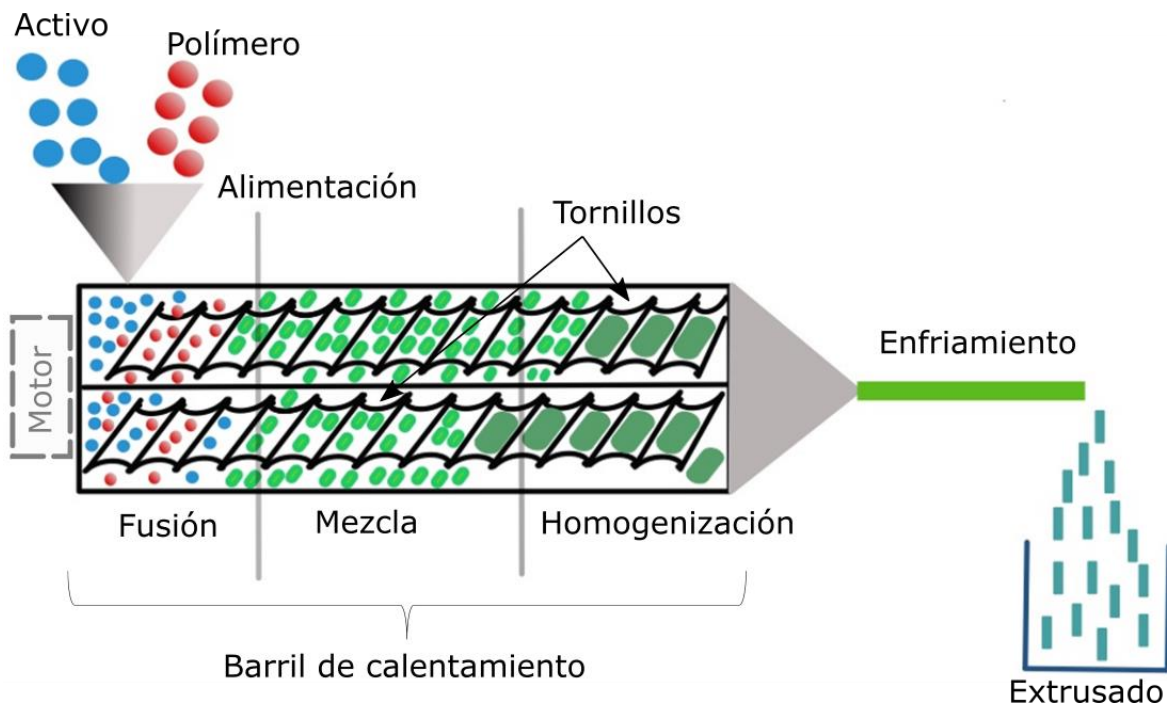
De acuerdo con lo anterior, aunque se conozcan las variables que pueden afectar la obtención de un sistema tipo CPE, es necesario encontrar los valores más adecuados de ellas, bajo las condiciones que se estudien, con las que se obtenga un producto con las características buscadas. Para esto, emplear herramientas como el diseño estadístico experimental (DEE), permite establecer los valores requeridos de dichas variables.

2.2 Método de extrusión por fusión en caliente

Desde la década de 1930, la extrusión por fusión en caliente o extrusión por fusión (HME por sus siglas en inglés) encontró su lugar como un proceso establecido en las industrias de plásticos y alimentos. Ya en la década de 1980, HME se utilizó por primera vez en la formulación de productos farmacéuticos (126). La HME es un proceso continuo que consiste en bombear materiales poliméricos con un tornillo giratorio a temperaturas superiores a su temperatura de transición vítrea (T_g) y, a veces, por encima de la temperatura de fusión (T_m) para lograr la mezcla a nivel molecular de los compuestos activos y ligantes termoplásticos, polímeros o ambos (127).

El proceso de HME se puede dividir en varios pasos, que incluyen: la alimentación, el calentamiento del material, la mezcla, la homogenización, el flujo a través de la matriz, el enfriamiento y el procesamiento final del material. Cada uno de estos pasos puede controlarse y a su vez influir sobre las propiedades finales del complejo. En la Figura 2-4 se esquematiza un sistema típico de extrusión.

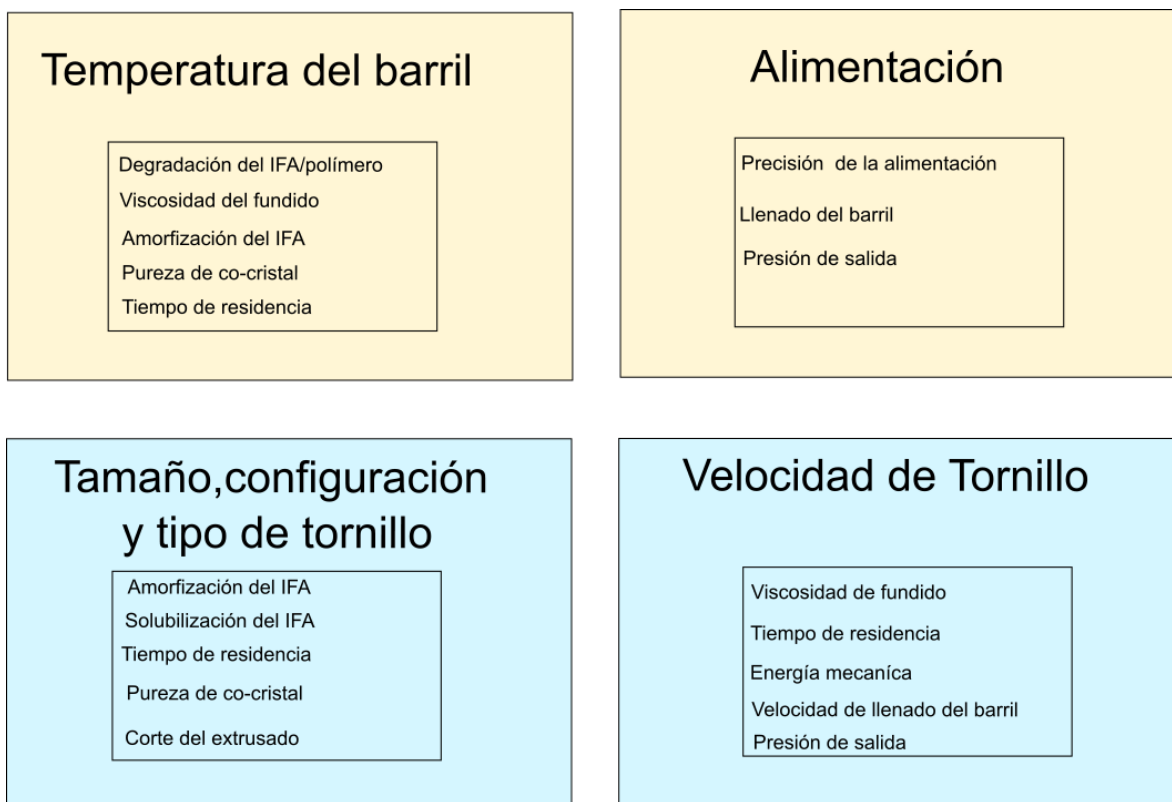
Figura 2-4 Representación esquemática del sistema de extrusión por fusión (fuente propia).



Una extrusora consiste en un barril que se calienta a la temperatura deseada y encierra un tornillo sin fin simple o un par de estos. Estos transportan el material alimentado que al

mismo tiempo se calienta, formando un sistema ablandado, que posteriormente se fuerza por la acción mecánica del tornillo o los tornillos, hasta salir por una abertura al final del barril, esta abertura puede tener diferentes formas. Debido al calor externo y al corte que proporcionan los tornillos, el polímero se plastifica y por lo tanto, reduce su viscosidad. El material es alimentado por un lado de la extrusora y el material extruido sale por el otro lado, siendo así un típico proceso continuo (128). Algunos de los parámetros que juegan un papel importante en el aseguramiento de la calidad de los materiales obtenidos por HME, reportados en la literatura son: el tiempo de residencia, la viscosidad, la temperatura, el diseño del tornillo y la velocidad (129). Estos parámetros pueden influir en la metodología de HME (Figura 2-5), impactando en la cristalinidad, miscibilidad y la liberación del activo desde el extrusado.

Figura 2-5 Factores influenciados por los parámetros de proceso en HME. Adaptado de Thiry et al., 2015.(130)



De manera similar a lo mencionado para el secado por aspersión, el empleo del DEE se convierte en una herramienta esencial para establecer las condiciones de las variables asociadas a la extrusión. Previo al diseño experimental, es necesario conocer información

derivada de los diagramas de fases de la composición del CPE en función de la temperatura.

Los diagramas de fases son fundamentales, ya que el proceso de extrusión involucra un sistema bifásico (activo-polímero), el activo queda inmerso en la matriz polimérica esto es comúnmente conocido como dispersión sólida amorfa (DSA) la cual se define como una dispersión molecular del activo en el polímero amorfo (122). Este proceso reduce la movilidad molecular, la nucleación y el crecimiento de cristales del activo mejorando así la estabilidad cinética. La idea es que la concentración a la que se encuentre el activo en el polímero esté por debajo de su solubilidad, es decir de la concentración de saturación, esto asegura esa estabilidad y al estar a nivel molecular permite que ocurran las interacciones químicas para obtener los CPEs por esta metodología (131).

Un diagrama de fases de composición en función de la temperatura muestra el grado de depresión de la temperatura de fusión de un activo en presencia del polímero, lo cual proporciona un marco racional para diseñar procesos de extrusión por fusión en caliente para DSAs y así evitar el contenido cristalino residual, delimitando la temperatura mínima de procesamiento basada en las consideraciones termodinámicas (132).

Uno de los métodos para poder construir el diagrama de fases es el uso de la depresión del punto de fusión la cual ocurre en muchos sistemas, y se ha documentado para diferentes mezclas (activo : polímero) (133–136). La adición de un polímero amorfo al cristal puede (si es miscible) reducir el potencial químico del material cristalino, lo que lleva a la depresión del punto de fusión.

La depresión del punto de fusión es un fenómeno que se describe mediante la teoría de Flory-Huggins, la cual representa la energía libre de la mezcla del polímero con pequeñas moléculas, de acuerdo con la Ecuación 2-1:

$$\Delta G = RT[\phi \ln \phi + \frac{1-\phi}{m} \ln(1-\phi) + \chi \phi(1-\phi)] \quad (2-1)$$

Donde ΔG es la energía libre de Gibbs, R es la constante de los gases, T es la temperatura en Kelvin, ϕ es la fracción en volumen del activo, m es la relación del volumen del activo en el polímero y χ es el parámetro de interacción de Flory-Huggins.

Por otro lado, el punto de fusión de un fármaco se produce cuando el potencial químico de las formas cristalina y fundida son iguales. En presencia de un polímero miscible, la mezcla exotérmica en combinación con una entropía favorable de la mezcla dará como resultado un punto de fusión deprimido, ya que el potencial químico del sistema fármaco-polímero se reduce en comparación con el del fármaco puro (133,137). Por lo tanto, los sistemas fármaco-polímero miscibles presentarán una depresión del punto de fusión. En consecuencia, se puede relacionar la temperatura de fusión del fármaco puro, T_m , y el punto de fusión deprimido del activo en el sistema activo-polímero (denominado aquí temperatura crítica T_c), como se observa en la Ecuación 2-2, donde ΔH es el calor de fusión del activo (132).

$$\frac{1}{T_c} - \frac{1}{T_m} = -\frac{R}{\Delta H} [\ln\phi + (1 - \frac{1}{m})(1 - \phi) + \chi(1 - \phi)^2] \quad (2-2)$$

En la Ecuación 2-2, T_c se refiere a la temperatura a la que el fármaco alcanza la solubilidad en el polímero, a una composición fija, de manera que se puede calcular el parámetro de interacción χ . Con el valor de χ , se puede obtener el punto de fusión deprimido del sistema activo-polímero de manera teórica (calculado), y compararlo con el punto de fusión deprimido experimental para una misma composición. Cuando el punto de fusión deprimido teórico se desvíe del valor experimental, se tomará como T_c el valor siguiente al punto de fusión deprimido que se desvió. Esta temperatura corresponde al límite inferior de la temperatura de procesamiento, en la que todo el fármaco cristalino puede disolverse en el polímero fundido. Este límite inferior de procesamiento se utilizará como punto de referencia en la variable de temperatura del barril en la metodología de HME.

2.3 Metodología

2.3.1 Materiales

Ácido benzoico (99 % de pureza), ácido salicílico (99 % de pureza) y ácido 4-hidroxibenzoico (98 % de pureza) fueron comprados a Merck grado analítico; 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 (grado reactivo, Merck). En todos los experimentos se empleó agua desionizada (conductividad menor de 5,5 $\mu\text{S/m}$).

2.3.2 Métodos

▪ Cuantificación de los grupos aminos del Eudragit E100

Con el fin de determinar los equivalentes de basicidad del PE y por consiguiente establecer los grupos amino neutralizables (grupos dimetilaminoetilo ó DMAE), se siguió la metodología dada por la Farmacopea Europea (138), que comprende una titulación en medio no acuoso con el ácido perclórico 0.1 N como agente titulante. Este ensayo se realizó por triplicado.

▪ Porcentajes de neutralización de los complejos a obtener

Los porcentajes de neutralización de los CPEs se definieron con base en los resultados de las investigaciones previas, seleccionando los complejos con AB que presentaron mejor actividad antimicótica (21). Estos mismos porcentajes de neutralización se consideraron para los CPEs con AS y AHB. En la Tabla 2-1 se muestran las composiciones de los complejos mencionados y la nomenclatura empleada para identificarlos. La neutralización del PE (Eu) para algunos complejos se realizó con HCl, además del ácido orgánico con actividad antimicrobiana, de acuerdo con lo llevado a cabo en los estudios previos.

Tabla 2-1 Composiciones y nomenclatura de los complejos a elaborar siguiendo las dos metodologías de procesamiento.

Nomenclatura complejos	Porcentaje (%) de grupos amino neutralizados			
	AB	AS	AHB	HCl
EuB₇₅Cl₂₅	75	-	-	25
EuB₁₀₀	100	-	-	-
EuAS₇₅Cl₂₅	-	75	-	25
EuAS₁₀₀	-	100	-	-
EuHB₇₅Cl₂₅	-	-	75	25
EuHB₁₀₀	-	-	100	-

Eu: Eudragit E100; AB: ácido benzoico; AS: ácido salicílico; AHB: ácido 4-hidroxibenzoico.

Estos complejos se obtuvieron empleando las metodologías de secado por aspersión y HME.

2.3.3 Complejos obtenidos por secado por aspersión

Para la elaboración de los CPEs siguiendo esta metodología, se empleó el equipo de secado por aspersión Buchi B290, utilizando una boquilla con un orificio de 1.5 mm de diámetro y usando un deshumidificador e Inert loop B 295 para secado con solventes orgánicos, configurado como sistema en bucle cerrado, acoplado a un generador de nitrógeno de membrana (modelo: N341M, Proton on site). El procedimiento comprende la preparación de la dispersión a atomizar y la definición de las variables asociadas al proceso, haciendo uso del DEE.

- **Preparación de las dispersiones de los complejos antes del secado por aspersión**

La cantidad establecida del PE y del ácido correspondiente, se pesaron y disolvieron en vasos de precipitado independientes con etanol al 96%. Posteriormente, las dos soluciones se mezclaron en un balón aforado de 250ml, con agitación constante por 20 minutos y llevado a volumen con el mismo solvente. Para aquellos complejos en los que la neutralización del PE involucró al HCl, además del preservante ácido, se adicionó un volumen de concentración definida del ácido inorgánico antes de aforar, de acuerdo con el grado de neutralización requerido según la composición del CPE (Tabla 2-1).

- **Definición de las variables asociadas al proceso mediante la aplicación de un diseño estadístico experimental**

Las variables relacionadas con el proceso que podrían presentar una influencia importante en los complejos obtenidos son: la temperatura de inyección, la velocidad de flujo del gas de secado, el ajuste de la alimentación, la concentración de la solución a atomizar y el porcentaje de aspiración del sistema.

Para definir los valores en los que se debían trabajar las variables mencionadas, se hizo uso de un DEE tipo factorial 2^{5-1} . Los valores de los niveles asociados a las variables del proceso de secado se seleccionaron de acuerdo con ensayos preliminares (Tabla 2-2). La matriz del DEE empleado se presenta en la Tabla 2-3.

Tabla 2-2 Niveles de las variables asociadas al proceso de secado por aspersión, seleccionados para el diseño estadístico experimental.

Variables del ensayo	Nivel Bajo (-)	Nivel alto (+)	Unidades
A. Temperatura de Inyección	80	120	°C
B. Velocidad del flujo de N₂	400	600	L/h
C. Ajuste de alimentación	10	30	%
D. Ajuste del aspirador	80	100	%
E. Concentración de la dispersión	5.0	15.0	%(p/v)

Tabla 2-3 Matriz del diseño estadístico experimental para secado por aspersión de los complejos.

Ensayo	A	B	C	D	E
1	+	+	+	+	+
2	-	-	+	+	+
3	-	+	-	+	+
4	+	-	-	+	+
5	-	+	+	-	+
6	+	-	+	-	+
7	+	+	-	-	+
8	-	-	-	-	+
9	-	+	+	+	-
10	+	-	+	+	-
11	+	+	-	+	-
12	-	-	-	+	-
13	+	+	+	-	-
14	-	-	+	-	-
15	-	+	-	-	-
16	+	-	-	-	-

A=Temperatura de inyección; B=velocidad de flujo de N₂; C= Ajuste de alimentación; D= Ajuste del aspirador; E= Concentración de la dispersión.

2.3.4 Complejos obtenidos por extrusión por fusión en caliente

Para la obtención de los complejos siguiendo esta metodología, se empleó la extrusora HAAKE MiniLab II Thermo Scientific, con dos tornillos gemelos cónicos co-rotatorios de acero inoxidable 1.4122, un barril de calentamiento de acero inoxidable 1.4122, con sistema de enfriamiento con aire, sistema neumático de alimentación y una capacidad máxima de producción de cuatro gramos por lote, sin recirculación del material.

Las variables asociadas a esta metodología consideradas importantes para la obtención de los CPEs fueron: la velocidad de los tornillos, el tiempo de residencia y la temperatura del barril. Para definir los valores de las variables mencionadas se propuso un DEE tipo factorial 2³ completo (Tabla 2-4), cada uno de los niveles asociados a las variables del proceso de extrusión fueron seleccionados a partir de ensayos preliminares y diagramas de fases (132).

Tabla 2-4 Diseño estadístico experimental para extrusión por fusión para la obtención de los complejos polielectrolíticos.

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

A=Temperatura del barril; B= Velocidad de los tornillos; C= Tiempo de residencia

▪ Diagramas de fases para el proceso de extrusión

La medida de la T_c, que como se mencionó corresponde el punto de fusión deprimido del activo en el sistema activo-polímero, se realizó siguiendo la metodología de Tao et al., 2009 (135). Se pesaron 3-5mg de las mezclas geométricas^a activo-polímero. Los valores de T_c (para cada una de las mezclas), de T_m (tomados como el onset del pico correspondiente de cada ácido) y de ΔH fusión para cada uno de los ácidos, se midieron mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC, equipo 822e Mettler Toledo), en un rango de

^a Mezclas que provienen de una dilución geométrica, donde se mezclan dos polvos con cantidades desiguales, el polvo de menor peso (normalmente el ingrediente activo), se tritura primero con una masa igual a la del polvo diluyente. Esta primera dilución se mezcla luego con una porción igual de diluyentes. Este proceso se repite hasta que todos los polvos estén íntimamente mezclados (381).

temperatura de 70-240°C, con una rampa de calentamiento de 5°C/min en atmosfera de nitrógeno (flujo de 20ml/min). Cada ensayo se realizó por triplicado.

A partir de esta información experimental, empleando la Ecuación 2-2 presentada en el marco conceptual de este capítulo, se determinó el parámetro de Flory-Huggins y se estimó matemáticamente la relación de la temperatura con la composición de los sistemas activo-polímero, empleando valores obtenidos de la literatura para los parámetros, densidad y peso molecular del Eu, y de los activos [30,33]. Los valores calculados y experimentales (obtenidos a partir de las mezclas del polímero y el ácido correspondiente, por medio de DSC), del punto de fusión deprimido se compararon, lo que permitió definir la T_c para cada sistema y la fracción máxima del ácido en el polímero.

Adicionalmente, de manera experimental, se estableció el valor de la temperatura mínima de procesamiento del polímero y del ácido correspondiente (T_{min}). Para ello, la temperatura de extrusión de las mezclas proporcionales de polímero (Eu y $EuCl_{25}^b$) con ácido en cantidades equivalentes a la usadas para producir los CPEs, se redujo desde 120°C hasta 65°C, con el fin de lograr el torque máximo de la extrusora (limite operacional 5 Nm).

De acuerdo con los resultados de los ensayos preliminares, incluyendo los derivados de los diagramas de fases, se definieron los niveles de cada una de las variables asociadas al DEE (Tabla 2-5).

Tabla 2-5 Niveles de las variables del diseño estadístico experimental para la metodología de extrusión por fusión.

Variables	Nivel Bajo (-)	Nivel alto (+)	Unidades
Temperatura del barril	75	85 ^a	°C
	85	95 ^b	
	115	125 ^c	
	120	130 ^d	
Velocidad de los tornillos	60	120	rpm
Tiempo de residencia	15	30	min

^aEuB₁₀₀, ^bEuB₇₅Cl₂₅, ^cEuAs₁₀₀ y EuHB₁₀₀, ^dEuAs₇₅Cl₂₅ y EuHB₇₅Cl₂₅.

^b Para la obtención del ionómero $EuCl_{25}$, recordando que por HME se debe partir de los materiales en el estado sólido, se neutralizó el 25% de los grupos amino del Eu con HCl, siguiendo la misma metodología utilizada en SD para la preparación de las dispersiones, pero el secado del material, en este caso, se realizó en una estufa (Mettler) a 30°C hasta peso constante.

2.3.5 Variables respuesta evaluadas en los DEE planteados para las dos metodologías

Se evaluó el rendimiento del proceso y el porcentaje de unión entre el Eudragit E100 y el ácido orgánico (AB, AS, AHB), denominado porcentaje de activo retenido por el complejo. Para cada uno de los ensayos realizados en el DEE se verificó la interacción iónica entre Eu y los ácidos, por medio de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (Espectrofotómetro IRPrestige-21/ATR, Shimadzu) empleando la técnica de reflectancia total atenuada (ATR).

- **Rendimiento del proceso**

El rendimiento se calculó como la relación entre el peso del polvo seco obtenido y el contenido inicial de sólidos pesados.

- **Porcentaje de activo retenido por el complejo**

Este se evaluó empleando filtros para centrifuga Amicon® Ultra 0,5ml 10K. 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 por 10 minutos a una velocidad de 14,000 G. Finalizado el proceso de centrifugación se cuantificó el contenido del activo filtrado por espectrofotometría UV, siguiendo metodologías analíticas previamente validadas (UV-VIS 1800, Shimadzu).

- **Caracterización por espectroscopía infrarroja**

Para los doce CPEs obtenidos, los tres ácidos, el Eudragit E100 y las mezclas físicas equivalentes entre el Eudragit E100 y los ácidos, se realizaron mediante espectroscopía infrarrojo, de acuerdo con lo mencionado previamente, en un rango de longitud de onda entre 3500 cm⁻¹ y 400 cm⁻¹, con 62 escaneos, una resolución de 4cm⁻¹, a una temperatura de trabajo de 20 ± 2°C, y una humedad relativa entre 20% y 55%.

2.4 Análisis estadístico

2.4.1 Tratamiento estadístico de las variables respuesta

Todos los resultados obtenidos para cada una de las variables se trataron estadísticamente para obtener un valor promedio de los datos y su respectiva variación o desviación estándar.

2.4.2 Tratamiento estadístico del diseño experimental

Los resultados del DEE fueron evaluados estadísticamente por análisis de varianza (ANOVA por siglas en inglés); el efecto de cada factor principal, así como de sus interacciones a dos factores se estimaron con el cálculo del coeficiente estimado. La significancia estadística se estableció a través del valor de p , valores inferiores a 0.05 indicaron que el factor es estadísticamente significativo con al menos 95% de confianza. Todos los análisis se realizaron en el software RStudio versión 3.4.1.

2.5 Presentación y discusión de los resultados

Previo a la obtención de los complejos, con el fin de establecer las cantidades de AB y HCl requeridos para la neutralización del PE, se realizó la determinación de los grupos ionizables del grupo DMAE, obteniéndose un valor de $3,16 \times 10^{-3}$ moles de grupos DMAE por gramo de Eu con un coeficiente de variación (CV) de 1,90%. A partir de esta información, se realizaron los cálculos para obtener los complejos de acuerdo con lo ya presentado en la Tabla 2-1.

2.5.1 Complejos obtenidos por secado por aspersion

Para obtener la concentración indicada de la dispersión de cada complejo se requirió neutralizar el 100% de los grupos amino del Eudragit E100, empleando alguno de los ácidos orgánicos y/o el HCl (Tabla 2-1), partiendo del valor de los grupos ionizables previamente determinado. Para ello se realizaron los cálculos que se presentan en las Ecuaciones 2-3 a 2-10, suponiendo una neutralización del 75% del Eudragit E100 con un ácido orgánico y de un 25% con HCl.

$$\% \frac{w}{v} = \frac{\text{Sólidos totales (g)}}{\text{Volumen (mL)}} * 100 \quad (2-3)$$

$$\text{Sólidos totales} = \text{Eu}_g + \text{ácido}_g + \text{HCl}_g \quad (2-4)$$

$$\text{Sólidos totales} = \text{Eu}_g + \text{Eu}_g * \text{FA} + \text{Eu}_g * \text{FHCl} \quad (2-5)$$

$$\text{Factor del ácido orgánico (FA)} = \frac{3}{4} * 3,16 \times 10^{-3} * \text{PMácido} \quad (2-6)$$

$$\text{Factor del HCl (FHCl)} = \frac{1}{4} * 3,16 \times 10^{-3} * \text{PMHCl} \quad (2-7)$$

Reemplazando las Ecuaciones 2-6 y 2-7 en la Ecuación 2-5, se obtiene la Ecuación 2-8

$$\text{Sólidos totales} = \text{Eu}_g \left[1 + \frac{1}{4} * 3,16 \times 10^{-3} * \text{PMHCl} + \frac{3}{4} * 3,16 \times 10^{-3} * \text{PMácido} \right] \quad (2-8)$$

Las dispersiones de los complejos estaban a dos concentraciones, 15,0 % y 5,0 % (Tabla 2-2), y se llevaron a un volumen de 250ml con etanol al 96%. Las Ecuaciones 2-9 y 2-10 presentan la manera de calcular la cantidad de Eudragit E100, suponiendo las concentraciones mencionadas expresadas en términos de sólidos totales y empleando la Ecuación 2-8.

$$\text{Eu}_g = [37,5_g] / \left[1 + \frac{1}{4} * 3,16 \times 10^{-3} * \text{PMHCl} + \frac{3}{4} * 3,16 \times 10^{-3} * \text{PMácido} \right] \quad (2-9)$$

$$\text{Eu}_g = [12,5_g] / \left[1 + \frac{1}{4} * 3,16 \times 10^{-3} * \text{PMHCl} + \frac{3}{4} * 3,16 \times 10^{-3} * \text{PMácido} \right] \quad (2-10)$$

De manera similar a lo explicado anteriormente, se obtuvieron las Ecuaciones 2-11 y 2-12 para el cálculo de la cantidad de Eudragit E100 en gramos, para producir dispersiones al 15,0% y 5,0% en sólidos totales, cuando se neutraliza el Eudragit E100 al 100% con el ácido orgánico.

$$\text{Eu}_g = [37,5_g] / [1 + 3,16 \times 10^{-3} * \text{PMácido}] \quad (2-11)$$

$$\text{Eu}_g = [12,5_g] / [1 + 3,16 \times 10^{-3} * \text{PMácido}] \quad (2-12)$$

▪ **Diseño estadístico experimental**

Los resultados del rendimiento y del porcentaje de activo retenido por el complejo, de los DEE aplicados para cada uno de los CPEs obtenidos por secado por aspersión se muestran en la Tabla 2-6. El análisis estadístico correspondiente se presenta en la Tabla 2-7.

Tabla 2-6 Resultados de las variables respuesta del diseño estadístico experimental para los seis complejos obtenidos mediante secado por aspersión.

Ensayo	EuB ₁₀₀		EuB _{75Cl₂₅}		EuHB ₁₀₀		EuHB _{75Cl₂₅}		EuAs ₁₀₀		EuAs _{75Cl₂₅}	
	RP	PAR	RP	PAR	RP	PAR	RP	PAR	RP	PAR	RP	PAR
1	71,2	92,9	85,1	90,1	87,0	73,4	82,8	89,9	84,2	89,6	83,0	67,9
2	77,7	91,4	81,9	88,7	83,7	91,4	88,5	93,0	88,3	81,8	89,8	73,0
3	74,1	91,3	74,6	89,5	76,3	92,0	75,4	92,9	78,9	85,0	76,3	73,8
4	44,2	95,7	69,4	92,4	70,9	94,2	82,5	93,3	89,0	86,4	91,0	75,2
5	79,5	91,4	70,4	88,1	72,0	90,9	79,0	93,2	78,9	84,2	77,3	75,1
6	78,1	91,8	78,3	89,9	80,1	92,3	88,3	90,6	84,0	80,5	91,2	69,3
7	65,8	92,4	77,7	88,9	79,5	91,5	77,8	90,6	74,8	80,1	74,1	73,5
8	80,9	91,5	70,8	89,1	72,5	91,6	82,8	86,3	80,8	91,9	87,5	74,0
9	71,5	91,4	56,9	88,6	58,2	91,2	73,5	90,5	69,4	83,2	81,7	68,4
10	58,0	94,0	68,9	93,2	45,6	94,8	82,8	90,1	78,6	81,4	87,4	70,8
11	53,0	96,5	61,4	94,7	62,8	95,9	65,5	93,0	57,4	87,2	75,0	72,7
12	71,4	93,6	67,3	90,8	68,8	92,9	68,0	93,1	77,8	84,3	88,7	71,3
13	64,7	92,7	66,0	89,4	67,4	91,9	77,2	94,1	77,0	86,1	77,5	71,7
14	69,2	91,4	71,0	83,9	72,6	87,7	75,5	93,0	75,9	83,0	87,4	72,0
15	65,9	92,1	61,9	89,3	63,3	91,8	77,2	93,3	61,0	81,3	70,9	71,7
16	49,5	96,1	64,7	94,7	66,2	95,9	75,6	93,1	73,6	87,6	83,0	64,0

RP = Rendimiento del proceso en porcentaje (%); PAR = Porcentaje de activo retenido por el complejo (%)

Tabla 2-7 Los valores del estadístico F y p-valor para los factores principales asociados al diseño estadístico experimental.

Factor	EuB ₁₀₀				EuB _{75Cl₂₅}			
	RP		PAR		RP		PAR	
	Est. F	p-valor	Est. F	p-valor	Est. F	p-valor	Est. F	p-valor
A	14,792	0,0032**	23,936	0,0006***	0,631	0,4455	13,022	0,0047**
B	0,754	0,5569	1,702	0,2212	0,755	0,4046	0,342	0,5716
C	2,093	0,0393*	10,996	0,0078**	2,131	0,1750	6,230	0,0316**
D	0,047	0,8323	4,046	0,0720	0,050	0,8276	4,396	0,0624
E	18,349	0,0322*	6,528	0,0686	18,357	0,0016**	1,270	0,2861
Factor	EuHB ₁₀₀				EuHB _{75Cl₂₅}			
	RP		PAR		RP		PAR	
	Est. F	p-valor	Est. F	p-valor	Est. F	p-valor	Est. F	p-valor
A	0,057	0,8163	0,000	0,9850	0,676	0,4301	0,004	0,9490
B	0,034	0,8576	1,170	0,3050	5,396	0,0425*	0,293	0,6000
C	0,036	0,8530	2,461	0,1480	7,799	0,0190*	0,017	0,8990
D	0,375	0,5537	0,144	0,7120	0,883	0,3695	0,030	0,8660
E	12,494	0,0054**	1,460	0,2550	16,260	0,0023**	1,268	0,2860
Factor	EuAs ₁₀₀				EuAs _{75Cl₂₅}			
	RP		PAR		RP		PAR	

Factor	Est. F	p-valor	Est. F	p-valor	Est. F	p-valor	Est. F	p-valor
A	0,170	0,6887	0,071	0,7950	0,090	0,7770	1,418	0,2610
B	12,982	0,0048**	0,000	0,9900	107,985	1,12e-06***	0,190	0,6720
C	5,444	0,0418*	0,794	0,3940	11,009	0,0077**	0,450	0,5170
D	0,912	0,3620	0,071	0,7950	7,645	0,0199*	0,023	0,8830
E	22,905	0,0007**	0,118	0,7380	4,592	0,0577	2,593	0,1380

A = Temperatura de inyección. B = Velocidad del flujo de N₂. C= Ajuste de alimentación. D = Ajuste del aspirador. E = Concentración de la dispersión. Est.F= Estadístico F. **RP** = Rendimiento del proceso en porcentaje (%). **PAR** = Porcentaje de activo retenido por el complejo (%). *p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

A continuación, se presenta el análisis de las variables respuesta considerando los resultados y análisis estadísticos realizados.

▪ Rendimiento del proceso

Los resultados del rendimiento para los CPEs obtenidos por secado por aspersion (Tabla 2-6), varían desde el 44,2% hasta el 91,2%.

El análisis del DEE (Tabla 2-7) evidencia el efecto significativo de la cantidad de sólidos totales (Factor E) sobre el rendimiento, para cinco de los seis CPEs ($p < 0,01$); este factor en su nivel superior promueve el aumento del rendimiento para todos los complejos. Este comportamiento podría atribuirse a la disminución en la velocidad de evaporación por el aumento en la concentración de alimentación, en comparación con el disolvente puro o la solución diluida, lo que lleva a la formación de partículas más grandes; estas fluyen más fácilmente y no generan adherencia sobre la superficie de la cámara de secado del sistema (139). En contraste, las partículas pequeñas generalmente provienen de soluciones diluidas y se caracterizan por presentar alta electrostática (140), lo cual favorece su adherencia sobre la superficie interna del sistema de secado reflejándose en bajos rendimientos del proceso.

Para los complejos que incluyen el AHB y el AS, el rendimiento se vio afectado por la velocidad del flujo de N₂ (Factor B) y el ajuste de la alimentación (Factor C), logrando rendimientos altos en el nivel bajo (400L/h) del factor B y en el nivel alto (30% de bomba) del factor C. Este resultado se relaciona con la formación de partículas más grandes, similar a lo explicado anteriormente, pero en este caso debido a una mayor permanencia de las partículas en la cámara de secado (141). Adicionalmente, las dispersiones con los AHB y AS tienen un mayor punto de evaporación en comparación con las dispersiones del AB, lo cual sumado a una mayor cantidad de material en la cámara, conduce a que las gotículas formadas durante la aspersion se fundan con otras obteniéndose partículas de mayor tamaño.

El rendimiento del complejo EuB_{100} se vio afectado por la temperatura de inyección (Factor A) y el ajuste de la alimentación (Factor C), obteniéndose rendimientos mayores cuando el Factor A estuvo en su nivel bajo (80°C) y el Factor C en su nivel alto (30% de bomba). El comportamiento del rendimiento de este CPE podría estar relacionado con que el ácido es el de menor peso molecular entre los ácidos empleados y sus dispersiones las de menor viscosidad, lo que hace que se requiera una temperatura más baja para secar. En cuanto al ajuste de la alimentación, es evidente que a medida que hay más cantidad de material dentro la cámara de secado hay una mayor aglomeración de las partículas y por consiguiente un mayor rendimiento.

▪ **Porcentaje de activo retenido por el complejo**



La cantidad de ácido retenido después de hacer el proceso de filtración es aquel que está interaccionando con el polímero, formando así el CPE. Los resultados del DEE muestran porcentajes de ácido complejado entre el 64,0 y el 96,5 % (Tabla 2-6).

El análisis estadístico del DEE para esta variable respuesta (Tabla 2-7), arroja que solo los complejos que contienen AB fueron afectados por los factores temperatura de inyección (Factor A) y ajuste de alimentación (Factor C). Con un nivel alto de temperatura de (120°C) se obtuvo un mayor porcentaje de complejación para EuB_{100} y $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$, lo cual concuerda con lo encontrado por Bhise et al., 2008 (142), quienes señalan que a una temperatura de inyección cercana al punto de fusión del activo, se mejoran las propiedades micrométricas, la complejación y el rendimiento del proceso. En cuanto al factor C, el porcentaje de complejación aumentó en el nivel bajo de la velocidad de alimentación (10%), posiblemente debido a que en esta condición se mantiene al nitrógeno a una mayor temperatura, secando más fácilmente las gotas, lo que a su vez reduce el tamaño y la cristalinidad, favoreciendo esta variable (143).

▪ **Evaluación general del proceso de secado**

Basado en el análisis estadístico realizado, en la Tabla 2-8 se presentan las variables respuesta del proceso de secado por aspersion (rendimiento y porcentaje de activo retenido por el complejo), el efecto esperado y la influencia que los factores del diseño tienen sobre ellas.

Tabla 2-8 Resumen del análisis de las variables asociadas al proceso de secado por aspersion.

Variable respuesta	Efecto deseado	Factor A	Factor B	Factor C	Factor D	Factor E	Complejo
Rendimiento		No	No	No	No	+	EuB ₁₀₀
		No	No	No	No	+	EuB ₇₅ Cl ₂₅
		No	No	No	No	+	EuHB ₁₀₀
		No	-	+	No	+	EuHB ₇₅ Cl ₂₅
		No	-	+	No	+	EuAS ₁₀₀
		No	-	+	+	No	EuAS ₇₅ Cl ₂₅
% Complejación		+	No	-	No	No	EuB ₁₀₀
		+	No	-	No	No	EuB ₇₅ Cl ₂₅
		No	No	No	No	No	EuHB ₁₀₀
		No	No	No	No	No	EuHB ₇₅ Cl ₂₅
		No	No	No	No	No	EuAS ₁₀₀
		No	No	No	No	No	EuAS ₇₅ Cl ₂₅

↑: Aumento de la variable; No: El factor no tiene efecto estadísticamente significativo; +: El factor tiene efecto estadísticamente significativo en su valor superior, favoreciendo la variable de acuerdo con el efecto deseado; -: El factor tiene efecto estadísticamente significativo en su valor inferior, favoreciendo la variable de acuerdo con el efecto deseado. A = Temperatura de inyección. B = Velocidad del flujo de N₂. C = Ajuste de alimentación. D = Ajuste del aspirador. E = Concentración de la dispersión.

A partir de este análisis se seleccionaron las condiciones para la obtención de los complejos, mediante la metodología de secado por aspersion, que se presentan en la Tabla 2-9.

Tabla 2-9 Condiciones seleccionadas para la obtención de los complejos por medio de secado por aspersion.

Complejo	Temperatura de inyección °C	Velocidad de flujo de N ₂ L/h	Ajuste de alimentación %	Ajuste de aspirador %	Concentración de la dispersión (%p/p)
EuB ₁₀₀	120	400	10	80	15
EuB ₇₅ Cl ₂₅	120	400	10	80	15
EuHB ₁₀₀	120	400	30	100	15
EuHB ₇₅ Cl ₂₅	120	400	10	80	15
EuAS ₁₀₀	80	400	30	100	15
EuAS ₇₅ Cl ₂₅	80	400	30	100	15

Una vez establecidos los niveles de los factores de acuerdo con el análisis del DEE, se realizó un ensayo adicional para cada CPE bajo estas condiciones definidas, evaluando las mismas variables respuesta. En la Tabla 2-10 se presentan los valores medios resultantes, para las variables respuestas rendimiento del proceso y el porcentaje de activo retenido por el complejo, cuando se utilizaron las condiciones seleccionadas dadas en la Tabla 2-9,

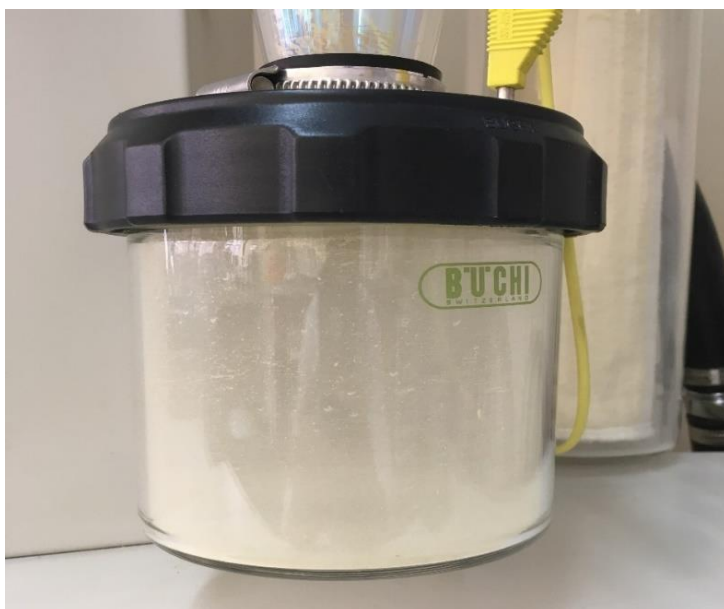
comparándolos con los valores mínimo y máximo resultantes, para las mismas variables respuesta en el DEE (Tabla 2-6).

Tabla 2-10 Resultados del experimento final bajo las condiciones de secado seleccionadas, comparadas con los valores máximo y mínimo del diseño estadístico experimental aplicado para la metodología de secado por aspersión.

Complejo	Porcentaje de rendimiento del proceso (%)			Porcentaje de activo retenido por el complejo (%)		
	Mínimo	Máximo	Condiciones seleccionadas	Mínimo	Máximo	Condiciones seleccionadas
EuB₁₀₀	44,2	80,9	78,6	91,3	96,5	90,2
EuB₇₅Cl₂₅	56,9	85,1	76,7	83,9	94,7	91,4
EuHB₁₀₀	45,6	87,0	89,3	73,4	95,9	90,3
EuHB₇₅Cl₂₅	65,5	88,5	77,8	86,3	94,1	85,3
EuAs₁₀₀	57,4	89,0	92,0	80,8	91,9	90,5
EuAs₇₅Cl₂₅	70,9	91,2	88,3	64,0	75,2	74,1

Los resultados de la Tabla 2-10 evidencian que las condiciones seleccionadas en el proceso de secado por aspersión, para cada uno de los CPEs, proporcionan un buen porcentaje de rendimiento y complejación. A manera de ilustración, en la Figura 2-6 se presenta el CPE EuB₁₀₀ obtenido por secado por aspersión, bajo las condiciones definidas.

Figura 2-6 Complejo polielectrolítico EuB₁₀₀ obtenido por secado por aspersión.



▪ **Caracterización por espectroscopia infrarroja de los CPEs obtenidos por secado por aspersión**

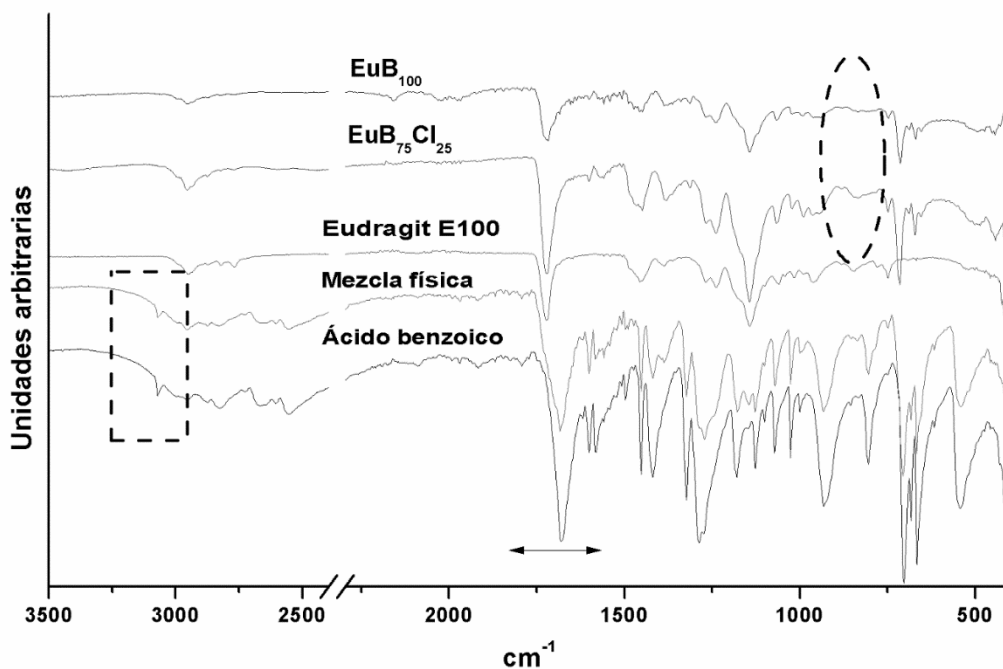
A cada uno de los complejos se les realizó un barrido en el espectro de infrarrojo desde 400 a 3500 cm^{-1} , identificando las bandas de absorción principales en la formación de los CPEs. La Tabla 2-11 resume las bandas de absorción de cada uno de los complejos y sus precursores. Adicionalmente, en la Figura 2-7 se muestran los espectros de infrarrojo de los CPEs EuB_{100} y $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$ obtenidos por SD, junto con el AB, el Eu y la mezcla física de ambos. En el Anexo A se incluyen los espectros de infrarrojo de los demás CPEs.

Tabla 2-11 Señales principales de los complejos, precursores y mezcla física AB: Eu, por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier.

	COO-H del ácido (cm^{-1})	COO-H fuera del plano (cm^{-1})	C=O (COOH) de ácido (cm^{-1})	Dimetilamino de Eu (cm^{-1})
AB	2554-3070	931	1679	-----
AS	3180-3300	887	1652	-----
AHB	3242-3402	923	1668	-----
Eu	-----	-----	-----	2770-2950
MF	2556-3073	934	1682	2772-2822
EuB₁₀₀	N.O	N.O	N.O	N.A
EuB₇₅Cl₂₅	N.O	N.O	N.O	N.A
EuHB₁₀₀	N.O	N.O	N.O	N.A
EuHB₇₅Cl₂₅	N.O	N.O	N.O	N.A
EuAs₁₀₀	N.O	N.O	N.O	N.A
EuAs₇₅Cl₂₅	N.O	N.O	N.O	N.A

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

Figura 2-7 Espectros FTIR de los complejos EuB_{100} y $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$, AB, Eu y la mezcla física entre AB y Eu.



Los espectros de los precursores de los complejos corresponden con lo reportado (20,144–147), tanto para el Eudragit E100 como para los ácidos benzoico, salicílico y 4-hidroxibenzoico (Tablas 2-12 y 2-13).

Tabla 2-12 Señales importantes de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier, de los ácidos empleados en este estudio.

Número de onda de la banda (cm^{-1})			Transición vibracional asociada
Ácido benzoico	Ácido salicílico	Ácido 4-hidroxibenzoico	
2554-3070	3300-3200	3349	Estiramiento O-H.
1676	1658	1663	Estiramiento C=O.
1601 y 1582	1579	1560	Estiramiento C=C aromático.
1497 y 1452	1490	1434	C-H del anillo aromático.
1419,1288 y 1323	1384 y 1326 (Ph-OH)	1363 (Ph-OH)	Acoplamiento del estiramiento C-O y flexión OH en el plano.

Tabla 2-13 Señales importantes de FTIR del Eudragit E100

Número de onda de la banda (cm ⁻¹)	Transición vibracional asociada
2949 y 2874	Estiramiento asimétrico de CH ₃ y de los grupos CH ₂ de la cadena principal y del CH ₂ -OR.
2882-2770	Estiramiento simétrico de los grupos CH ₂ de la cadena ramificada "CH ₂ -N-(CH ₃) ₂ ".
1722	Estiramiento de C=O.
1454 y 1487	Flexión de los grupos CH ₂ de la cadena principal.
1387	Estiramiento del grupo CH ₃ .
1269 y 1238	Estiramiento grupo ester C-O.

Los espectros de los CPEs confirman la interacción iónica entre el Eudragit E100 y cada uno de los ácidos; los siguientes aspectos lo demuestran:

- Las bandas que corresponden al enlace O-H de los ácidos (2550-3400 cm⁻¹) no se observan en el complejo, esto es porque el ácido se disocia y está presente en su forma iónica pudiendo así interactuar con el Eudragit E100.
- El estiramiento simétrico de la cadena ramificada que contiene la amina en el Eudragit E100 (2800-2400 cm⁻¹) no es observada en los complejos, esto se debe a la protonación de todos los N, debido a la cesión del protón por parte de cada activo ácido y su consiguiente interacción con el acetato del ácido correspondiente.
- Los espectros de FTIR de las mezclas físicas entre el Eudragit E100 y los ácidos muestran la sumatoria de las bandas de absorción características de cada uno.

La interacción entre el Eudragit E100 y otras moléculas ha sido reportada en varios estudios (18,46,54,119,148–150), los cuales corroboran los resultados de la presente investigación.

2.5.2 Complejos obtenidos por extrusión por fusión en caliente

De manera similar a lo explicado para la metodología de secado por aspersion, se elaboraron los CPEs de acuerdo con las relaciones de neutralización en cada complejo y con la composición presentada en la Tabla 2-1. Para ello se consideró el dato de la determinación de los grupos ionizables del grupo DMAE por gramo de Eu, que fue mencionado anteriormente y la neutralización del 100% de estos grupos del PE con alguno de los ácidos orgánicos y/o el HCl. La diferencia fundamental respecto a la metodología anterior es que en este caso todos los componentes de partida debían ser sólidos, por lo

que en aquellos complejos que requerían neutralización con HCl al 25%, se obtuvo primero el sistema EuCl_{25} al estado sólido a partir de la dispersión, como se indicó en la metodología.

Para los complejos en donde el cien por ciento de la neutralización es con el ácido orgánico, las cantidades pesadas se calcularon de la siguiente forma (Ecuaciones 2-13 a 2-16), recordando que la cantidad que se podía producir por lote en la extrusora era de 4 g.

$$4g \text{ de mezcla} = \text{Eu}_g + \text{Ácido}_g \quad (2-13)$$

$$\text{Factor del ácido (FA)} = 3,16 \times 10^{-3} * \text{PMácido} \quad (2-14)$$

$$4g = \text{Eu}_g + \text{Eu}_g * \text{FA} \quad (2-15)$$

$$\text{Eu}_g = 4 / (1 + 3,16 \times 10^{-3} * \text{PMácido}) \quad (2-16)$$

En cuanto a los complejos neutralizados al 75% con ácido orgánico y 25% con HCl, primero se obtuvo el sistema EuCl_{25} solo, neutralizando el 25% de los grupos amino con HCl, de acuerdo con lo señalado en las Ecuaciones 2-5 y 2-7. Una vez elaborado el EuCl_{25} se realizaron los cálculos considerando las Ecuaciones 2-17 y 2-18.

Se calcula el *FA* teniendo en cuenta que se neutralizan solo el 75% de los grupos amino.

$$\text{Factor del ácido (FA)} = \frac{3}{4} * 3,16 \times 10^{-3} * \text{PMácido} \quad (2-17)$$

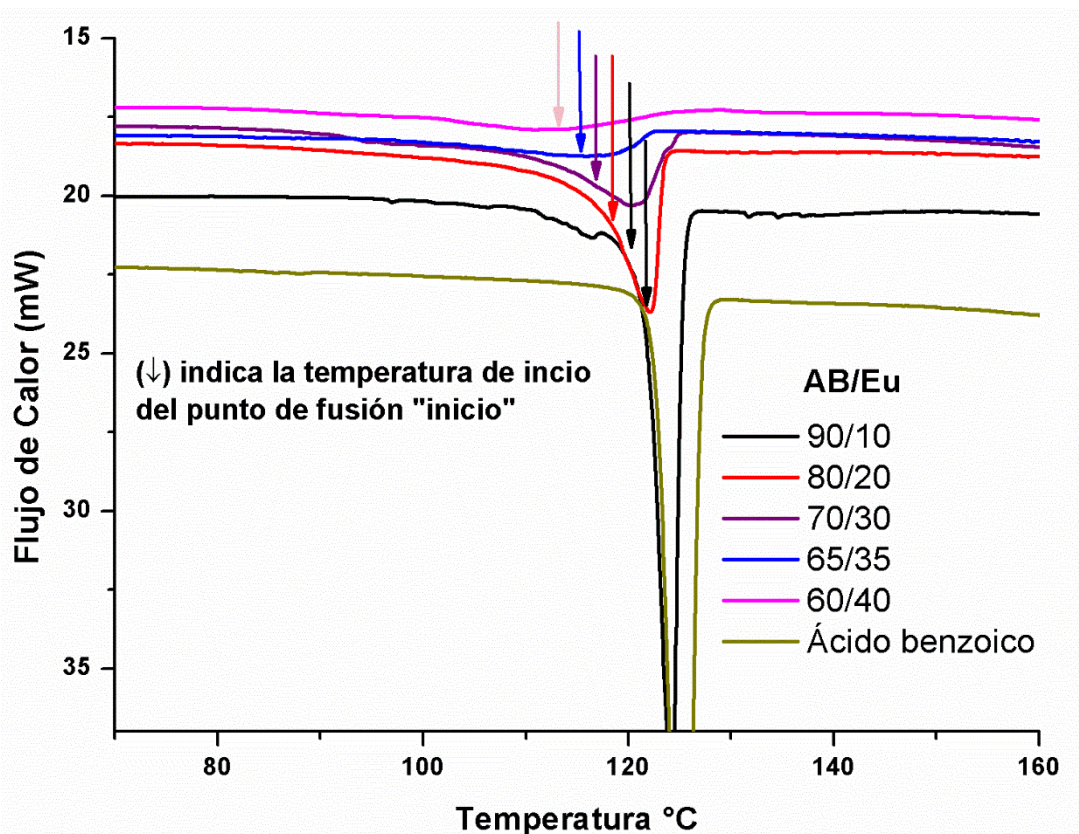
$$\text{EuCl}_{25g} = 4 / (1 + \frac{3}{4} * 3,16 \times 10^{-3} * \text{PMácido}) \quad (2-18)$$

▪ Diagramas de fases para el proceso de extrusión

Los AB, AS y AHB demostraron depresión en el punto de fusión en presencia de Eu y EuCl_{25} para las diferentes composiciones estudiadas. En la Figura 2-8 se muestra la miscibilidad del AB en Eu a temperaturas elevadas. El AB tuvo una depresión de 22,6 °C cuando estuvo mezclado con Eu en un fracción de 60/40 (AB:Eu) y de 26,1 °C cuando estuvo con EuCl_{25} en la fracción 65/35 (AB: EuCl_{25}) (Figura B1-Anexo B). El AHB presentó una depresión del punto de fusión en 11,5 °C en la fracción 75/25 con Eu (AHB:Eu) (Figura B2-Anexo B) y 19,5 °C con EuCl_{25} en la misma fracción (AHB: EuCl_{25}) (Figura B3-Anexo B); y el AS tuvo

una depresión del punto de fusión en 12,9 °C cuando estuvo con Eu (AS:Eu) (Figura B4-Anexo B) y 28,4°C con EuCl_{25} (AS: EuCl_{25}) en la fracción de 70/30 ((Figura B5-Anexo B)).

Figura 2-8 Termogramas obtenidos por calorimetría diferencial de barrido representativos de las endotermas de disolución / fusión de las composiciones AB/Eu, y AB puro con una rampa de calentamiento de 5 °C/min.



Con la información obtenida a partir de la depresión del punto de fusión se calculó el parámetro de interacción de Flory-Huggins, χ , para cada uno de los sistemas estudiados. Para ello, la Ecuación 2-2 se reorganizó para plantearla en función de las variables de una ecuación lineal, generando los gráficos correspondientes para cada composición (Anexo C), como el mostrado en la Figura 2-9 para el sistema AB:Eu, en el que, χ es la pendiente de la curva.

La Ecuación 2-2, también permitió estimar matemáticamente el valor de la T_c , relacionando la temperatura con la composición de los sistemas activo-polímero y empleando los valores obtenidos de la literatura como se explicó en la metodología. Los valores calculados y experimentales (obtenidos a partir de las mezclas de polímero y ácido, por medio de DSC),

del punto de fusión deprimido se compararon, permitiendo definir la T_c para cada sistema y la fracción máxima de ácido en el polímero.

En la Figura 2-10, se muestra el diagrama de fases para el sistema AB: Eu. En ésta se relaciona la fracción de AB en el polímero en función de la temperatura, y los valores experimentales que se comparan con los valores teóricos calculados con la Ecuación 2-2.

Figura 2-9 Gráfico derivado de la Ecuación 2-2 reordenada, empleada para determinar el parámetro de interacción, χ , en el sistema Eu: AB. El valor de χ se estima a partir de la pendiente.

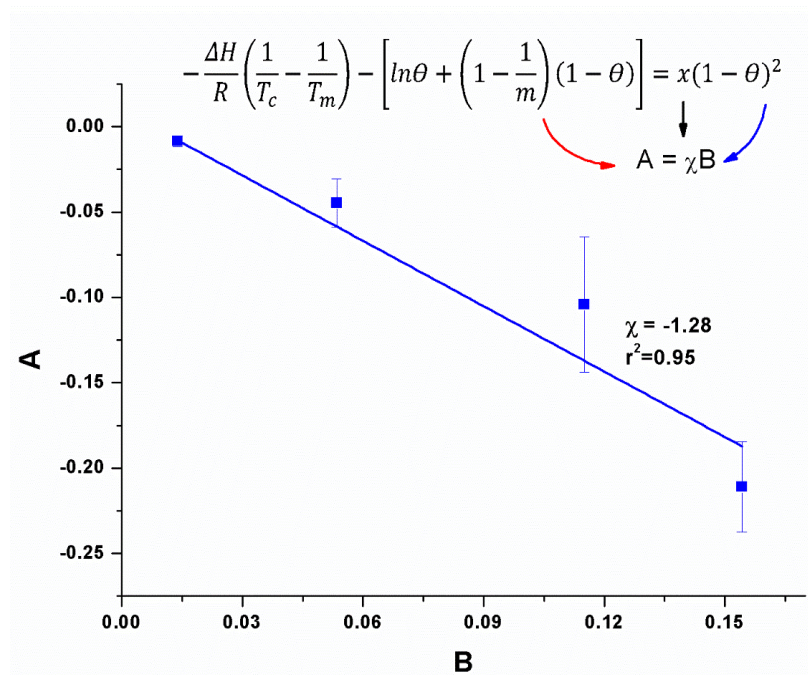
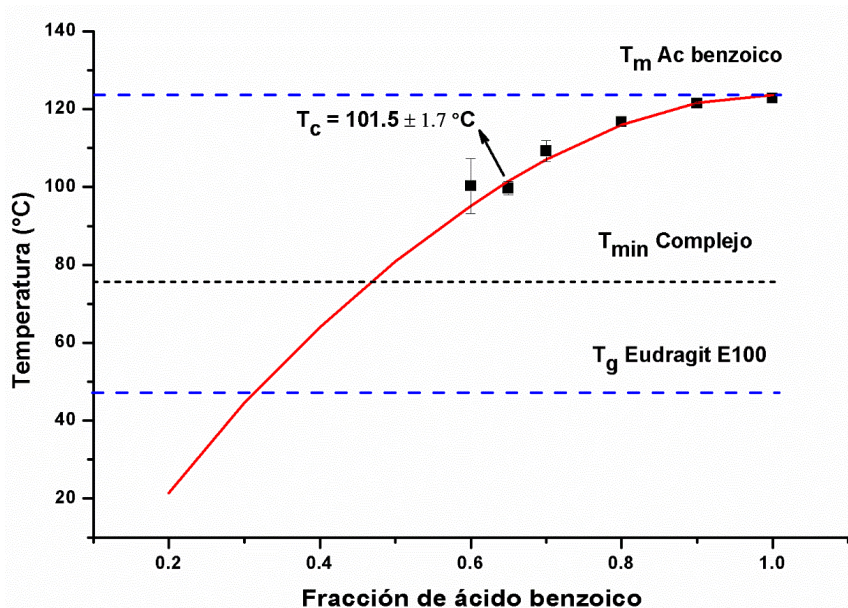


Figura 2-10 Diagrama de fases de composición para las mezclas AB:Eu, que muestra las temperaturas experimentales (■), calculadas (—) y la temperatura crítica para el sistema.



Adicionalmente, de manera experimental se estableció el valor de la temperatura mínima de procesamiento del Eu y del EuCl_{25} (T_{\min}), de acuerdo con lo explicado en la metodología.

En la Tabla 2-14 se muestran los valores del parámetro de interacción, χ , T_{\min} y T_c de cada uno de los sistemas. Los valores negativos del parámetro de interacción indican que los activos son solubles en el Eu (151), y los valores experimentales concuerdan con los predichos por el modelo para el rango de composiciones estudiadas.

Tabla 2-14 Parámetros de interacción de Flory-Huggins χ , de temperatura crítica (T_c) y de la temperatura mínima de procesamiento (T_{\min}), de los sistemas estudiados.

Complejo	Parámetro de interacción χ	Temperatura crítica (°C)	Fracción de peso del ácido en Eu	T_{\min} (°C)
EuB ₁₀₀	-1,28	101,5 ± 1,7	(0,60)	70
EuB ₇₅ Cl ₂₅	-2,94	94,5 ± 4,6	(0,70)	85
EuHB ₁₀₀	-2,27	200,5 ± 0,3	(0,80)	110
EuHB ₇₅ Cl ₂₅	-2,16	195,6 ± 2,5	(0,75)	115
EuAs ₁₀₀	-1,12	145,7 ± 0,9	(0,70)	110
EuAs ₇₅ Cl ₂₅	-3,30	130,4 ± 4,5	(0,70)	115

El valor del parámetro de interacción está determinado por los efectos combinados de las interacciones activo-activo, polímero-polímero y polímero-activo. Generalmente, un valor positivo pequeño o negativo de χ , sugiere que las interacciones activo-polímero (fuerzas adhesivas) son más fuertes que las interacciones activo-activo y polímero-polímero (fuerzas

cohesivas). Por el contrario, un gran valor positivo del parámetro de interacción indica que los componentes tienden a interactuar con moléculas similares, lo que conduce a la separación de fases (152). Por lo tanto, de acuerdo con los resultados mostrados en la Tabla 2-14, existen fuertes interacciones activo-polímero lo que favorecería la dispersión sólida y por consiguiente la formación del CPE.

Resultados similares evaluando la miscibilidad de los compuestos con actividad farmacológica en Eu han sido obtenidos por otros autores. Se destacan los trabajos realizados por Tian et al., 2020 (153), quienes emplearon la metodología de HME como estrategia de manufactura y el Eu como plataforma portadora para indometacina, naproxeno e ibuprofeno, demostrando que la implementación de modelos termodinámicos predictivos ayuda a la producción de formas de dosificación sólida. Otros autores como Mamidi y Rohera (2021) (154), y Wiranidchapong et al., 2008 (155), lograron determinar las condiciones óptimas de producción mediante el estudio de los fenómenos de miscibilidad de moléculas activas en Eu y Eudragit RS, empleando diagramas de fases para estos sistemas dispersos.

Los resultados de las T_c mostrados en la Tabla 2-14, corresponden al valor donde hay congruencia entre lo experimental y lo calculado justo antes que se desvíe de lo predicho experimentalmente, a la fracción correspondiente. Los datos reportados de temperatura mínima (T_{min}), para cada uno de los complejos, representan el valor más bajo al cual el sistema puede ser procesado en la extrusora, y es dependiente de la composición del CPE y del equipo.

Para entender mejor la aplicabilidad de los resultados presentados en la Tabla 2-14, para el sistema EuB_{100} por ejemplo, la temperatura mínima de procesamiento sería de $70^{\circ}C$, y para fracciones en peso de 0,6 se necesitaría una temperatura de $101,5^{\circ}C$, por lo que este CPE se podría extruir en este rango de temperatura mencionada.

Un razonamiento similar se aplicó para lo demás CPEs (ver Anexo D). Con esta información y algunos ensayos preliminares se eligieron las condiciones de partida para el DEE.

▪ **Diseño estadístico experimental (DEE)**

Los resultados de las variables respuesta (Rendimiento del proceso en porcentaje (%) y porcentaje de activo retenido por el complejo (%)), para los DEE de cada uno de los CPES obtenidos por HME se presentan en la Tabla 2-15. El análisis estadístico correspondiente se presenta en la Tabla 2-16.

Tabla 2-15 Resultados de las variables respuesta del diseño estadístico experimental para los seis complejos obtenidos mediante extrusión por fusión.

Ensayo	EuB ₁₀₀		EuB ₇₅ Cl ₂₅		EuHB ₁₀₀		EuHB ₇₅ Cl ₂₅		EuAS ₁₀₀		EuAS ₇₅ Cl ₂₅	
	RP	PAR	RP	PAR	RP	PAR	RP	PAR	RP	PAR	RP	PAR
1	55,7	91,7	57,4	89,7	47,0	86,1	44,6	82,1	41,9	95,4	42,2	97,9
2	49,9	91,3	33,4	92,8	29,5	85,6	43,9	85,9	31,7	95,9	45,3	97,3
3	58,1	88,9	46,0	91,1	46,7	86,1	72,2	85,8	30,1	96,2	54,1	97,7
4	43,2	92,2	37,8	90,9	13,2	87,5	28,4	85,2	21,8	96,1	42,4	96,1
5	49,8	91,6	50,4	88,1	20,2	84,1	30,5	81,1	37,0	97,2	45,0	97,8
6	59,8	91,2	23,7	88,3	44,1	86,5	47,1	85,6	49,3	97,6	52,2	93,6
7	44,8	92,0	57,0	89,1	48,9	81,8	36,7	80,7	52,7	97,6	50,9	97,3
8	47,1	91,0	33,5	86,9	21,6	87,2	45,6	86,6	32,4	96,5	48,1	97,4

RP = Rendimiento del proceso en porcentaje (%); PAR = Porcentaje de activo retenido por el complejo (%).

Tabla 2-16 Los valores del estadístico F y p-valor para los factores principales asociados al diseño estadístico experimental.

Factor	EuB ₁₀₀				EuB ₇₅ Cl ₂₅			
	RP		PAR		RP		PAR	
	Est. F	p-valor	Est. F	p-valor	Est. F	p-valor	Est. F	p-valor
A	3,674	0,128	0,943	0,3865	1,087	0,3560	0,005	0,947
B	2,101	0,221	4,636	0,0976	5,670	0,0759	0,033	0,864
C	0,000	0,997	0,943	0,3865	0,135	0,7320	0,002	0,968
Factor	EuHB ₁₀₀				EuHB ₇₅ Cl ₂₅			
	RP		PAR		RP		PAR	
	Est. F	p-valor	Est. F	p-valor	Est. F	p-valor	Est. F	p-valor
A	1,087	0,3560	0,005	0,947	6,086	0,0692	2,015	0,2287
B	5,670	0,0759	0,033	0,864	10,511	0,0316*	20,861	0,0103*
C	0,135	0,7320	0,002	0,968	2,374	0,1982	3,901	0,1195
Factor	EuAs ₁₀₀				EuAs ₇₅ Cl ₂₅			
	RP		PAR		RP		PAR	
	Est. F	p-valor	Est. F	p-valor	Est. F	p-valor	Est. F	p-valor
A	7,990	0,0475*	0,247	0,645	3,605	0,130	0,190	0,685
B	0,300	0,6131	0,002	0,966	3,841	0,122	0,414	0,555
C	6,059	0,0696	3,438	0,137	0,454	0,537	0,414	0,555

A = Temperatura del barril. B = Velocidad de los tornillos. C= Tiempo de residencia. Est.F= Estadístico F. RP = Rendimiento del proceso en porcentaje (%). PAR = Porcentaje de activo retenido por el complejo (%). *p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

A continuación, se presenta el análisis de las variables respuesta considerando los resultados y análisis estadísticos realizados.

▪ **Rendimiento del proceso**

Los valores de rendimiento para los CPEs obtenidos por extrusión por fusión (Tabla 2-15), mostraron resultados comprendidos entre el 13,2% y el 72,2%. El análisis del DEE (Tabla 2-16) demostró que el factor velocidad de los tornillos (Factor B) afecta el rendimiento de uno de los seis complejos. Esta velocidad afecta la carga y el mezclado en el barril, además de la velocidad de corte del proceso de extrusión (130). El CPE en el que se evidenció la influencia del factor B fue el $\text{EuHB}_{75}\text{Cl}_{25}$, en el que a un nivel bajo de velocidad (60rpm) se obtuvo mejor rendimiento. Esto podría deberse a una mayor separación de las cadenas del polímero, dado por el grupo -OH fenólico en la posición cuatro del anillo, favoreciendo una mayor movilidad de estas y por consiguiente, haciendo que la viscosidad en el estado fundido de la mezcla sea menor. Este comportamiento favorece el flujo de la masa por cizallamiento, proporcionando un movimiento controlado del material a través de la extrusora, haciendo que este fluya completamente y no se adhiera a las paredes del barril. En contraste, una mayor velocidad de tornillos conlleva a que el sistema AHB: EuCl_{25} sea demasiado líquido y el flujo del material sea incompleto, comprometiendo el rendimiento porque parte del material se queda en el fondo del barril.

La temperatura del barril (Factor A) solo afectó el rendimiento del complejo EuAs_{100} . A mayor temperatura hay más facilidad en la mezcla de las fases, porque se logra una menor viscosidad, lo que genera un mayor flujo por el barril (156,157). Aunque esto no es una regla general y depende de cada sistema, para este caso, el nivel alto de temperatura (125°C) promovió un mayor rendimiento. Es por esta razón que para cada mezcla polímero/activo se necesita determinar la temperatura del barril para no tener un material degradado o con pobre calidad (dos fases, baja mezcla, muy cristalino., etc.)(130).

▪ **Porcentaje de activo retenido por el complejo**

Los resultados del DEE muestran porcentajes de retención de los activos entre el 86,6 y el 97,9 % (Tabla 2-15).



El análisis estadístico del DEE para esta variable respuesta (Tabla 2-16), muestra que solo un complejo ($\text{EuHB}_{75}\text{Cl}_{25}$) fue afectado por el factor velocidad de los tornillos (Factor B) y que en su valor más bajo fue donde el porcentaje de activo retenido fue mayor.


Una velocidad baja en los tornillos en un sistema de extrusión conduce a un mayor tiempo de residencia entregándose una mayor cantidad de energía al sistema. Esta energía proviene principalmente de la temperatura del barril (128), lo cual influye en el aumento de las interacciones entre el PE con el activo, de esta manera entre más tiempo esté en estas condiciones, se presume que más efectiva será la interacción.

▪ **Evaluación general del proceso de extrusión por fusión**

De manera similar a lo presentado para SD, y basado en el análisis estadístico realizado, en la Tabla 2-17, se presentan las variables respuesta del proceso de HME (rendimiento y porcentaje de activo retenido por el complejo), el efecto esperado y la influencia que los factores del diseño tienen sobre ellas.

Tabla 2-17 Resumen del análisis de las variables asociadas al proceso de extrusión por fusión.

Variable respuesta	Efecto deseado	Factor A	Factor B	Factor C	Complejo
Rendimiento		No	No	No	EuB ₁₀₀
		No	No	No	EuB ₇₅ Cl ₂₅
		No	No	No	EuHB ₁₀₀
		No	+	No	EuHB ₇₅ Cl ₂₅
		+	No	No	EuAs ₁₀₀
		No	No	No	EuAs ₇₅ Cl ₂₅
% Complejación		No	No	No	EuB ₁₀₀
		No	No	No	EuB ₇₅ Cl ₂₅
		No	No	No	EuHB ₁₀₀
		No	-	No	EuHB ₇₅ Cl ₂₅
		No	No	No	EuAs ₁₀₀
		No	No	No	EuAs ₇₅ Cl ₂₅

: Aumento de la variable; No: El factor no tiene efecto estadísticamente significativo; +: El factor tiene efecto estadísticamente significativo en su valor superior, favoreciendo la variable de acuerdo con el efecto deseado; -: El factor tiene efecto estadísticamente significativo en su valor inferior, favoreciendo la variable de acuerdo con el efecto deseado. A = Temperatura del barril. B = Velocidad de los tornillos. C= Tiempo de residencia.

A partir del análisis realizado al DEE presentado de manera resumida en la Tabla 2-17, se seleccionaron las condiciones para la obtención de los CPEs por extrusión por fusión, que permitieran lograr un alto rendimiento y porcentaje de activo retenido por el complejo (Tabla 2-18).

Tabla 2-18 Condiciones seleccionadas para la obtención de los complejos por medio de extrusión por fusión.

Complejo	Temperatura del barril °C	Velocidad de los tornillos rpm	Tiempo de residencia min
EuB₁₀₀	85	120	30
EuB₇₅Cl₂₅	95	120	15
EuHB₁₀₀	125	60	30
EuHB₇₅Cl₂₅	130	60	15
EuAs₁₀₀	125	120	30
EuAs₇₅Cl₂₅	130	120	15

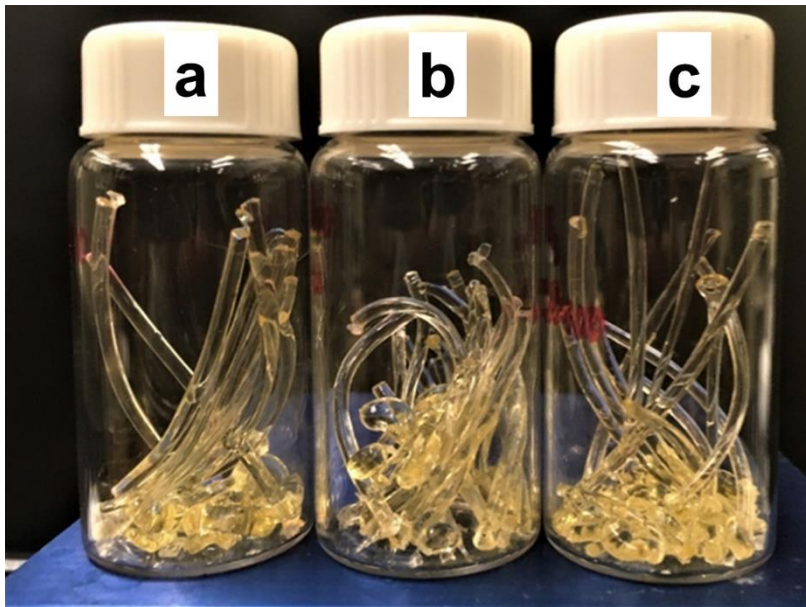
Una vez establecidas las condiciones para la obtención de los CPEs por HME, se elaboró un lote para cada complejo, evaluando las mismas variables respuestas del DEE. En la Tabla 2-19 se muestran los valores medios para las variables rendimiento del proceso y el porcentaje de activo retenido por el complejo, comparados con los valores mínimos y máximos para las mismas variables obtenidos a partir de los resultados del DEE.

Tabla 2-19 Resultados del experimento final bajo las condiciones de extrusión seleccionadas, comparados con los valores máximo y mínimo del DEE aplicado para HME.

Complejo	Porcentaje de rendimiento del proceso (%)			Porcentaje de activo retenido por el complejo (%)		
	Mínimo	Máximo	Condiciones seleccionadas	Mínimo	Máximo	Condiciones seleccionadas
EuB₁₀₀	43,2	59,8	60,2	88,9	92,2	98,2
EuB₇₅Cl₂₅	23,7	57,4	59,7	86,9	92,8	98,3
EuHB₁₀₀	13,2	48,9	52,4	81,8	87,5	97,3
EuHB₇₅Cl₂₅	28,4	72,2	54,3	80,7	86,6	98,1
EuAs₁₀₀	21,8	52,7	60,2	95,4	97,6	96,0
EuAs₇₅Cl₂₅	42,2	54,1	63,4	93,6	97,9	99,6

Los resultados mostrados en la Tabla 2-19 evidencian que las condiciones elegidas para la obtención de CPEs por medio de HME suministran un buen porcentaje de rendimiento y de complejación. En la Figura 2-11, se presentan, a manera de ejemplo, los CPEs EuB₁₀₀, EuB₇₅Cl₂₅ y EuHB₁₀₀ obtenidos por HME.

Figura 2-11 Complejos polielectrolíticos EuB₁₀₀ (a), EuB₇₅Cl₂₅ (b) y EuHB₁₀₀ (c) obtenidos por extrusión por fusión.

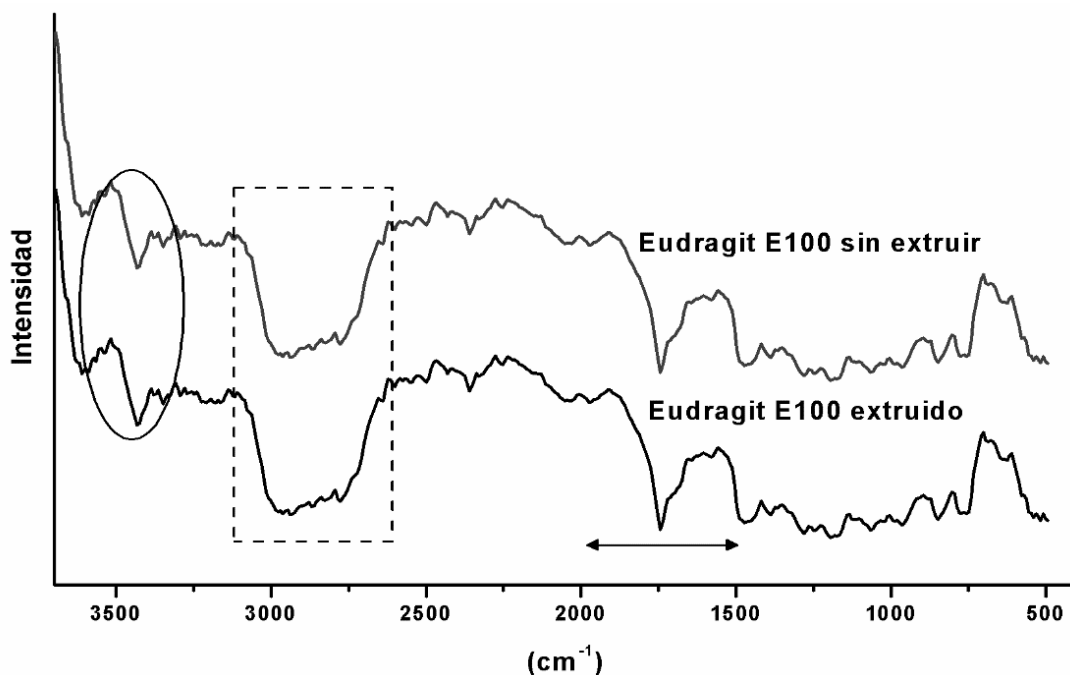


▪ **Caracterización por espectroscopía infrarroja de los CPEs obtenidos por HME**

La caracterización por espectroscopía de infrarrojo se realizó de la misma forma que lo mostrado para los complejos obtenidos por SD.

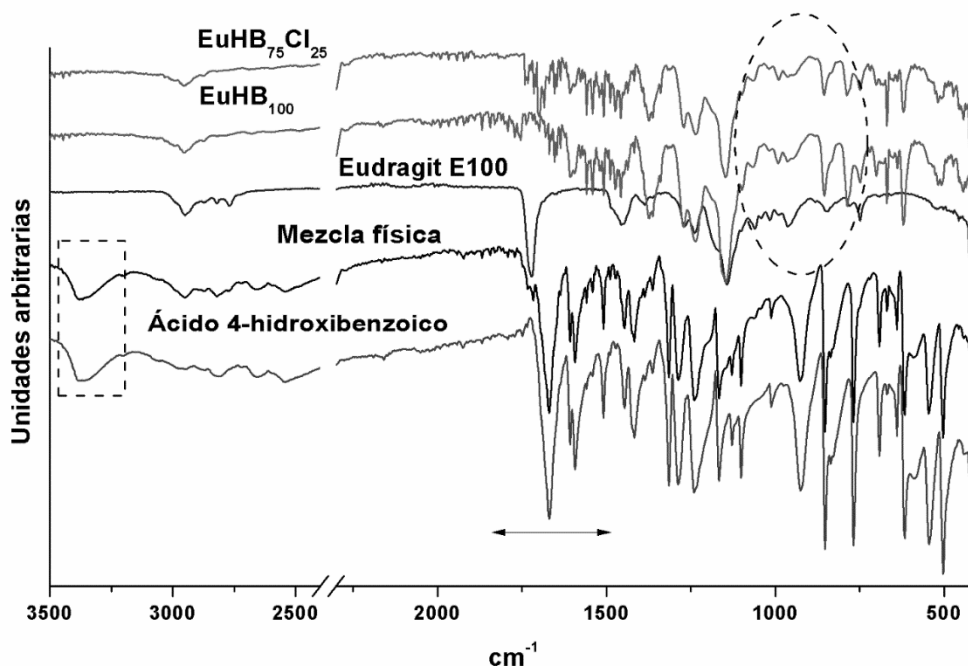
De manera particular, se quiso verificar que el PE no perdiera su integridad molecular al ser extruido. Para ello se sometió a la condición más extrema a emplear (130°C, 120 rpm, 30min). El espectro FTIR demostró que no hubo ningún cambio en las bandas de absorción características del polímero, respecto al PE sin extruir (ver Figura 2-12).

Figura 2-12 Espectro FTIR de Eudragit E100 sin extruir y extruido a 130°C.



Los resultados de los espectros FTIR mostraron el mismo comportamiento que los complejos obtenidos por secado por aspersión, en los que no se observan las bandas del enlace O-H de los ácidos (2550-3400 cm⁻¹), ni las bandas correspondientes a la amina (2800-2400 cm⁻¹) del Eudragit E100. En contraste, las mezclas físicas siguen manteniendo las bandas características tanto para los ácidos y el PE. En la Figura 2-13 se muestra el espectro FTIR del complejo EuHB₁₀₀ y EuHB₇₅Cl₂₅ que confirma lo mencionado. En el anexo A se incluyen los espectros de infrarrojo de los CPEs restantes obtenidos por HME.

Figura 2-13 Espectro de FTIR de EuHB_{100} y $\text{EuHB}_{75}\text{Cl}_{25}$, mezcla física, ácido 4-hidroxibenzoico y Eudragit E100.



Para las dos metodologías empleadas se obtuvieron CPEs, partiendo de Eu y AB, AS, AHB y HCl. En cuanto a las variables de proceso de las dos metodologías, estas fueron diferentes; para SD se tuvieron en cuenta cinco y en HME tres, evidenciando la simplicidad de la metodología de HME en la obtención de CPEs. Se observaron diferencias en el porcentaje de rendimiento del proceso, el cual fue mayor en la metodología de SD en comparación con HME; las características físicas del material producido fueron diferentes, siendo un polvo blanco para los CPEs obtenidos por SD y un sólido cuadrado color ámbar cuando se obtuvo por HME; y hubo diferencias en el porcentaje de activo (ácido) retenido por el CPE, los cuales fueron mayores cuando los CPEs se elaboraron por HME en comparación con SD. Las diferencias en las propiedades medidas de los CPEs relacionadas con la metodología de obtención, y especialmente su apariencia física es un factor que seguramente impactará en su comportamiento fisicoquímico.

2.6 Conclusiones

- El DEE permitió establecer las condiciones de secado por aspersión para los CPEs, las cuales fueron: concentración de la dispersión 15 %p/p y velocidad de flujo de N₂ 400 L/h para todos los CPEs; temperatura de inyección de 120 °C (para CPEs EuB₁₀₀, EuB₇₅Cl₂₅, EuHB₁₀₀, EuHB₇₅Cl₂₅) y de 80°C para EuAs₁₀₀ y EuAs₇₅Cl₂₅; ajuste de alimentación de 30% para EuHB₁₀₀, EuAs₁₀₀ y EuAs₇₅Cl₂₅ y del 10% para EuB₁₀₀, EuB₇₅Cl₂₅ y EuHB₇₅Cl₂₅.
- Los factores que más influyeron sobre las variables respuesta evaluadas, al emplear la metodología de SD, fueron la cantidad de sólidos, la velocidad de flujo de alimentación y la temperatura de entrada.
- La construcción de los diagramas de fas es para los sistemas de Eu y cada uno de los ácidos proporcionó los parámetros de interacción, cuyos resultados confirmaron la miscibilidad de los ácidos en las fracciones utilizadas y también suministró los rangos de temperaturas para los DEE aplicables a la metodología de extrusión por fusión.
- El DEE aplicado en el procedimiento de extrusión por fusión, permitió obtener las condiciones para la producción de los CPEs por esta metodología, las cuales fueron: tiempo de residencia de 30 minutos para los CPEs EuB₁₀₀, EuHB₁₀₀ y EuAs₁₀₀ y de 15 minutos para EuB₇₅Cl₂₅, EuHB₇₅Cl₂₅ y EuAs₇₅Cl₂₅. Velocidad de los tornillos de 120 rpm para los CPEs EuB₁₀₀, EuB₇₅Cl₂₅, EuAs₁₀₀ y EuAs₇₅Cl₂₅, y de 60 rpm para los CPEs EuHB₁₀₀ y EuHB₇₅Cl₂₅.
- Para la metodología de extrusión por fusión, los factores más influyentes sobre el rendimiento del proceso y el porcentaje de activo retenido en el CPE, fueron la velocidad de los tornillos y la temperatura.
- Se obtuvieron CPEs estequiométricos de Eu con AB, AHB y AS en el estado sólido, empleando dos metodologías distintas (SD y HME), que bajo las condiciones seleccionadas se caracterizaron por lograr rendimientos adecuados (mayores para

SD), tener altos porcentajes de activo retenido en el CPE (especialmente para HME) y por evidenciar la formación de la interacción iónica entre el Eu y cada uno de los ácidos estudiados.

3. Determinación de las propiedades fisicoquímicas

La formación y la estabilidad de los CPEs dependen de muchos factores, incluido el grado de ionización de cada uno de los PE, la distribución de carga sobre las cadenas poliméricas, la concentración de los PE, la relación de mezcla, la naturaleza y la posición de los grupos iónicos, el peso molecular de los PE, la flexibilidad de la cadena del polímero, así como de la temperatura, la fuerza iónica y el pH del medio de reacción (158).

Una vez formado el CPE, las propiedades que muestran son diferentes a sus precursores, tanto en el estado sólido como en dispersión; estas propiedades tienen incidencia en diferentes aplicaciones como son: la mejora de la solubilidad y de la estabilidad de activos, la modulación en la liberación, entre otros. Una completa caracterización de las propiedades fisicoquímicas de los CPEs, permite entender cómo los factores de obtención y su composición afectan dichas propiedades y cómo se pueden modificar en función de la aplicación deseada.

3.1 Metodología

3.1.1 Materiales

Fosfato monobásico de potasio (grado reactivo, J.T. Baker); hidróxido de sodio y ácido clorhídrico (grado reactivo, Merck); Eudragit E100 (grado farmacéutico, marca Evonik Industries adquirido a Almapal-Bogotá-Colombia); ácido benzoico (99% de pureza), ácido salicílico (99% de pureza) y ácido 4-hidroxibenzoico (98% de pureza) que fueron comprados a Merck; y membrana de acetato de celulosa con peso molecular de 12 kDa (Sigma®). Adicionalmente, los doce CPEs obtenidos en el capítulo anterior (seis obtenidos por HME y seis obtenidos por SD). En todos los experimentos se empleó agua desionizada (conductividad menor de 5,5 $\mu\text{S/m}$).

3.1.2 Métodos

A continuación, se presenta la caracterización realizada a los diferentes CPEs formados entre Eu y los AB, AHB, AS y el ácido clorhídrico, obtenidos por las dos metodologías (HME y SD). En una primera parte, se muestra la caracterización en el estado sólido de todos los complejos, seguido de la caracterización en dispersión acuosa para los CPEs que presentaron mayor afinidad por el agua.

3.2 Caracterización en el estado sólido

Respecto a la caracterización fisicoquímica de algunas propiedades de los CPEs en el estado sólido, se realizaron los ensayos de difracción de rayos X en polvo (en inglés, X-Ray Powder Diffraction o XRPD), calorimetría diferencial de barrido (en inglés, Differential Scanning Calorimetry o DSC), espectrometría de fotoelectrones inducidos por rayos X (en inglés, X-Ray Photoelectron Spectrometry, o XPS), microscopía electrónica de barrido (en inglés, Scanning Electron Microscopy o SEM), y distribución de tamaño de partícula.

3.2.1 Difracción de rayos X en polvo (XRPD)

Los difractogramas de los CPEs en polvo, se determinaron empleando un difractómetro Rigaku SmartLab (Rigaku Americas, The Woodlands Texas) en modo Bragg-Brentano con una fuente de radiación Cu- α y un ultra detector d/tex. Para sostener las muestras se empleó un soporte de vidrio. Los difractogramas se obtuvieron en un rango de barrido de 5 a 50 ° ($2\theta / \theta$), usando un tamaño de paso de 0,02 ° y una velocidad de exploración de 5°/min.

3.2.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se evaluó el comportamiento térmico de las muestras mediante calorimetría diferencial de barrido (Equipo modelo 822e Mettler Toledo). El análisis se realizó bajo atmósfera de nitrógeno (flujo 50 ml/min) en un rango de temperatura entre 10 a 240°C. La rampa de calentamiento empleada fue de 10°C/min. Se pesó aproximadamente 5 mg de cada muestra de polímero, complejo o mezcla física en una balanza (Mettler Toledo ME204). Cada una de las muestras fue dispuesta en crisoles de aluminio con tapa, cerradas herméticamente con una prensa (Mettler Toledo).

3.2.3 Espectrometría de fotoelectrones inducidos por rayos X (XPS)

El análisis por XPS se llevó a cabo en un espectrómetro Kratos Axis Ultra DLD con radiación monocromática de Al K α (1486,6 eV), a una energía de paso de 20 y 160 eV, para los espectros de alta resolución y estudio, respectivamente. Se empleó un neutralizador de carga Kratos comercial para evitar la carga eléctrica no homogénea del polvo no conductor y para lograr una mejor resolución. La resolución medida como ancho total en la mitad del máximo de la curva, ajustada a los picos C 1s y N 1s fue de aproximadamente 1 eV. Los valores de energía de unión (BE), referidos al borde de Fermi y la escala de energía, se calibraron utilizando Au 4f_{7/2} a 84,00 eV y Cu 2p_{3/2} a 932,67 eV. El ajuste de la curva se realizó después de una sustracción de fondo lineal (N 1s), empleando líneas de Lorentzian asimétricas con 80% de contribución gaussiana (forma de línea CasaXPS: LA (1.53,243)).

3.2.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se empleó SEM para estudiar la morfología de la superficie de los CPEs. Las muestras se recubrieron con oro-paladio, y la microscopía se realizó con un equipo FEI Nova NanoSEM 450 USA, que operó a un voltaje de aceleración de 15 kV.

3.2.5 Distribución de tamaño de partícula

La distribución del tamaño de la partícula se determinó mediante la técnica de difracción de luz con un láser He-Ne (Mastersizer 3000, Malvern Instruments, UK). Las muestras se hicieron pasar a través de un Venturi con aire comprimido (Unidad Aero S, Malvern Instruments, UK). La distribución del tamaño de las partículas se obtuvo mediante un programa informático suministrado por el fabricante y su tamaño medio se expresó como el diámetro medio del volumen, en micrómetros. Las mediciones se llevaron a cabo por triplicado y se reportaron los valores promedio.

3.3 Caracterización en dispersión

Para la evaluación de las propiedades fisicoquímicas de los CPEs en dispersión, se determinaron la solubilidad, el potencial ζ y el comportamiento de liberación de cada uno de los activos a partir de los sistemas estudiados.

3.3.1 Solubilidad

La solubilidad cualitativa se determinó para los doce complejos, por medio de tres metodologías, que se presentan a continuación. Adicionalmente, se determinó la solubilidad hasta saturación, que corresponde a la cantidad máxima aceptada de cada complejo en agua.

▪ **Primera metodología**

Se prepararon dispersiones acuosas de los CPEs que se llevaron a un volumen final de 3 ml, logrando una concentración de 3,3 % del CPE en el sistema. Las dispersiones se colocaron en tubos de volumen aproximado de 10 ml, que fueron mantenidos bajo agitación mecánica, en un baño a $25^{\circ}\text{C} \pm 0,05^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas (Ind. Céntrico). A las 24 h, según su apariencia, se clasificaron de acuerdo con las categorías de solubilidad cualitativa descritas en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) (159).

▪ **Segunda metodología**

Se prepararon dispersiones acuosas de los CPEs que se llevaron a un volumen final de 3 ml, alcanzando una concentración de los ácidos (benzoico, salicílico y 4-hidroxibenzoico) equivalente al 0,6%. Las dispersiones se agitaron por 24 horas a $25^{\circ}\text{C} \pm 0,05^{\circ}\text{C}$ (Ind. Céntrico). Adicionalmente se determinó el pH final (Hanna HI 2221) para cada una de las dispersiones, y se observó si se disolvían completamente o no en la concentración evaluada. Se realizaron tres réplicas por ensayo.

▪ **Tercera metodología**

Los CPEs se dispersaron en soluciones buffer de fosfato de potasio a pH 5,8 – 6,0 – 6,3 – 6,6 – 6,9 – 7,2 – 7,6 y 8,0, a una concentración de los ácidos (benzoico, salicílico y 4-hidroxibenzoico) equivalente al 0,6% y al final del ensayo se les determinó el pH (Hanna HI 2221). Se observó la apariencia de cada dispersión y se clasificó en soluble, parcialmente soluble e insoluble. De manera similar, se realizaron dispersiones de los CPEs sin buffer, ajustando el pH mediante la adición de solución de NaOH al 1M en el medio acuoso. 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, a las mismas condiciones de temperatura y agitación de la segunda metodología.

▪ **Cantidad máxima aceptada de complejo en agua**

Se siguió la metodología empleada por Dallos (2019) (21), en la cual se estableció la capacidad que tiene un volumen fijo de agua para aceptar diferentes cantidades de cada uno de los complejos. Para esto, en tubos tapa rosca se incluyeron 2 ml de agua en cada uno, se les adicionó de manera continua 150 mg de cada CPE, cada 24 horas hasta que al sistema no se le pudiera incorporar más sólido. La temperatura se mantuvo a $25,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ de temperatura, con agitación mecánica constante (Ind. Céntrico). Los resultados fueron expresados como la cantidad de complejo aceptada por mililitro de agua (en gramos) y en el equivalente en masa de los ácidos para cada uno de los sistemas.

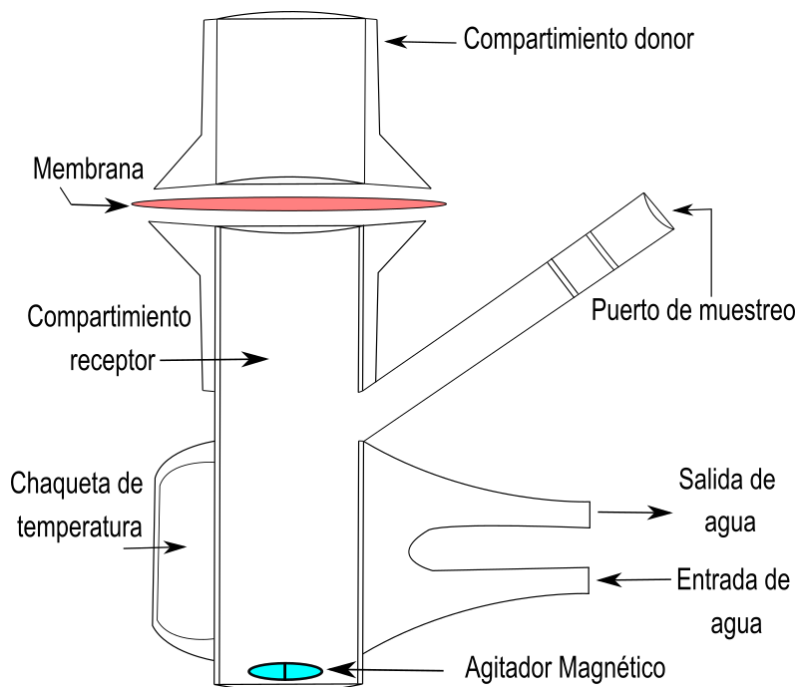
3.3.2 Evaluación del potencial ζ

El potencial ζ de las dispersiones de los CPEs se determinó mediante un equipo Zetasizer nano ZS con láser rojo (633 nm) He / Ne de Malvern Instrument UK. Se prepararon dispersiones de los CPEs al 0,06% en ácido con NaCl 10mM y, se analizaron 15 minutos después de preparadas. Las condiciones de lectura en el equipo fueron, tiempo de equilibrio de 60 segundos, 5 mediciones, 20 corridas manuales, temperatura 25°C , índice de refracción 1,33 (agua desionizada $\sim 18 \text{ Mohm cm}$), en una celda universal Dip, haciendo el ensayo por triplicado.

3.3.3 Comportamiento de liberación de los CPEs

La evaluación de la liberación *in vitro* de los ácidos desde dispersiones de CPEs, se realizó mediante celdas de difusión bicompartimentales tipo Franz de volumen $58 \pm 1 \text{ ml}$ en el compartimento receptor y área en la zona de contacto de los dos compartimentos de $3,51 \text{ cm}^2$ (Silicer SAS - Figura 3-1). Los dos compartimentos, uno donador y otro receptor, estaban separados por una membrana de diálisis que permite la difusión de la molécula activa (de menor tamaño molecular) y retiene las moléculas de mayor tamaño.

Figura 3-1 Representación de una celda de Franz y partes que la conforman (fuente: Elaboración propia).



Para la evaluación del comportamiento de liberación se siguió la metodología de Baena et al., 2011 (52), haciendo algunas modificaciones. Las condiciones operacionales fueron temperatura $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, velocidad de agitación 400 rpm, volumen de muestreo 2 ml, concentración de los CPEs 0,6% en equivalente de ácido, volumen del compartimento donador de 1ml, volumen del receptor 58 ± 1 ml y una membrana de diálisis (12000 Da, Sigma). El medio receptor correspondió a buffers acuosos de fosfato de potasio ajustado a pH 6,0 – 6,9 y agua grado cromatográfico (Tipo I, conductibilidad $< 0,5 \mu\text{S/cm}$). La frecuencia de muestreo fue de 15 minutos durante la primera hora, 30 minutos en la segunda hora y de ahí en adelante cada hora hasta completar 8 horas. La evaluación se realizó por triplicado y la cuantificación de cada ácido se realizó por espectrofotometría UV (espectrómetro de barrido UV-Visible, Shimadzu 1800), siguiendo metodologías analíticas que ya estaban validadas al interior del grupo de investigación.

El estudio del comportamiento de liberación de los ácidos benzoico, salicílico y 4-hidroxibenzoico desde los CPEs, se analizó por medio de los modelos matemáticos de orden cero, orden uno, Higuchi y Korsmeyer-Peppas, que se explican más detalladamente en los resultados.

El análisis comparativo de los perfiles obtenidos se realizó mediante el cálculo de los factores de similitud f_2 (Ecuación 3-1) y de diferencia f_1 (Ecuación 3-2).

$$f_2 = 50 \cdot \text{Log} \left\{ \frac{100}{\left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{0.5}} \right\} \quad (3-1)$$

$$f_1 = \left[\frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum_{t=1}^n R_t} \right] * 100 \quad (3-2)$$

Donde n es el número de puntos de tiempo evaluados, R_t es el valor de porcentaje liberado del ensayo que se tome como referencia en el momento t , y T_t es el valor de porcentaje liberado del ensayo que se tome como prueba en el mismo tiempo t . Para que las curvas se consideren prácticamente iguales, los valores de f_1 deben estar cerca de 0, y los valores de f_2 deben estar cerca de 100. Por lo general, los valores de f_1 hasta 15 (0-15) y los valores de f_2 mayores que 50 (50-100) aseguran diferencia (f_1) o similitud (f_2) estadística, respectivamente, de los dos perfiles (160).

3.4 Presentación y discusión de los resultados

Los resultados de la caracterización fisicoquímica de acuerdo con lo planteado en la metodología están divididos en dos partes: la caracterización en el estado sólido y la caracterización en dispersión.

3.5 Caracterización en el estado sólido

Como se indicó en la metodología, la caracterización fisicoquímica de los CPEs en el estado sólido se realizó mediante los ensayos de XRPD, DSC, XPS, SEM y distribución de tamaño de partícula. Estas caracterizaciones contribuyeron al entendimiento de la asociación electrostática entre el PE y cada uno de los ácidos estudiados, así como acerca de su posible afectación por la metodología de obtención. Adicionalmente, este estudio dio insumos para la comprensión de las propiedades de los CPEs a nivel macro, que pudieran afectar su futura aplicación a nivel industrial.

3.5.1 Difracción de rayos X (XRPD)

La difracción de rayos X se ha descrito como el estándar para la caracterización de materiales farmacéuticos en el estado sólido (161). Cuando se utiliza XRPD se obtiene información importante sobre los materiales, como la evaluación de los cambios en la cristalinidad y el polimorfismo de los sistemas después de la fabricación o durante los estudios de estabilidad. En las Figuras 3-2, 3-3 y 3-4 se comparan los patrones de XRPD

de los CPEs que contienen AB, obtenidos por las metodologías HME y SD, con sus respectivos materiales de partida y la mezcla física entre ellos.

Figura 3-2 Patrones de XRPD de los complejos con ácido benzoico (AB) obtenidos por extrusión por fusión (HME) y secado por aspersión (SD), los precursores y la mezcla física.

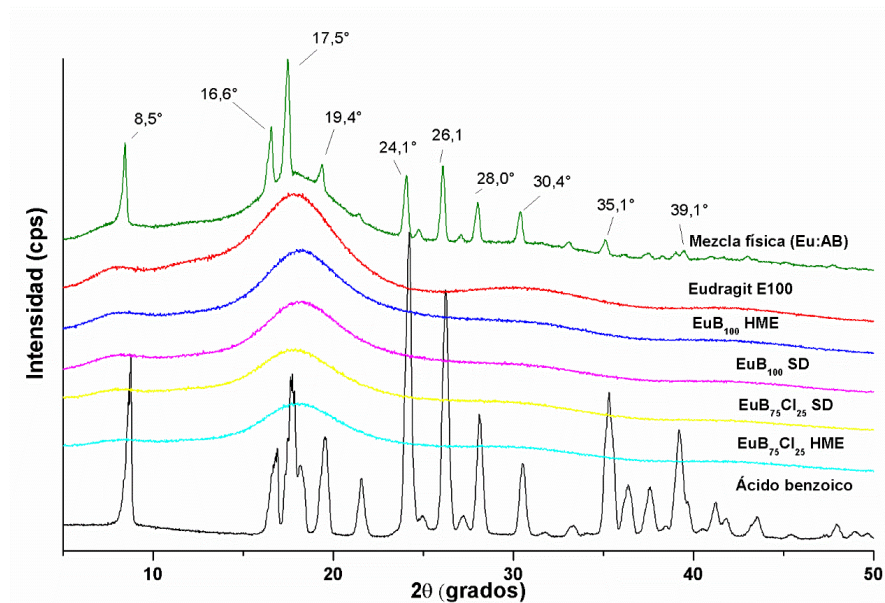


Figura 3-3 Patrones de XRPD de los complejos con ácido salicílico (AS) obtenidos por extrusión por fusión (HME) y secado por aspersión (SD), los precursores y la mezcla física.

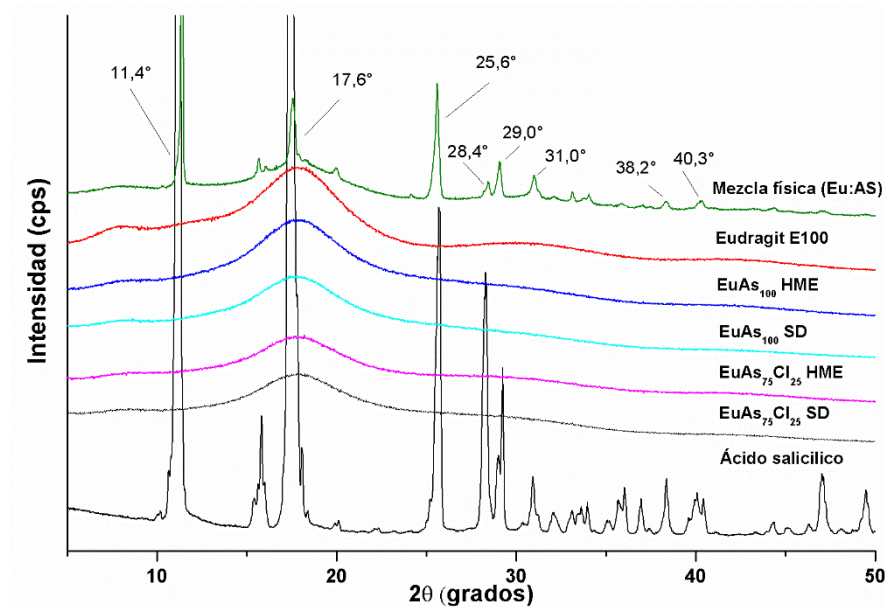
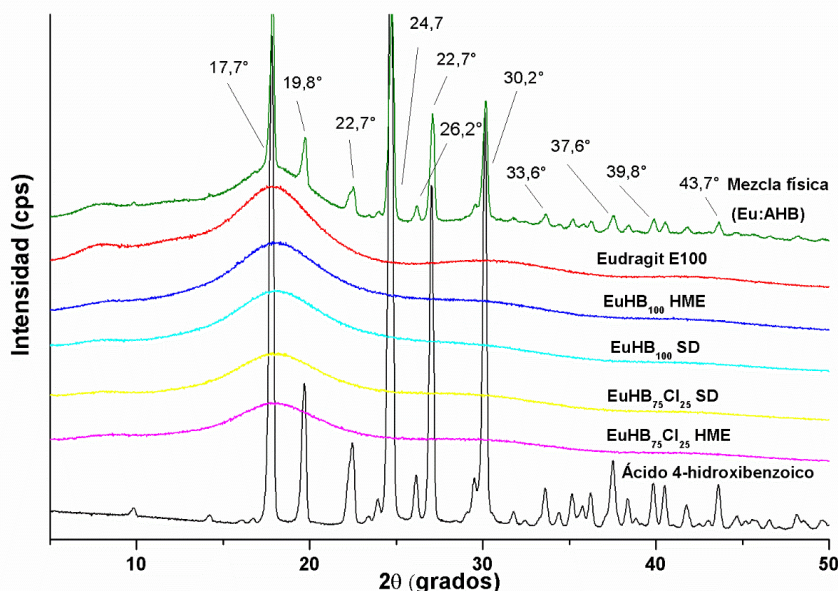


Figura 3-4 Patrones de XRPD de los complejos con ácido 4-hidroxibenzoico (AHB) obtenidos por extrusión por fusión (HME) y secado por aspersión (SD), los precursores y la mezcla física.



Los tres ácidos empleados, muestran en su difractograma patrones propios de materiales cristalinos, con señales bien definidas. Así el AB (Figura 3-2) tiene señales a 8,8° 16,9° 17,6° 19,5° 21,5° 24,2° 26,2° 28,1° 30,6° 35,3° 36,4° 37,6° y 39,2°; el AS (Figura 3-3) con señales a 11,4° 17,6° 25,6° 28,4° 29,0° 31,0° 38,2° y 40,3°; y el AHB tiene señales a 17,7° 19,8° 22,7° 24,7° 26,2° 30,2° 33,6° 37,6° 39,8° y 43,7°(Figura 3-4), las cuales concuerdan con lo reportado en otras investigaciones (162–165). Para el caso del Eu, su difractograma presenta un comportamiento representativo de un material amorfo, distinguiéndose tres picos anchos a 7,9° 17,8° 31,0° y 42,5° (Figuras 3-2, 3-3 y 3-4); este patrón coincide con lo publicado previamente para el Eu (55,166–169).

Para las mezclas físicas, los difractogramas exhibieron la sumatoria de las señales de los materiales que las componen, en los que claramente se distinguen las señales del AB, AS y AHB (ver Figuras 3-2, 3-3 y 3-4); estas señales se muestran sobre el difractograma formado por el polímero Eu.

Los doce CPEs (EuB₁₀₀, EuB₇₅Cl₂₅, EuAs₁₀₀, EuAs₇₅Cl₂₅, EuHB₁₀₀, EuHB₇₅Cl₂₅) obtenidos por HME y SD, evidenciaron en sus difractogramas patrones de señales típicas de un material amorfo parecido al del Eu, sin presentar ninguna señal relacionada con los ácidos empleados. Adicionalmente, se pudo constatar que la intensidad del patrón de XRPD disminuyó para todos los complejos en comparación con el Eu. Tomando como punto de

referencia el valor de $17,8^\circ$ en el difractograma del Eu y comparándolo con los CPEs (Tabla 3-1), la intensidad disminuye cuando el PE interactúa, además del ácido orgánico correspondiente, con los iones cloruro. Este cambio en la intensidad puede deberse a un proceso de hidrólisis de los ésteres del Eu por la presencia del HCl empleado como un neutralizante adicional en la formación del CPE, como lo evidenció Dallos et al., 2019 (22), generando una posible desestructuración de la organización del polímero y por lo tanto una reducción en la intensidad de la señal. Esto ocurre para ambas metodologías de obtención, aunque la disminución es más pronunciada para HME. Esta disminución, puede deberse a un mayor tiempo de exposición a altas temperaturas (15 o 30 minutos) cuando se emplea HME, favoreciendo la hidrólisis, en comparación con lo que ocurre en el proceso por SD en el que esta exposición se da por un tiempo muy corto (menos de 1 segundo).

Tabla 3-1 Intensidad de la señal a $17,8^\circ$ en los difractogramas obtenidos a partir de los complejos producidos por secado por aspersion y extrusión por fusión.

Secado por aspersion		Extrusión por fusión	
Complejos	Intensidad (cps)	Complejos	Intensidad (cps)
EuHB₁₀₀	56483,33	EuAs₁₀₀	66410,00
EuAs₁₀₀	55113,33	EuHB₁₀₀	63596,66
EuB₁₀₀	52396,66	EuB₁₀₀	59573,33
EuHB₇₅Cl₂₅	48246,66	EuAs₇₅Cl₂₅	47300,00
EuAs₇₅Cl₂₅	47180,00	EuHB₇₅Cl₂₅	43780,00
EuB₇₅Cl₂₅	46140,00	EuB₇₅Cl₂₅	40786,66
Eudragit E100*	69846,67		

* Polímero

La ausencia de señales correspondientes a los ácidos en los difractogramas de los CPEs, indica la obtención de dispersiones sólidas amorfas (DSA), en las cuales el activo (ácido) está disperso a nivel molecular en la matriz polimérica del Eu; lo que era de esperarse dado que ambas metodologías, HME y SD, conducen a la producción de este tipo de sistemas (170).

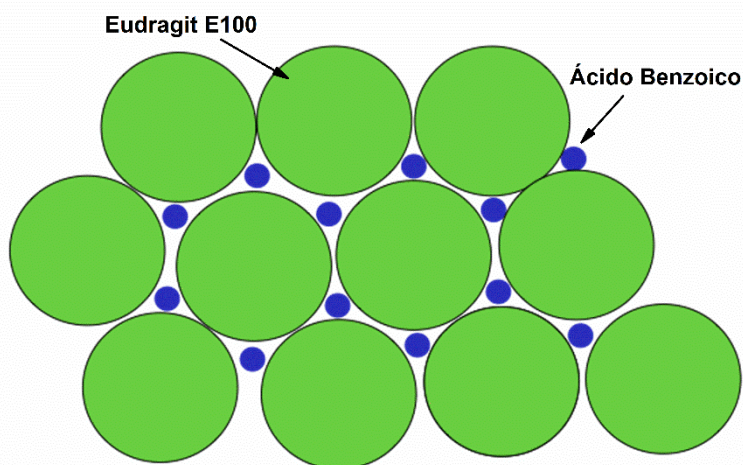
El término "dispersión sólida" fue introducido por Chiou y Riegelmann en 1971, quienes la definieron como "una dispersión de uno o más ingredientes activos en un vehículo inerte en estado sólido" (171). Estas dispersiones se pueden clasificar teniendo en cuenta el estado del activo (amorfo o cristalino) a dispersar y las fases que la componen. En la Tabla 3-2 se muestra la clasificación (171).

Tabla 3-2 Clasificación de las dispersiones sólidas según el número de fases y el estado del activo disperso.

Estado del activo	Número de fases	
	1	2
Cristalino	Solución sólida	Mezcla eutéctica
Amorfo	Solución de vidrio	Suspensión de vidrio

Todos los CPEs obtenidos, se encuentran clasificados como una solución sólida en donde el ácido está incorporado en la red polimérica del Eu y del EuCl_{25} . Adicionalmente, por el tamaño menor de los ácidos en comparación con el polímero, estos sistemas se consideran soluciones sólidas intersticiales. En este caso las moléculas de activo tienen la posibilidad de ocupar los espacios intersticiales en la red polimérica (Figura 3-5).

Figura 3-5 Representación de las soluciones sólidas intersticiales adaptada de Sandhu et al., 2014 (170).



Lograr DSAs verificadas por XRPD, no demuestra la generación de los CPEs, dado que solo evidencia que el activo está en dispersión dentro del PE. En la Tabla 3-3 se muestran algunos estudios previos, donde se ha demostrado la formación DSAs por XRPD, en los cuales la serie de polímeros Eudragit E (Eudragit E100, Eudragit E PO) se emplearon y no interaccionaron con el activo.

Tabla 3-3 Estudios de XRPD para dispersiones sólidas con Eudragit E100.

Autores	Año	Dispersión solida	DRX Resultado
Al-Shdefat, Ramadan	2016	Sildenafil citrato-Eu	En mezclas 1:2 se formó un sistema amorfo.

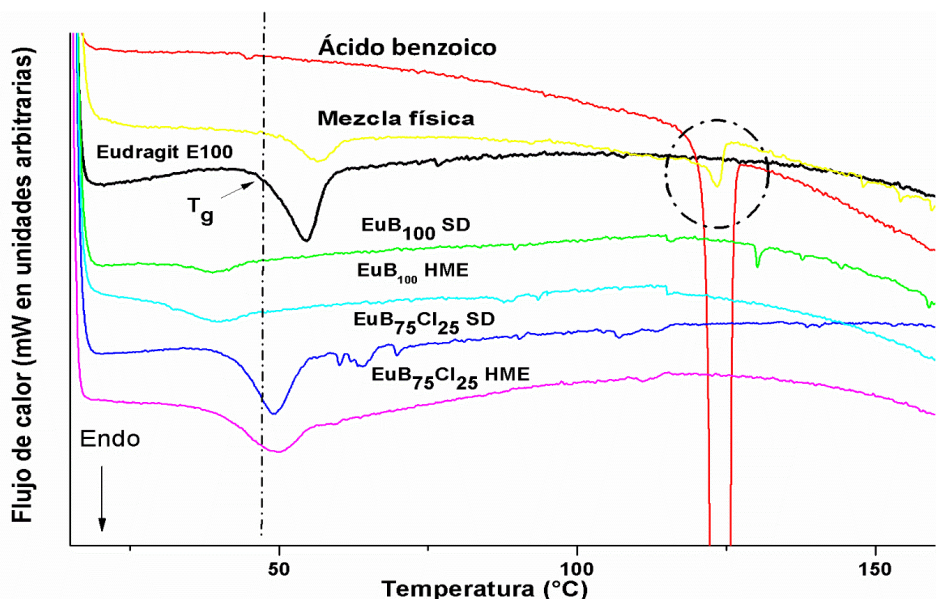
y col (172)			
Pradhan, Roshan y col (168)	2016	Valsartán-Eu PO-Polaxamer 47	Se evidenció una dispersión del valsartán en los polímeros.
He, Haibing y col (167)	2010	Fenofibrato-Eu,	El fenofibrato se dispersa en un estado amorfo o molecular en el Eu.
Six, K y col (173)	2003	Itraconazol – Eu	Se dispersó el itraconazol en el Eu, sin interacción.

Sin embargo, que el activo esté disperso a nivel molecular es el primer paso requerido para que se logre la interacción con el polímero, siempre y cuando estos tengan los grupos funcionales que lo permitan, como sucede para los CPEs de este estudio. Por esta razón, la técnica de difracción de rayos X es complementaria, y no puede ser empleada como herramienta única para comprobar la interacción iónica en la formación de este tipo de complejos, que como se explicó en el Capítulo 2, se demostró por IR.

3.5.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

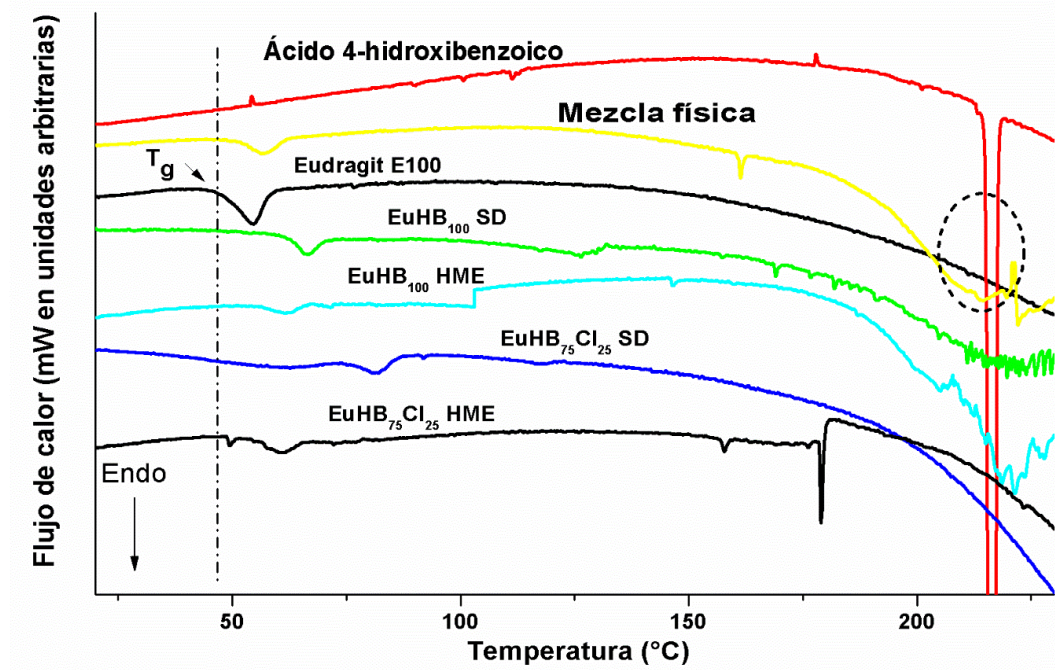
Los resultados de los análisis de calorimetría diferencial de barrido se presentan en las Figuras 3-6, 3-7 y 3-8. En el eje X se graficó la temperatura, en grados Celsius y en el eje Y el flujo de calor en mili vatios (mW). En cada una de ellas se muestran los termogramas del Eu, de los CPEs, de la mezcla física y del ácido empleado.

Figura 3-6 Termogramas de los complejos obtenidos por secado por aspersión (SD) y extrusión por fusión (HME), que incluyen al ácido benzoico (B) y al Eudragit E100 (Eu).



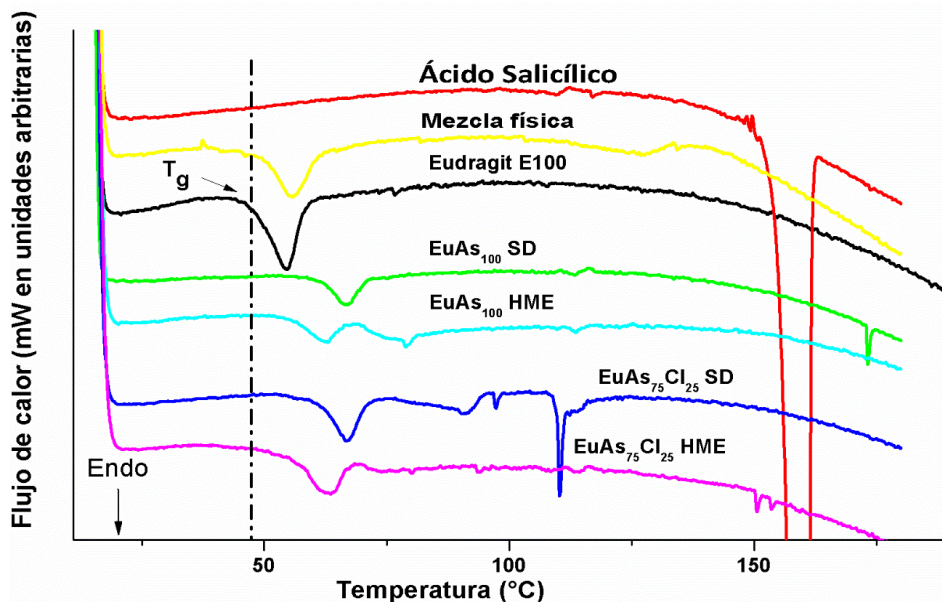
En la Figura 3-6, en el termograma que corresponde al AB se puede observar la endoterma de la transición termodinámica, del paso de sólido a líquido (temperatura de fusión T_m). Este evento térmico inicia en 122,5°C y su máximo de pico se da a 124,47°C, estos datos concuerdan con lo previamente reportado para este ácido (174,175). De manera similar, en las Figuras 3-7 y 3-8 se presentan los termogramas del AS y del AHB, con temperaturas de fusión de 156,0°C y 214,5°C, respectivamente, semejante a lo encontrado en la literatura científica (71,176). Para los ácidos en los diferentes termogramas, la forma del pico confirma su estado cristalino. En el rango de temperatura evaluado para cada uno de los sistemas no se evidenció degradación o algún otro tipo de fenómeno termodinámico.

Figura 3-7 Termogramas de los complejos obtenidos por secado por aspersión (SD) y extrusión por fusión (HME), que incluyen al ácido 4-hidroxibenzoico (HB) y al Eudragit E100 (Eu).



En cada una de las Figuras 3-6, 3-7 y 3-8, se presenta el termograma para el polímero Eu, este tuvo su pico más pronunciado a 54,5°C y su T_g fue de 46,0°C, este valor se encuentra dentro el rango declarado por el fabricante (45 ± 5°C) y acorde con los publicado en investigaciones previas (61,177,178).

Figura 3-8 Termogramas de los complejos obtenidos por secado por aspersión (SD) y extrusión por fusión (HME), que incluyen al ácido salicílico (AS) y al Eudragit E100 (Eu).



Los termogramas de las mezclas físicas, entre Eu y los ácidos (Figura 3-6, 3-7 y 3-8) presentaron un pico endotérmico con un inicio que estuvo entre los 46 a 52°C, el cual está asociado a la T_g del Eu (Tabla 3-4). Solamente la mezcla física de Eu y AB mostró un segundo pico endotérmico a 121,4°C relacionado con el punto de fusión del AB, aunque con menos intensidad debido a que a esta temperatura no todas las cadenas del polímero están abiertas y la inclusión del AB en la matriz polímero no es completa. Para los otros dos sistemas, posiblemente la temperatura (156°C para AS/Eu y 215°C para AHB/Eu) ayudó al desdoblamiento de las cadenas del Eu, favoreciendo la inclusión de los ácidos en la matriz polimérica y por este motivo no se observó un segundo pico endotérmico.

La disminución o el ensanchamiento del pico del ácido en las mezclas, se debe a la interacción entre el polímero y el ácido propiciada por las condiciones del ensayo de DSC, donde el aumento de temperatura desdobra las cadenas poliméricas y facilita la inmersión del ácido en la matriz; fenómeno ya reportado en procesos de obtención de dispersiones sólidas (131,179–182).

Adicionalmente, en la mezcla física hay un aumento en la T_g en comparación con la T_g del polímero sin mezclar. Este aumento está relacionado con el punto de fusión del ácido; en el momento del desdoblamiento de las cadenas del polímero, la penetración del ácido dependerá de la cantidad de energía necesaria para que los cristales comiencen a fundirse

y hacer parte de la matriz polimérica. Así, cuanto mayor es el punto de fusión del ácido mayor será el cambio en la Tg (Tabla 3-4).

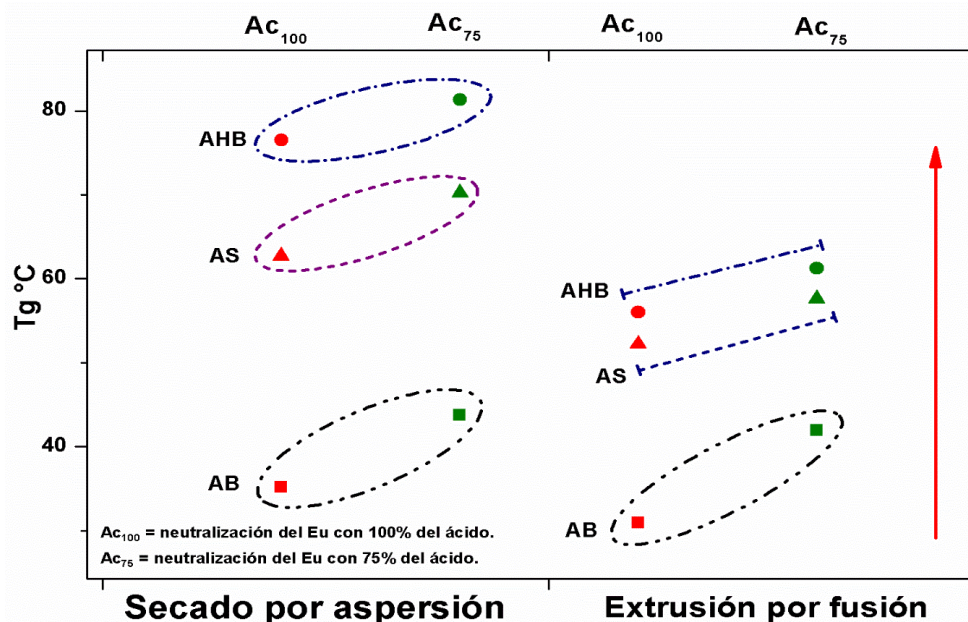
Tabla 3-4 Picos endotérmicos mostrados para las mezclas físicas del polímero y los ácidos en comparación del polímero sin mezclar, mediante el ensayo de DSC.

Material	Ubicación de picos	
	Tg (°C)	Tm (°C)
Mezcla física Eu:AB	46,88°C	119,77°C
Mezcla física Eu:AS	50,81°C	N.O
Mezcla física Eu:AHB	52,63°C	N.O
Eudragit E100 puro	46,00°C	---

N.O = no observable

En cuanto al análisis de los termogramas de los CPEs (Figura 3-9), se observó un pico endotérmico de baja intensidad en el rango de 33°C a 86°C para todos los complejos, el cual está relacionado con la Tg del Eu; resultados similares se han reportado previamente (166,178). Este pico aparece a una menor temperatura con respecto a la Tg del Eu, solo para los complejos del AB. De manera general los CPEs obtenidos por HME presentan dicho pico a una menor temperatura en comparación con lo observado para los complejos elaborados por SD.

Figura 3-9 Relación entre la Tg (°C) de los complejos y las técnicas de obtención empleadas.



La disminución de la Tg de los CPEs que incluyen al AB, ha sido reportado en estudios previos (18,183–186). Estas investigaciones demostraron que la adición de compuestos

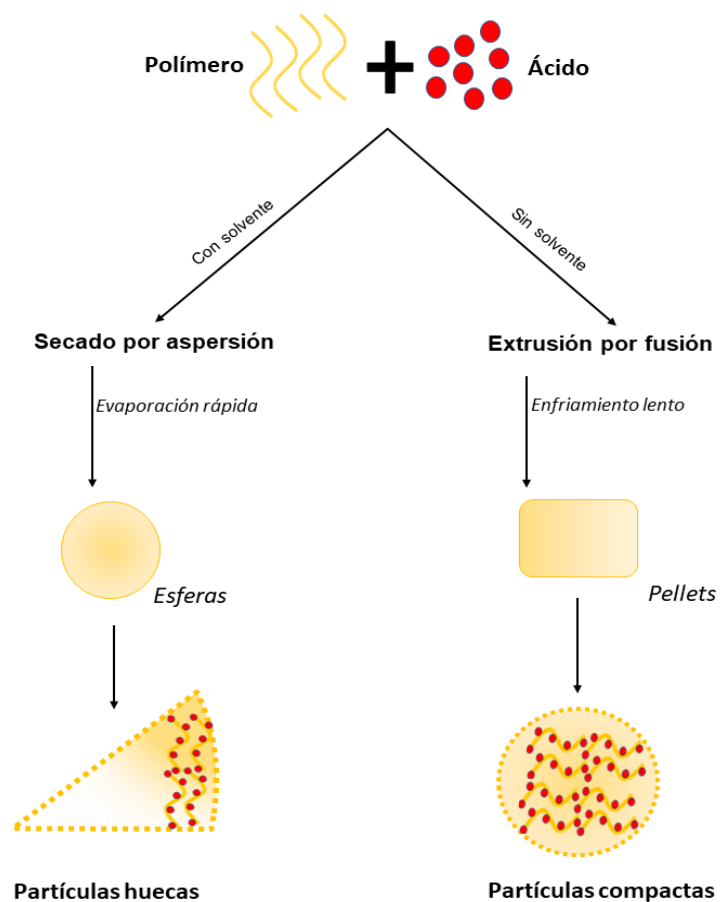
orgánicos a polímeros reduce el valor de su Tg. Esto es atribuido a que dichas moléculas se ubican entre las cadenas poliméricas, aumentando el espacio entre ellas debido a su volumen molar (para AB de $102,0 \pm 3,0 \text{ cm}^3$) (175), produciendo una mayor movilidad y disminuyendo las fuerzas cohesivas entre ellas, necesitando así menos energía para el paso del estado vítreo a uno más fluido (“cauchoso”). Caso contrario ocurre con los CPEs formados con AS y AHB, en los que hay un aumento de la Tg. Este comportamiento se puede deber al menor volumen molar de estos ácidos ($100,4 \pm 3 \text{ cm}^3$ para ambos)(187,188), impactando en menor proporción al volumen libre entre las cadenas y por lo tanto manteniendo más compacto el sistema en comparación con los obtenidos con AB. Por otra parte, la temperatura de fusión de los ácidos (AS = $158,0^\circ\text{C}$ y AHB = $215,0^\circ\text{C}$) influye notoriamente en este desplazamiento, debido al mayor requerimiento de energía para que el entramado polimérico se “ablande” cuando están presentes estos ácidos en la matriz del polímero, lo que se refleja en un valor más alto de la Tg.

La neutralización de los CPEs con el ion cloruro, aumentó la Tg para todos los sistemas, lo que pudo deberse al pequeño tamaño de este ion ($0,181 \text{ nm}$)(189), que facilita una mayor interacción con los grupos dietilamino del Eu en comparación con los aniones de los ácidos orgánicos. Esta mayor interacción conduce a una compactación de la red polimérica por disminución del volumen libre, reflejándose en el termograma en una Tg mayor.

Con respecto a la técnica de obtención, la Tg fue mayor para los CPEs que se obtuvieron por SD en comparación con los elaborados por HME. Esta diferencia en las dos metodologías es causada principalmente por la estructura de las partículas formadas. La técnica de secado por aspersión puede generar diferentes tipos de partículas (Figura 3-10), lo cual dependerá de la velocidad de secado y la interacción entre los materiales; para los CPEs de este estudio, el proceso de elaboración permitió obtener partículas esféricas y huecas para todos los complejos. Estas características dificultan la conducción del calor a través del material, lo que hace necesario un suministro de mayor energía para superar la temperatura de transición vítrea del CPE.

Para los procesos llevados a cabo por HME, el material que se obtiene es sólido y compacto porque no hay formación de espacios al interior de las partículas (Figura 3-10), debido al ablandamiento del polímero y a la inclusión del activo en la matriz polimérica; al no tener espacios intra-partícula la conducción del calor es homogénea, promoviendo una rápida transición desde el estado vítreo hasta el estado “cauchoso” en comparación con las partículas de secado por aspersión.

Figura 3-10 Representación esquemática de las partículas de los complejos obtenidos por secado por aspersión y extrusión por fusión.



Además del desplazamiento de la T_g , el segundo fenómeno presentado consistió en la desaparición del pico endotérmico de la fusión del ácido en todos los complejos. Este comportamiento evidencia la distribución a nivel molecular del activo en el polímero, lo que se ha demostrado en sistemas similares de CPEs (55,190–192).

La técnica de DSC no tiene el alcance para indicar si hay interacciones entre el ácido y el polímero, pero nos da información sobre el número de fases presentes en el sistema.

3.4.3 Espectrometría de fotoelectrones inducidos por rayos X (XPS)

La espectroscopía de fotoelectrones inducidos por rayos X, ha demostrado ser una poderosa herramienta para la caracterización química de superficies con una notable sensibilidad para todos los elementos, con excepción del hidrógeno y del helio (193), basándose en las concentraciones atómicas. Un espectro XPS es específico para las energías de unión química (BE, por sus siglas en inglés) de la mayoría de los elementos de interés en compuestos orgánicos.

El cambio en la BE en un compuesto, se puede aprovechar para estudiar las interacciones de dicho compuesto en una mezcla, por ejemplo entre fármacos y polímeros en sistemas de dispersión sólida (194). Los desplazamientos en la BE se pueden discriminar para un átomo en específico posibilitando la identificación del tipo de interacción que se está presentado (enlaces de hidrogeno, interacción electrostática, protonación, entre otras). Por ejemplo, en investigaciones previas se ha observado que un valor de desplazamiento en la BE del N1s positivo de + 2,3 eV está dado para la protonación de un nitrógeno aromático en la teofilina, así como para un nitrógeno alifático en el grupo piperidina (195). XPS también se ha empleado para identificar la naturaleza del tipo de unión en sistemas en los cuales estén presentes PEs, como la investigación de Bukhovets et al., 2020 (196), en la que en el complejo inter polielectrolítico entre Eudragit EPO y Eudragit S100 se evidenció que los grupos que contenían nitrógeno estaban presentes en varias formas: el estado fundamental (399,5 eV), grupos amino neutros, grupos con puentes de hidrógeno (400,5 eV, desplazamiento químico de grupos neutros +1,0 eV) y grupos en forma iónica (401,7 eV, desplazamiento químico de grupos neutros +2,2 eV), demostrándose la gran especificidad que posee esta metodología.

Específicamente, XPS también tiene una sensibilidad excelente para evaluar el grado de protonación midiendo los cambios en la energía de unión de los átomos seleccionados. Por ejemplo, en un sistema donde se forma una sal como el caso del ácido 3,5-diaminobenzoico, en el cual el grupo $-NH_2$ sufre un cambio por protonación a $-NH_3^+$ con un incremento de +2,4 eV (197).

En la Tabla 3-5, se presentan los porcentajes de área correspondientes a la composición de cada uno de los átomos que conforman los CPEs y los materiales precursores. Se observa que en los complejos el porcentaje de nitrógeno disminuye respecto al Eu, por la

inclusión de otros átomos en la mezcla. De manera particular, en los CPEs con AS la disminución fue menor con respecto a los demás complejos. Esto podría atribuirse a la proporción del AS que estaría en su forma molecular, la cual se sublima en el proceso de análisis por XPS debido a que el cambio en su entalpia sublimación es menor en comparación con el AB y el AHB (198). La presencia del ion cloruro en los CPEs también fue observada en aquellos espectros donde el Eu fue neutralizado con HCl; los porcentajes de cloro en los complejos no guardaron ninguna relación con la metodología o el ácido utilizado.

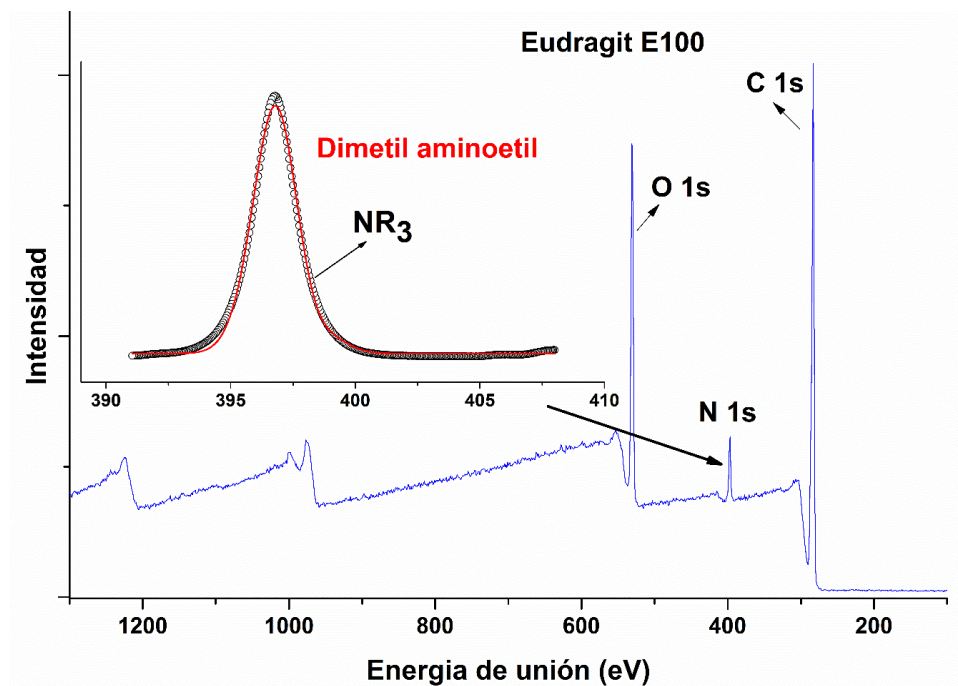
Tabla 3-5 Posición y porcentaje de área de los átomos de O, C, N y Cl en los activos ácidos, el Eudragit E100 y los complejos.

Materiales	Área (%)			
	O,1s	C,1s	N,1s	Cl,2p
AHB	48,89	51,11	--	--
AS*	--	--	--	--
AB*	--	--	--	--
Eu	39,66	54,64	5,70	--
<u>Secado por aspersión</u>				
EuB ₁₀₀	36,82	58,25	4,93	--
EuB ₇₅ Cl ₂₅	38,90	55,94	4,65	0,30
EuHB ₁₀₀	39,39	55,63	4,98	--
EuHB ₇₅ Cl ₂₅	38,85	55,90	4,99	0,27
EuAs ₁₀₀	38,62	55,72	5,66	--
EuAs ₇₅ Cl ₂₅	37,46	57,04	5,32	0,26
<u>Extrusión por fusión</u>				
EuB ₁₀₀	35,49	59,59	4,92	--
EuB ₇₅ Cl ₂₅	44,75	49,55	4,84	0,28
EuHB ₁₀₀	39,18	55,85	4,98	--
EuHB ₇₅ Cl ₂₅	38,95	55,91	4,81	0,33
EuAs ₁₀₀	38,68	56,01	5,31	--
EuAs ₇₅ Cl ₂₅	37,60	56,88	5,26	0,25

* Se produjo sublimación en el análisis por XPS.

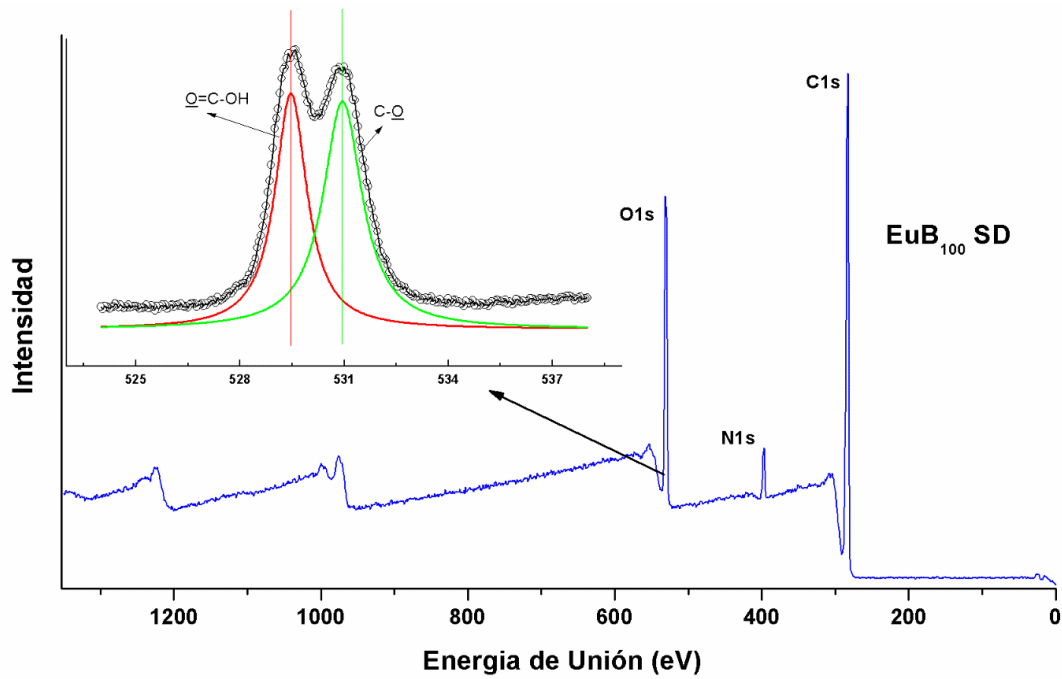
La Figura 3-11 muestra el espectro de XPS del Eu, en el que se observa los picos de los átomos de oxígeno, nitrógeno y carbono. La posición de estos picos están de acuerdo con los rangos reportados (199), y su intensidad está relacionada con la abundancia de cada átomo en la molécula.

Figura 3-11 Espectro de rayos X fotoeléctrico del Eudragit E100.

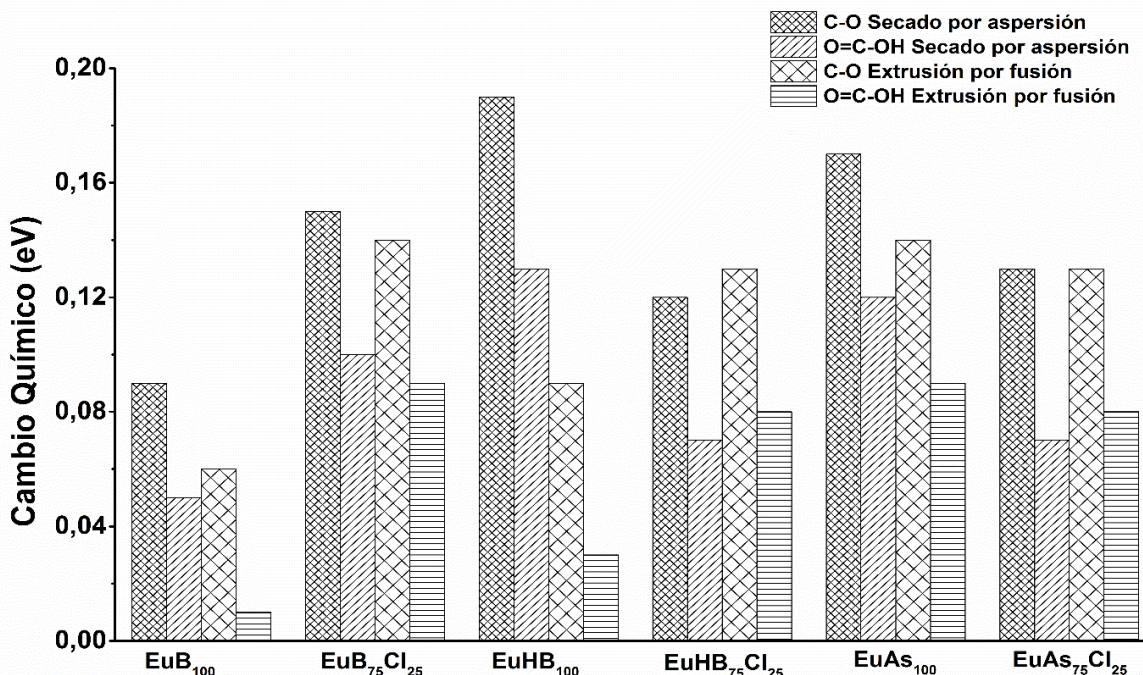


Como se mencionó anteriormente, la energía de unión exacta de los electrones que están alrededor de un núcleo está influenciada por el entorno químico inmediato de ese átomo y las alteraciones de energía se conocen como cambios químicos. Las alteraciones que conducen a estos cambios químicos en un espectro XPS, las podemos distinguir por las diferencias en estados de oxidación de los átomos en la molécula, los diferentes grupos funcionales y la carga, obteniendo un cambio de energía para cada átomo. Para los CPEs los cambios químicos están relacionados con las interacciones de los grupos funcionales que los conforman, produciéndose así desplazamientos en la energía de unión la cual se calcula a partir del espectro. En la Figura 3-12, se muestra el del CPE EuB₁₀₀ obtenido por secado por aspersion, en el que la gráfica de resolución para el oxígeno está compuesta por dos picos, los cuales corresponden a los grupos funcionales O=C-OH y C-O. En el anexo D se incluyen los espectros de XPS para los todos complejos.

Figura 3-12 Espectro XPS del complejo EuB_{100} obtenido mediante secado por aspersión y gráfica de la resolución para oxígeno O1s.



El ambiente químico de los oxígenos cambia cuando se forma el CPE promoviendo un desplazamiento en la unión. En la Figura 3-13 se muestra el cambio químico del oxígeno en eV de cada uno de los CPEs por las dos metodologías empleadas.

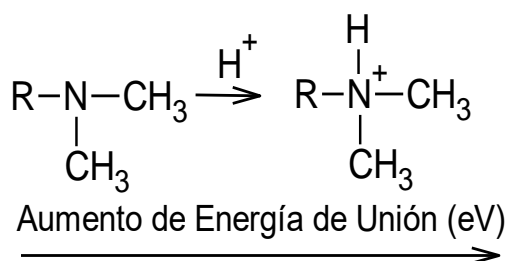
Figura 3-13 Diferencias en energías de unión para el oxígeno, en los complejos obtenidos por SD y HME, para los grupos C-O y O=C-OH.

La interacción está dada por el carbono carboxílico de los ácidos y el oxígeno del polímero [O=C --- (- O -)], a su vez el carbono carboxílico del polímero con los oxígenos de carga negativa de los ácidos (-C-O-C-), siendo esta última más débil, lo cual es confirmado por la intensidad en el cambio químico. Esta intensidad fue mayor en todos los CPEs obtenidos por SD en los que no se empleó HCl para neutralizar el polímero, en comparación con los obtenidos por HME. Este comportamiento es debido a que, en SD la metodología involucra la dispersión del polímero en el solvente (etanol 96%), generando una relajación de sus cadenas lo que facilita la proximidad de los grupos funcionales y por ende su interacción. Por el contrario, en HME, la movilidad de las cadenas poliméricas está limitada y condicionada a la temperatura de producción, por lo que se dificulta la interacción entre los grupos funcionales. Por otra parte, el desplazamiento químico fue mayor en los CPEs que contienen AS y AHB (+0,19 y +0,16, respectivamente), principalmente porque estos ácidos tienen un grupo hidroxilo fenólico (-OH) que también puede interactuar con el carbono del grupo carboxílico del Eu.

En cuanto al nitrógeno del Eu, que es una amina terciaria (-NR₃), presenta su pico en el espectro de XPS en una posición de energía de unión a 396,8604 eV (Figura 3-10), que está en concordancia con lo reportado en otras investigaciones que incluyen aminas terciarias ~ 389,500-399,700 eV (195,199). Como se indicó anteriormente, una de la

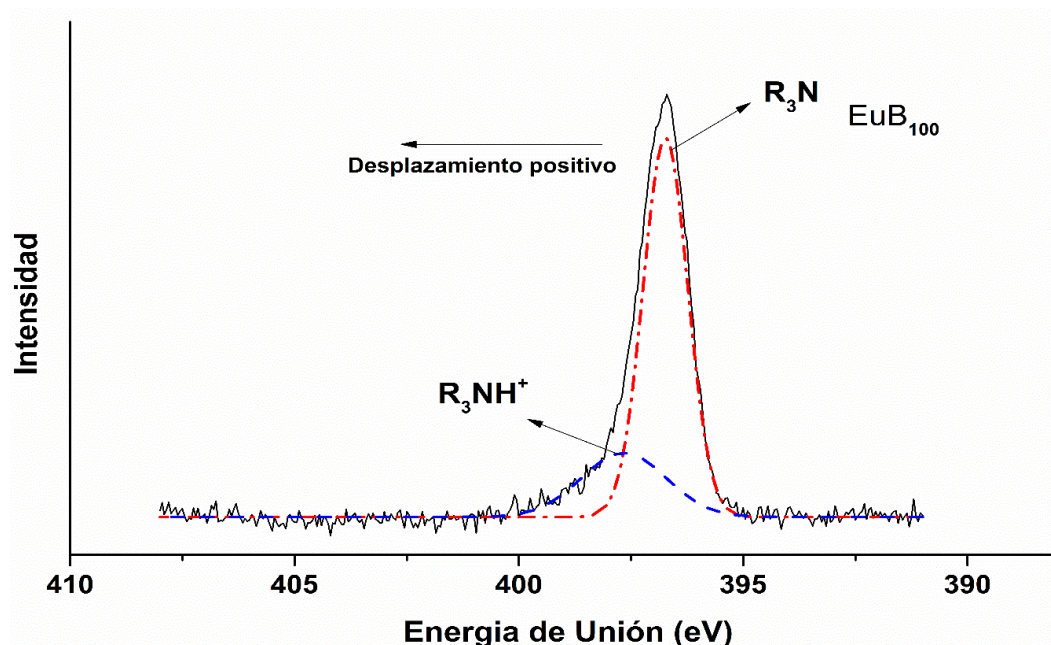
alteraciones que conducen a un cambio químico es la carga del átomo, para el nitrógeno se ha demostrado que al aumentar la carga aumenta la BE (200). Para nuestro estudio el nitrógeno del grupo dimetilamina del Eu se carga positivamente, esto genera un apantallamiento de los electrones 1s del nitrógeno necesiéndose más energía para eyectarlos de ese nivel, reflejándose en el espectro XPS en un desplazamiento positivo en la BE (Figura 3-14).

Figura 3-14 Protonación de una amina terciaria y aumento de la energía de unión.



En los CPEs obtenidos por las dos metodologías (HME y SD), se observó en sus espectros de XPS la aparición de una nueva señal en el rango de nitrógeno N1s de 389,500 a 402,035 eV (201), correspondiente al nitrógeno protonado. En la Figura 3-15 se muestra el espectro de alta resolución del nitrógeno N1s para el complejo EuB₁₀₀ obtenido por SD, detallándose las dos señales del nitrógeno N1s.

Figura 3-15 Espectro de resolución para el N1s del complejo EuB₁₀₀ obtenido mediante secado por aspersión.



Es de resaltar que no todo el nitrógeno del Eu se alcanza a protonar, como se ilustra en la Tabla 3-6 en la que se relacionan los desplazamientos de todos los complejos con respecto al N1s del PE solo y su porcentaje de protonación. Para todos los CPEs el desplazamiento fue positivo y en general fue mayor en los CPEs obtenidos por HME, siendo un resultado que está posiblemente asociado a la energía proporcionada por las fuerzas mecánicas y a la temperatura del proceso. Estos resultados sugieren, que esta energía afecta a los átomos vecinos del nitrógeno N1s del polímero, llevando a un cambio de entorno químico que se refleja en un mayor desplazamiento en la BE.

En los CPEs que fueron neutralizados con HCl, su desplazamiento en la BE fue mayor en comparación con los CPEs que solamente se neutralizaron con el ácido orgánico correspondiente. La principal razón es que el HCl al protonar algunos grupos amino del PE, facilita su dispersión, permitiendo que las cadenas del polímero se expandan posibilitando una mayor interacción con los activos (AB, AS y AHB). Este comportamiento fue observado para las dos metodologías empleadas (Tabla 3-6).

Tabla 3-6 Cambio químico del N1s del Eudragit E100 y los CPEs obtenidos por SD y HME.

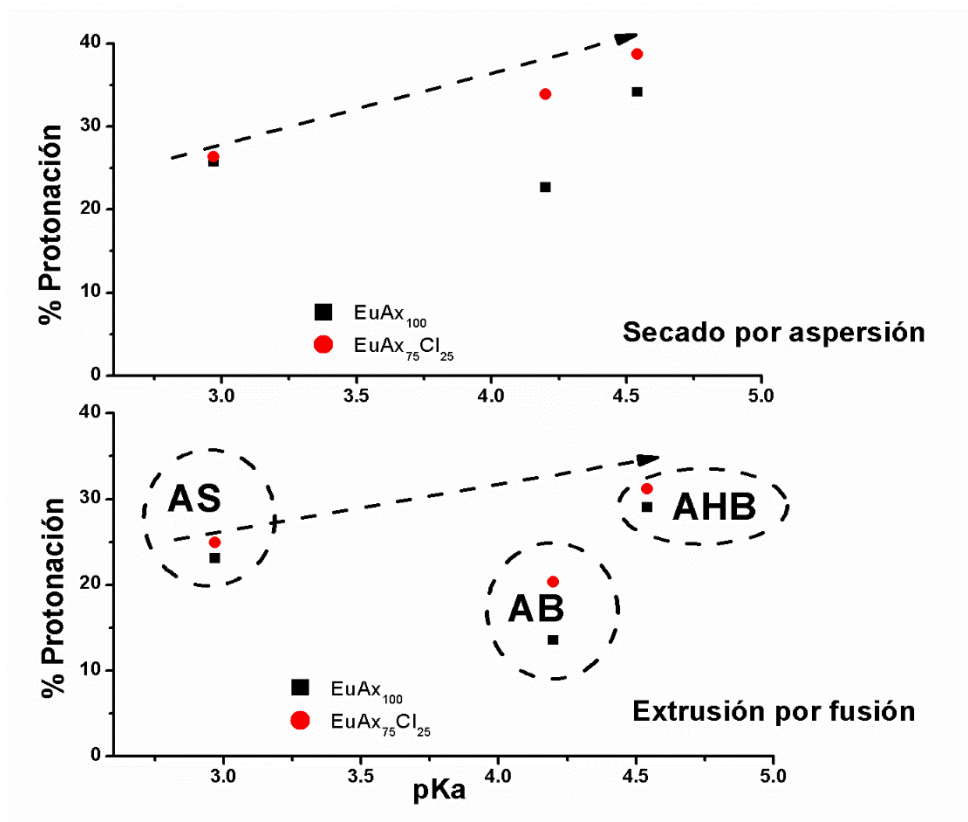
Material	Nitrógeno N1s (amina terciaria)		
	Posición del pico (eV)	Cambio químico (eV)	% de protonación
<u>Secado por aspersión</u>			
Eudragit E100	~396,8406	----	----
EuB₁₀₀	~397,7350	+0,89	22,7
EuB₇₅Cl₂₅	~398,4200	+1,58	33,9
EuHB₁₀₀	~398,1605	+1,32	34,2
EuHB₇₅Cl₂₅	~398,2186	+1,38	38,7
EuAs₁₀₀	~398,2186	+1,38	25,8
EuAs₇₅Cl₂₅	~398,2591	+1,42	26,3
<u>Extrusión por fusión</u>			
EuB₁₀₀	~397,9162	+1,08	13,5
EuB₇₅Cl₂₅	~398,2566	+1,42	20,3
EuHB₁₀₀	~398,7999	+1,79	29,0
EuHB₇₅Cl₂₅	~398,6278	+1,96	31,2
EuAs₁₀₀	~398,3345	+1,49	23,1
EuAs₇₅Cl₂₅	~398,3674	+1,53	24,9

Los porcentajes de protonación en los CPEs no sobrepasaron el 35% (Tabla 3-6), con lo cual se infiere que la proporción estequiométrica de neutralización calculada no asegura el 100% de la neutralidad de los grupos amina del Eu. Para asegurar una mayor neutralización se debería cargar el polímero con más ácido y asegurar que las cadenas de polímero que

aún no estén totalmente relajadas puedan estarlo, de esta manera se tendría una mayor probabilidad de protonación para los nitrógenos N1s. Cargar el polímero con mayor cantidad del activo es una forma de asegurar la interacción, como se ha propuesto en varias investigaciones sobre DSA en las que el polímero es cargado en varias proporciones, buscado maximizar la funcionalidad del sistema y al mismo tiempo asegurando su estabilidad (202,203).

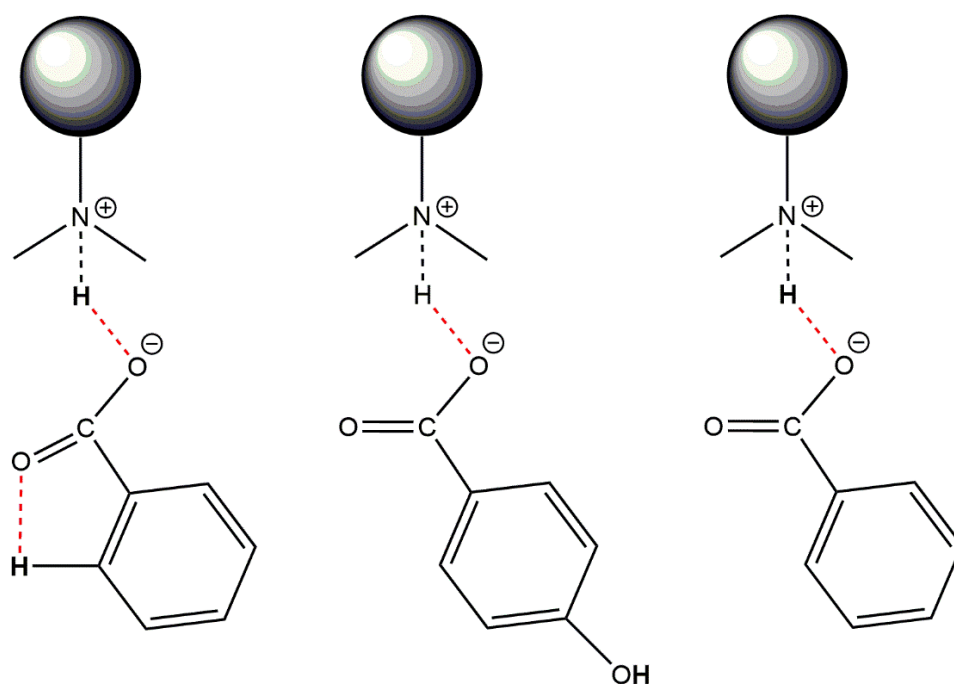
El mayor porcentaje de protonación se observó en los CPEs obtenidos por secado por aspersión. El procedimiento de dispersión del polímero y del activo en un medio líquido (etanol al 96%) previo al secado, permite que las cadenas del polímero estén totalmente expandidas, de esta manera la aceptación del ion hidronio por parte del nitrógeno del grupo amina se lleve a cabo con más facilidad. En la Figura 3-16 se muestra la relación de los porcentajes de protonación con los pKa de los ácidos orgánicos, en la que hay una leve relación entre el aumento del porcentaje de protonación y el pKa. Aunque para el caso del ácido salicílico su pKa es menor, la presencia en su estructura molecular de un grupo hidroxilo fenólico ionizable (pK_{a2}) proporciona más iones hidronio en comparación con el ácido benzoico reflejándose en un porcentaje de protonación superior, aunque menor que el obtenido para los CPEs del ácido 4-hidroxibenzoico. Esto último se puede explicar si comparamos el AS con el AHB. Cuando el AS pierde el primer protón queda una carga negativa en el grupo carboxílico, que es estabilizada por el grupo -OH de la posición orto mediante puentes de hidrogeno intermoleculares, haciendo que la liberación del segundo protón se dificulte. Para el AHB, la formación de puentes intermoleculares no se presenta permitiendo que el grupo -OH fenólico libere más fácilmente el protón que el AS (204). Este evento, se refleja en los pK_{a2} de los ácidos (13,6 para AS y 9,3 para AHB) (71,176) y el porcentaje de protonación obtenido de los espectros de XPS mostrados en la Tabla 3-6.

Figura 3-16 Relación entre los pKa de los ácidos utilizados en cada uno de los CPEs obtenidos por HME y SD.



En la Figura 3-17 se representa de manera esquemática la interacción de enlace de hidrógeno entre el Eu y los ácidos utilizados. Como se dijo anteriormente la eficiencia de interacción no solo es atribuible al pKa de los ácidos, también dependerá de la disposición espacial y la proximidad de los grupos amina del Eu y el grupo carboxílico del ácido empleado, así como de la influencia del impedimento estérico que ejercen las unidades monoméricas del polímero (193). Por otro lado, los fenómenos asociados al proceso de mezcla también pueden explicar la efectividad de la protonación para el caso de HME.

Figura 3-17 Sitio propuesto para los enlaces de hidrógeno entre el Eudragit E100, ácido salicílico, ácido 4-hidroxibenzoico y ácido benzoico.



3.4.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El principal uso de la SEM es analizar la morfología, las propiedades de superficie y una visión general del tamaño de partícula de un material (186). La microscopía electrónica de barrido puede ser usada para evaluar la variación de las propiedades de las partículas, obtenidas por diferentes metodologías como extrusión por fusión, secado por aspersión, electrohilado y secado al vacío (203). La sensibilidad de la SEM para detectar pequeñas partículas sobre la superficie de las muestras analizadas, como cristales la convierte en un complemento de información para XRPD y DSC (205,206), e incluso junto con XPS, ha sido empleada para caracterizar las interacciones entre activos y polímeros (201).

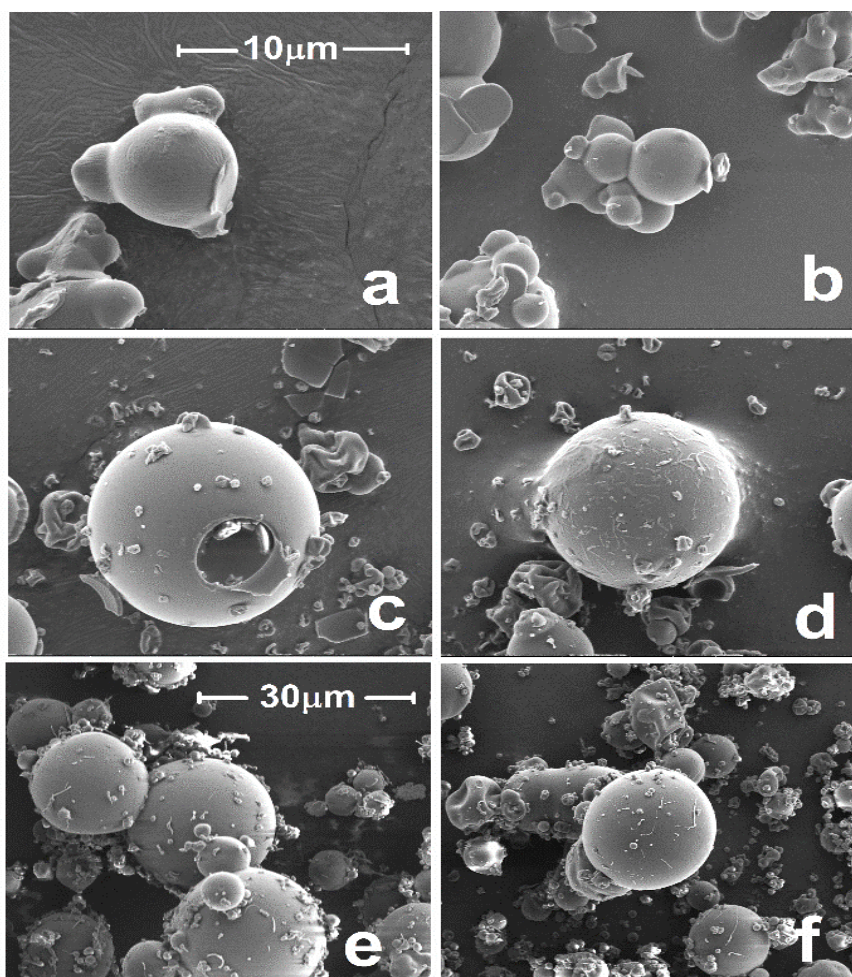
Para las metodologías empleadas (SD y HME), conocer la morfología de las partículas obtenidas es de suma importancia para explicar las propiedades farmacotécnicas como fluidez, voluminosidad, densidad, entre otras, requeridas para futuras aplicaciones de estos CPEs (207). En la Figura 3-18 se muestran las fotografías de los CPEs obtenidos por secado por aspersión, en los que la forma esférica fue la constante para cada sistema, con evidencia de aglomeración en los complejos formados con el AB, que presentan una

superficie algo rugosa. Las partículas de los CPEs que incluyen el AS fueron esféricas huecas y con friabilidad, observándose muchas partículas quebradas. Aquellas que contienen el AHB, fueron más aglomeradas y con gran cantidad de pequeñas partículas sobre su superficie. La morfología observada podría estar relacionada con factores asociados al proceso, como la velocidad de secado y con la composición del CPE (208).

La friabilidad de algunas de las partículas obtenidas por SD podría asociarse con la viscosidad de la dispersión a secar. La formación de las gotículas y el grosor de la pared depende en gran medida de esta propiedad. El Eu se disuelve mejor en pHs inferiores a 5 (209) y entre más bajo sea el pH la dispersión se torna más fluida; de los tres ácidos estudiados el de menor pKa es el AS proporcionado al medio un pH más bajo que disminuye la viscosidad. De esta manera, entre menos viscosidad tiene la dispersión que se atomiza en el equipo, el espesor de pared se hace menor, aumentado la difusión del disolvente a la superficie de la partícula, creando esferas huecas y frágiles (208,210).

El fenómeno de friabilidad se alcanza a disminuir con la inclusión del HCl en la neutralización del polímero, lo cual se observa en la Figura 3-18 (d), en la que las partículas están aglomeradas, pero no quebradas. Esto podría deberse a la mayor interacción entre el Eu y el ácido empleado, de acuerdo con lo explicado en los resultados de XPS, formando gotículas más resistentes.

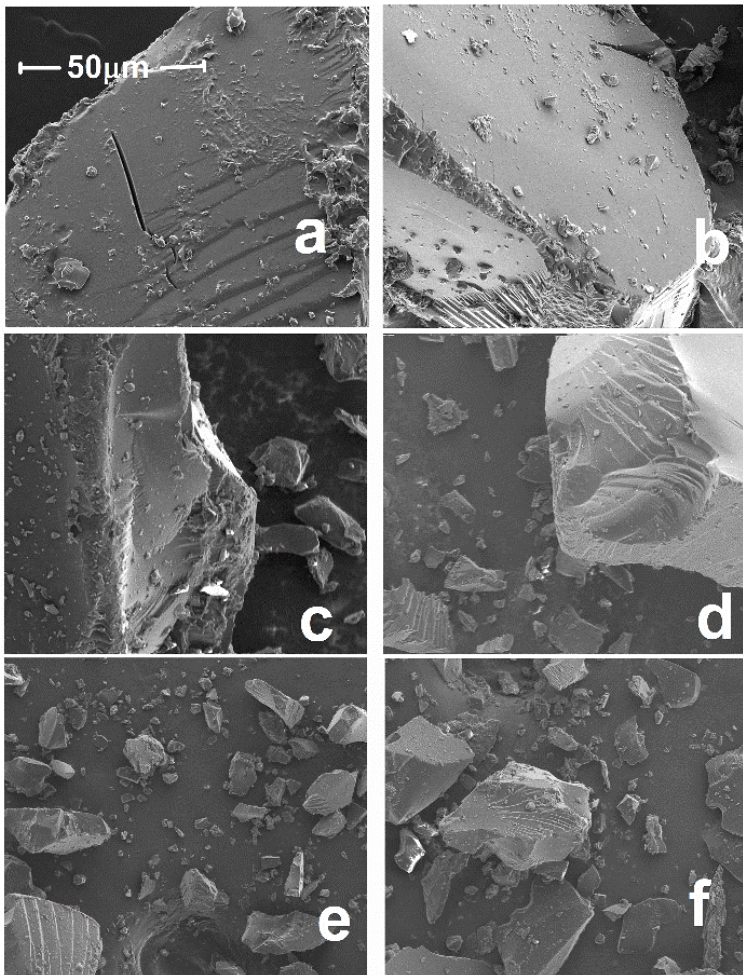
Figura 3-18 Partículas de los complejos obtenidos por secado por aspersión. a) EuB_{100} b) $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$ c) EuAs_{100} d) $\text{EuAs}_{75}\text{Cl}_{25}$ e) EuHB_{100} y f) $\text{EuHB}_{75}\text{Cl}_{25}$ (5000X a-d) (2500X e y f).



Los CPEs obtenidos por HME no exhibieron cristales del activo en la superficie, solo se observan pequeños fragmentos de extruidos (Figura 3-19). Los CPEs son compactos sin partes huecas y visualmente rígidos. La ganancia de rigidez (dureza), es una propiedad que se presenta en los extruidos debido al incremento de densidad y al posible cambio de la orientación del Eu, la cual no significa cambios químicos en su composición (211).

En general, los resultados de la SEM muestran cómo la metodología de obtención de los CPEs impacta a nivel microscópico las partículas obtenidas y ayuda a complementar los resultados de DSC, XRPD y XPS.

Figura 3-19 Partículas de los complejos obtenidos por extrusión por fusión a) EuB_{100} b) $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$ c) EuAs_{100} d) $\text{EuAs}_{75}\text{Cl}_{25}$ e) EuHB_{100} y f) $\text{EuHB}_{75}\text{Cl}_{25}$ (5000X).



3.4.5 Distribución de tamaño de partícula

Los resultados de la distribución del tamaño de partícula para los CPEs obtenidos por secado por aspersión se muestran en la Tabla 3-7. Cabe indicar que, por los aspectos inherentes al proceso de obtención de los CPEs por HME, que involucra una operación de molienda al final, no tenía mucho sentido la evaluación del tamaño de partícula para aquellos obtenidos por esta metodología. Se destaca que el tamaño alcanzado en este último caso dependió de esta operación.

Tabla 3-7 Tamaño de partícula de los CPEs obtenidos por secado por aspersión.

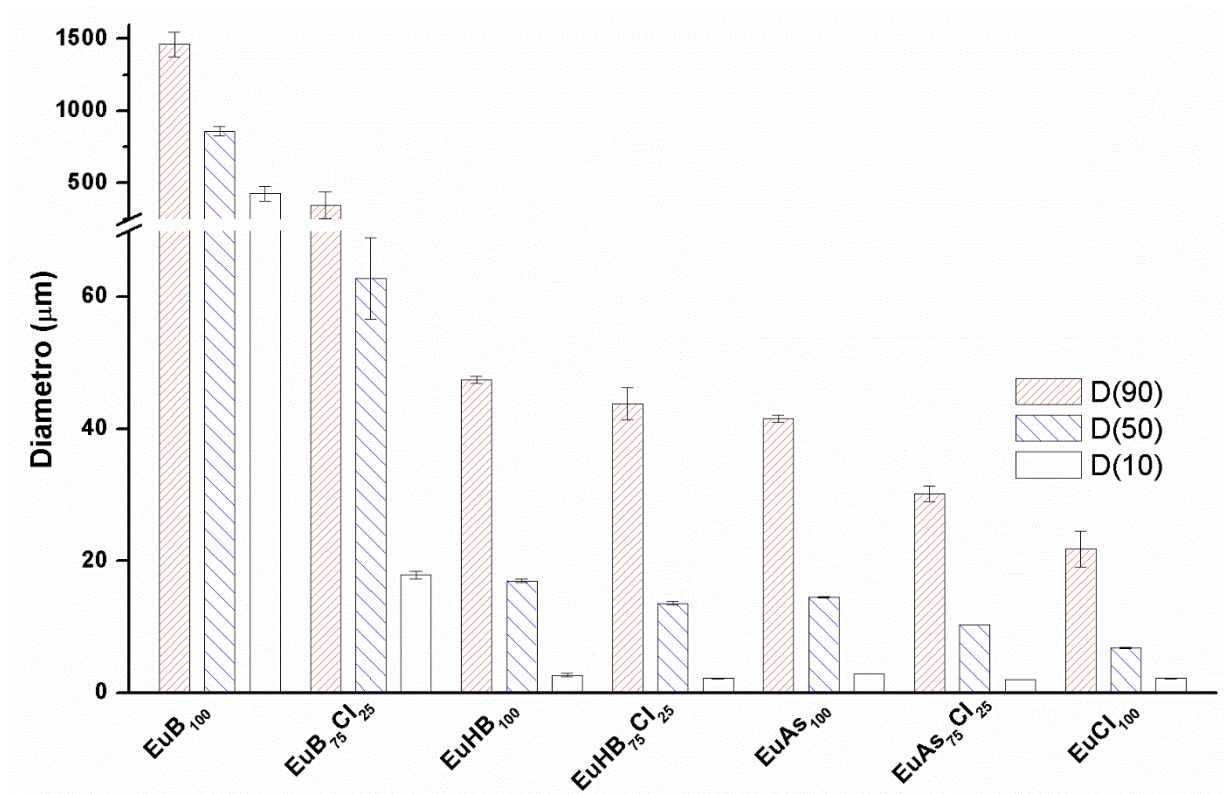
Complejos	dvs ^a(μm)	Span
EuB₁₀₀	860,77 \pm 1,33	1,2
EuB₇₅Cl₂₅	59,77 \pm 2,50	4,1
EuHB₁₀₀	16,97 \pm 0,30	2,6
EuHB₇₅Cl₂₅	13,57 \pm 0,30	3,1
EuAs₁₀₀	14,50 \pm 0,10	2,7
EuAs₇₅Cl₂₅	10,33 \pm 0,10	2,7

^a Promedio \pm coeficiente de variación (CV).

Los resultados del tamaño y de la distribución de tamaño de las partículas, obtenidas por la metodología de SD, están influenciados principalmente por los parámetros del proceso (212). Por ejemplo, un aumento en el porcentaje de alimentación puede llevar a una disminución en el tamaño de las partículas (213). Para los CPEs con AS y para el EuHB₁₀₀, el porcentaje de alimentación estuvo en el nivel más alto (30%) en comparación con las condiciones de obtención de los demás CPEs, siendo ellos los que tuvieron tamaños de partícula menores, con excepción del CPE EuHB₇₅Cl₂₅ (porcentaje de alimentación de 10%), en el que posiblemente también influyeron otras variables asociadas al proceso.

Otro aspecto que influyó en los resultados fue la composición de los CPEs. La adición del HCl en los complejos generó una disminución del tamaño de partícula, lo que fue consistente tanto para el dvs (D_{50}) como para el D_{90} y el D_{10} . En la Figura 3-20 se muestran comparativamente los tamaños de partícula de los diferentes CPEs, también se incluyó al ionómero EuCl₁₀₀, todos obtenidos por SD. Esta disminución del tamaño de partícula podría estar relacionada con la mayor acidez conferida al medio de dispersión por parte de aquellos complejos que contenían cloruros. La explicación sería similar a la dada anteriormente para la SEM, y es que esta mayor acidez ocasiona una disminución en la viscosidad de la dispersión a atomizar. A menor viscosidad se logra un menor espesor de la película que se forma en el proceso de secado alrededor de las partículas esféricas, lo que produce un aumento en la difusión del etanol hacia la superficie. La pérdida del solvente por difusión se traduce en una disminución de la expansión del solvente al interior de las esferas que se refleja en la obtención de un menor tamaño de partícula.

Figura 3-20 Distribución de tamaño de partícula (D_{90} , D_{50} y D_{10}) de los CPEs y EuCl_{100} obtenidos por secado por aspersión.



3.5 Caracterización en dispersión

La caracterización en dispersión de un CPE ayuda a entender cómo este actúa frente al medio donde se encuentra y, cómo algunas características específicas del medio como pH, fuerza iónica, concentración de sólidos, carga, entre otras, pueden afectar la forma de interacción con dicho medio. Adicionalmente, esta caracterización permite interpretar el comportamiento del CPE con relación a las interacciones electrostáticas que lo conforman y, cómo estas afectan características macro como la liberación y su estabilidad física en dispersión. Como se mencionó en la metodología, para cada uno de los CPEs estudiados, se determinó la solubilidad cualitativa, el potencial ζ y el comportamiento de liberación.

3.5.1 Solubilidad cualitativa

La solubilidad es una propiedad termodinámica que corresponde a la concentración de la solución saturada del soluto en estudio, en un solvente específico a unas condiciones

definidas. Ocurre en equilibrio dinámico, lo que significa que resulta de los procesos simultáneos y opuestos de disolución y separación de fases (por ejemplo, precipitación de sólidos). Puede expresarse en unidades de concentración como molalidad, fracción molar, entre otras (214).

La determinación de la solubilidad para los CPEs tiene varias limitantes, la principal es el aumento de la viscosidad del sistema que dificulta llegar al estado de equilibrio, posiblemente dado por la generación de agregados micelares (215). Por este motivo, muchas de las investigaciones en este campo enfocan sus esfuerzos en evaluar la liberación y la velocidad de disolución del fármaco complejado (216), en comparación con el mismo fármaco libre (217), más que en la determinación del valor de solubilidad. Por esta razón, los resultados que se muestran a continuación son más de tipo cualitativo o cuantitativo, pero con alcance limitado, siguiendo los procedimientos que se describieron en la metodología.

▪ **Primera metodología**

De acuerdo con la USP, la solubilidad cualitativa se puede expresar 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” (Tabla 3-8) (159). De los doce complejos evaluados, diez se clasificaron en la categoría de “soluble”, es decir, cada uno requirió de 10 a 30 partes de solvente por una parte de soluto, observándose una apariencia traslúcida y sin presencia de sólido; dos complejos, EuAs₁₀₀ HME y EuAs₁₀₀ SD, presentaron partículas en suspensión difícilmente dispersables, por lo que se clasificaron como insolubles.

Tabla 3-8 Descripción de la solubilidad cualitativa según la USP.

Término descriptivo	Partes de solvente requerido por 1 parte de solvente
Muy soluble	Menos de 1
Totalmente soluble	De 1 a 10
Soluble	De 10 a 30
Escasamente soluble	De 30 a 100
Ligeramente soluble	De 100 a 1000
Muy ligeramente soluble	De 1000 a 10000
Prácticamente insoluble, o insoluble	Mayor que o igual 10000

▪ **Segunda metodología**

Los polielectrolitos son polímeros ionizables que cambian sus conformaciones poliméricas según sus cambios ambientales, la ionización ocurre por los grupos que están a lo largo de su estructura que se disocian en disolventes polares como el agua, dejando cargas en las cadenas del polímero y liberando contraiones en la solución (218,219). El comportamiento en solución es controlado principalmente por el pH del medio y la fuerza iónica, el pH fue medido en dispersiones de 0,6% de ácido de los complejos en agua. Se tomó este valor porque es la concentración que es superior a los típicos valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) del AB frente a levaduras y hongos filamentosos (220). Adicionalmente, esta concentración fue punto de referencia en investigaciones previamente realizadas al interior del grupo de investigación con el AB, esperando más adelante observar un efecto antimicrobiano para los sistemas con los otros ácidos, a este mismo nivel de concentración. Los resultados fueron congruentes con la etapa anterior (primera metodología), en la que solo los complejos con AS neutralizados al 100% fueron difícilmente dispersables (insolubles).

Como se indicó en la caracterización en el estado sólido, los sistemas obtenidos por SD y HME son DSAs, en los que una molécula está dispersa en un polímero amorfo. En las DSAs se produce una estabilización de la molécula dispersa siendo una consecuencia de factores como las interacciones intermoleculares, efecto antiplastificante ejercido por el polímero, barreras físicas para el proceso de cristalización y una reducción en el potencial químico de la molécula (221). Las interacciones intermoleculares entre el polímero y la molécula dispersa son el punto clave porque dan como resultado la formación de los CPEs (222,223).

El aumento de la solubilidad de un activo, al hacer parte de una DSA o de un CPE ha sido estudiado ampliamente (129,167,168,190,216,224,225). Los resultados mostrados en la Tabla 3-9, muestran la concentración de ácido que estaría disuelto al pH de la dispersión ([ácido]^b) del CPE. Esto es un claro incremento de la cantidad de activo solubilizado en agua, lo que resulta fundamental para asegurar posteriormente un efecto antimicrobiano de los ácidos. El aumento en solubilidad, se debe principalmente al estado amorfo, donde no hay requerimiento de energía para romper la red cristalina de las moléculas dispersas en la matriz del polímero, de modo que estas puedan interactuar con las moléculas del solvente y se disuelvan (122). Adicional a este aspecto, en los CPEs el aumento de la solubilidad está dado por la formación del par iónico soluble entre el PE y el activo, que es como se

encuentran de manera predominante los ácidos estudiados, de acuerdo con lo presentado en el Capítulo 2 (Tablas 2-6 y 2-15).

Tabla 3-9 Resultados de la solubilidad y pH, empleando la metodología 2, para los complejos en dispersión al 0,6% en ácido.

	[CPE] mg/ml	Soluble	pH	[ácido] ^a mg/ml	[ácido] ^b mg/ml
Secado por aspersión					
EuB₁₀₀	15,40	Sí	4,74 (0,41)	6,0	22,5
EuB₇₅Cl₂₅	20,70	Sí	4,95 (0,35)	6,0	15,2
EuHB₁₀₀	14,00	Sí	4,98 (0,27)	6,0	25,4
EuHB₇₅Cl₂₅	18,80	Sí	5,15 (0,83)	6,0	17,6
EuAs₁₀₀	14,00	No	---	6,0	---
EuAs₇₅Cl₂₅	18,80	Sí	4,31 (0,94)	6,0	47,8
Extrusión por fusión					
EuB₁₀₀	15,40	Sí	5,10 (0,69)	6,0	30,4
EuB₇₅Cl₂₅	20,70	Sí	5,25 (0,89)	6,0	41,5
EuHB₁₀₀	14,00	Sí	5,20 (0,56)	6,0	27,9
EuHB₇₅Cl₂₅	18,80	Sí	5,27 (0,66)	6,0	31,9
EuAs₁₀₀	14,00	No	---	6,0	---
EuAs₇₅Cl₂₅	18,80	Sí	4,40 (0,78)	6,0	58,4

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

a Concentración estequiométrica de AB, AS y AHB en la dispersión.

b Solubilidad en agua del ácido al pH medido para cada dispersión.

Teniendo en cuenta los resultados de la Tabla 3-9, se decidió verificar si hay una relación entre el pH y el porcentaje del Eu en los CPEs. En la Figura 3-21 se puede visualizar que a medida que aumenta el porcentaje de polímero en la dispersión, el pH aumenta para cada uno de los sistemas con excepción del CPE EuAs₇₅Cl₂₅. Para los CPEs EuB₁₀₀, EuB₇₅Cl₂₅, EuHB₁₀₀ y EuHB₇₅Cl₂₅, el aumento de pH es posiblemente debido a la cantidad de grupos dietilamino disponibles en los CPEs que contienen más polímero, estos captarán más iones hidronio (H⁺) del medio disminuyendo su concentración y, reflejándose en un aumento de pH. En cuanto al CPE EuAs₇₅Cl₂₅ su pH disminuye probablemente por la influencia del pKa del AS, propiciando una mayor cantidad de iones H⁺ en el medio los cuales desbordan la capacidad de captación del polímero, produciendo una disminución en el pH.

Al hacer una comparación de la solubilidad que alcanzarían los ácidos, con respecto al pH y la metodología de obtención (Tabla 3-9, [ácido]^b), se podría decir que los CPEs producidos por HME solubilizan más ácido que su contraparte obtenida por SD (Figura 3-22). Esto posiblemente es debido, a que en la metodología de HME se genera un CPE seco (sin residuos de solvente) con una mayor capacidad de humectación. Esto facilitaría que las moléculas del ácido interaccionen con las moléculas del medio (agua) más fácilmente en

comparación con los producidos por SD. Esto también aplica para las cadenas poliméricas del Eu posibilitando la captación de iones hidronio por parte de estas, y como se explicó, conllevando a un aumento del pH para los CPEs producidos por HME.

Figura 3-21 Valores de pH promedio de las dispersiones acuosas de los complejos obtenidos por SD y HME a 0,6% en ácido, en el eje X se presenta el porcentaje de Eudragit E100 en la dispersión.

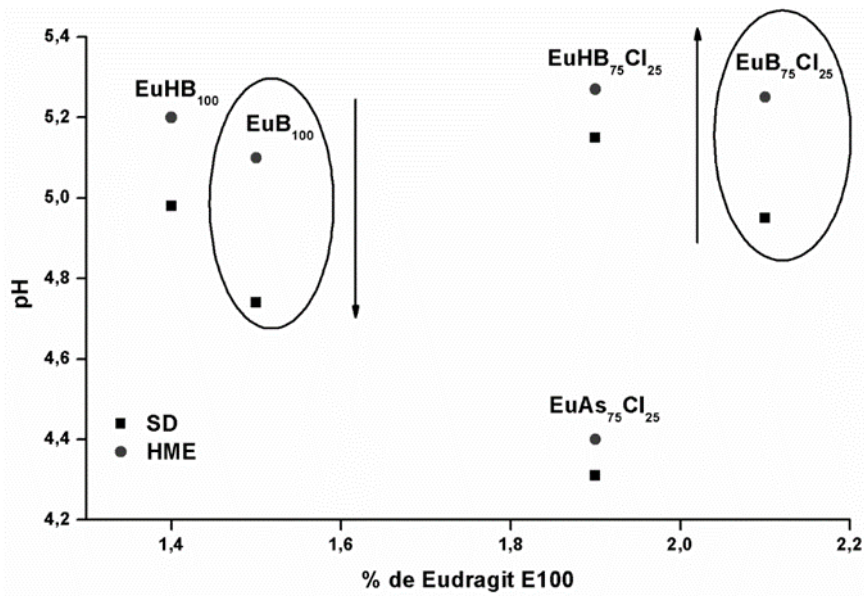
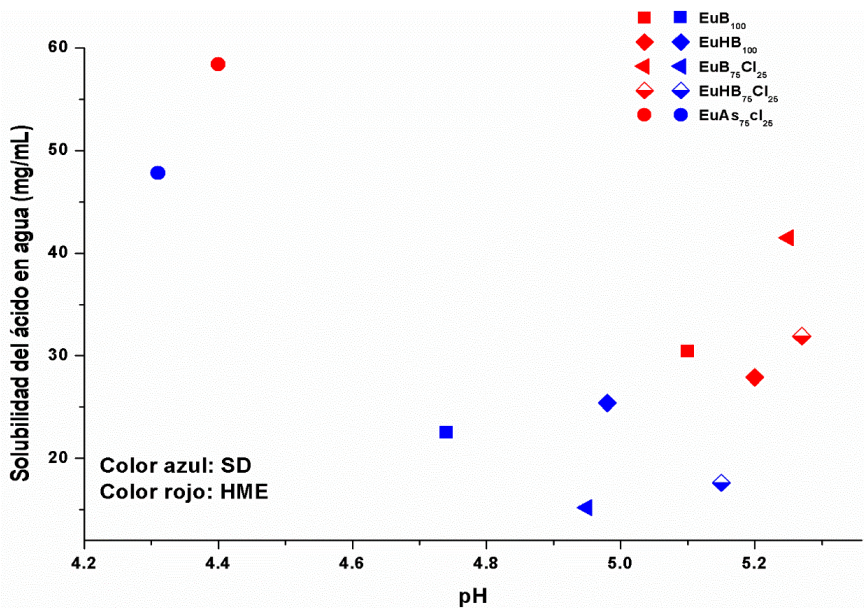


Figura 3-22 Relación de los pH obtenidos de las dispersiones acuosas de los CPEs, producidos por HME y SD a 0,6% en ácido.



▪ Tercera metodología

Para evaluar el comportamiento de la solubilidad de los CPEs a pH superiores al pKa de los ácidos que lo conforman, se llevó a cabo un análisis de la solubilidad en 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 % del ácido correspondiente. En la Tabla 3-10 se muestran los resultados para todos los complejos.

Tabla 3-10 Solubilidad cualitativa de los doce complejos a una concentración de 0,6 % del ácido, 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
Secado por aspersión									
EuB₁₀₀	15,40	S	S	S	S	S	S	S	P
EuB₇₅Cl₂₅	20,70	S	S	S	S	S	S	S	P
EuHB₁₀₀	14,00	S	S	S	S	S	S	S	P
EuHB₇₅Cl₂₅	18,80	S	S	S	S	S	S	S	P
EuAs₁₀₀	14,00	I	I	I	I	I	I	I	I
EuAs₇₅Cl₂₅	18,80	S	S	S	S	S	S	S	P
Extrusión por fusión									
EuB₁₀₀	15,40	S	S	S	S	S	S	S	P
EuB₇₅Cl₂₅	20,70	S	S	S	S	S	S	S	P
EuHB₁₀₀	14,00	S	S	S	S	S	S	S	P
EuHB₇₅Cl₂₅	18,80	S	S	S	S	S	S	S	P
EuAs₁₀₀	14,00	I	I	I	I	I	I	I	I
EuAs₇₅Cl₂₅	18,80	S	S	S	S	S	S	S	P

S (soluble); P (parcialmente soluble); I (Insoluble).

Los resultados de la Tabla 3-10 muestran una tendencia a la disminución de la solubilidad de los CPEs en la medida que aumenta el pH, debido a la variación en el grado de ionización del Eu. En condiciones alcalinas, valores cercanos o superiores a su pKa ($8,45 \pm 0,15$ (226)), está menos dissociado lo que favorece la interacción entre las cadenas llevando a una aglomeración y formación de partículas.

Con respecto al EuAs₁₀₀ quedó en evidencia su difícil dispersión a diferentes valores de pH, a la concentración evaluada. Esto posiblemente se debe al equilibrio tautomérico que presenta el ácido salicílico (227–229), por lo que la carga negativa se distribuye entre los grupos hidroxilo y carboxílico con una disminución de la densidad electrónica, limitando la apertura de las cadenas del Eu y, disminuyendo las probabilidades de interacción con el medio donde está disperso.

Por otro parte, los sistemas buffer empleados para la regulación del medio, pueden actuar como generadores de cargas pudiendo afectar el equilibrio propio de los CPEs. Para evidenciar si hubo tales interferencias en los resultados se realizó el mismo ensayo, pero con ajuste de pH con NaOH diluido (Tabla 3-11).

Tabla 3-11 Solubilidad cualitativa de los diez complejos a una concentración de 0,6 % del ácido en agua, a diferentes valores de pH.

	[CPE] mg/ml	5,8	6,0	6,3	6,6	6,9	7,2	7,6
Secado por aspersión								
EuB₁₀₀	15,40	S	S	S	S	S	S	P
EuB₇₅Cl₂₅	20,70	S	S	S	S	S	S	P
EuHB₁₀₀	14,00	S	S	S	S	S	S	P
EuHB₇₅Cl₂₅	18,80	S	S	S	S	S	S	P
EuAs₁₀₀	14,00	I	I	I	I	I	I	I
EuAs₇₅Cl₂₅	18,80	S	S	S	S	S	S	P
Extrusión por fusión								
EuB₁₀₀	15,40	S	S	S	S	S	S	P
EuB₇₅Cl₂₅	20,70	S	S	S	S	S	S	P
EuHB₁₀₀	14,00	S	S	S	S	S	S	P
EuHB₇₅Cl₂₅	18,80	S	S	S	S	S	S	P
EuAs₁₀₀	14,00	I	I	I	I	I	I	I
EuAs₇₅Cl₂₅	18,80	S	S	S	S	S	S	P

S (soluble); P (parcialmente soluble); I (Insoluble).

En la Tabla 3-11 están los resultados de solubilidad cualitativa de las dispersiones de los CPEs cuando se varió el pH con NaOH diluido. Aquí todos los complejos se comportaron de igual manera que cuando se ajustó el pH con buffer fosfato, manteniéndose las dispersiones translúcidas hasta pH 7,2. Estos resultados indican, que la presencia de buffers como los fosfatos, no afectan el resultado de solubilidad cualitativo evaluado en este rango de pH.

A pH 7,6 sí se evidenció una diferencia en la solubilidad cualitativa cuando se ajustó con NaOH en vez de buffer de fosfatos, en la que los CPEs se comportaron como parcialmente solubles. Este comportamiento, se puede deber a las cargas contra iónicas presentes en el medio como lo son los benzoatos, salicilatos, cloruros que están interaccionando de forma iónica con los grupos dietilamino del Eu, ejerciendo una barrera que obstaculiza la neutralización adicional que puedan ejercer los grupos fosfatos y los grupos hidroxilos. Adicionalmente, la mayor área de superficie polar ($86,2 \text{ \AA}^2$)(230) de los fosfatos en comparación con el OH^- (1 \AA^2)(231), podría impedir que en presencia de buffer fosfato se produzca la precipitación debida a una neutralización mayor del PE y con NaOH si ocurra, favorecido además de su menor tamaño, por su carácter de base fuerte. Esto ha sido

confirmado por C. Sester et al., 2020 (209), quienes demostraron que a pH 5,2, con buffer fosfato, el Eu está disperso y, que en las mismas condiciones pero empleando NaOH, este precipita.

Hay que aclarar que, de acuerdo con los resultados de solubilidad, debido a la difícil dispersión del complejo EuAs₁₀₀ en agua, este no se evaluó en ninguno de los ensayos siguientes.

▪ Cantidad máxima de complejo aceptada en agua

En las metodologías anteriores hubo un comportamiento similar para la solubilidad cualitativa para todos los complejos en las condiciones evaluadas de pH y concentración. Para tener una visión más clara sobre la mejora en la solubilidad de cada uno de los ácidos complejados, se empleó la metodología de cantidad máxima de CPE aceptada en agua, para diferenciar de manera cuantitativa los sistemas. Hay que tener en cuenta que esta metodología no es una determinación de solubilidad propiamente dicha (no se alcanza el equilibrio termodinámico), y cuenta con limitantes como la falta de consideración del volumen desplazado por la adición del soluto. Sin embargo, con las limitaciones mencionadas, ha sido un punto de partida para investigaciones donde se evalúa el comportamiento de saturación de los CPEs (99,232,233). En la Tabla 3-12 se muestran los resultados para la cantidad máxima de CPE aceptada en agua y la concentración de los ácidos calculadas estequiométricamente.

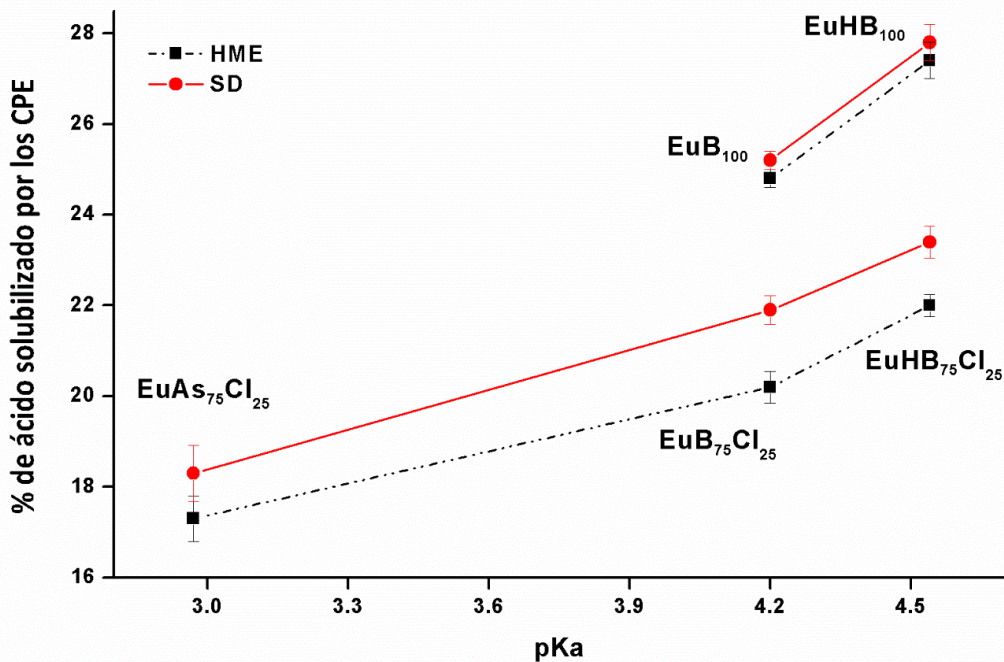
Tabla 3-12 Cantidad máxima de complejo aceptada en agua [CPE], concentración de ácido solubilizado [ácido] y porcentaje de ácido correspondiente a la cantidad de CPE, [ácido]%.

	[CPE] mg/ml	[ácido] mg/ml	[ácido] %
Extrusión por fusión			
EuB₁₀₀	890,50 (0,15)	247,8	24,8
EuB₇₅Cl₂₅	920,15 (0,35)	202,2	20,2
EuHB₁₀₀	901,01 (0,35)	273,7	27,4
EuHB₇₅Cl₂₅	910,20 (0,25)	219,7	22,0
EuAs₇₅Cl₂₅	568,74 (0,50)	172,8	17,3
Secado por aspersión			
EuB₁₀₀	905,70 (0,24)	252,1	25,2
EuB₇₅Cl₂₅	995,60 (0,32)	218,5	21,9
EuHB₁₀₀	915,82 (0,40)	278,2	27,8
EuHB₇₅Cl₂₅	970,25 (0,35)	234,2	23,4
EuAs₇₅Cl₂₅	603,64 (0,62)	183,4	18,3

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

La Tabla 3-12 señala, el aumento de la cantidad máxima de CPE aceptada por el agua cuando en el complejo está presente el ion cloruro, y se evidencia una diferencia dada por la metodología de procesamiento empleada (SD o HME). Como se indicó en los ensayos anteriores, la inclusión del ion cloruro favorece la apertura de las cadenas del polímero y su fácil humectabilidad, constituyéndose en una estrategia para la obtención de CPE entre Eu y activos aniónicos para obtener dispersiones acuosas traslúcidas, incrementando su compatibilidad con el agua (46,54,150). Para analizar la cantidad de ácido solubilizado por los CPEs, su relación con la metodología de producción y la constante de disociación de los activos, se construyó la Figura 3-23. De los resultados, se observa una tendencia de aumento de la cantidad de ácido disuelto en la medida que el pKa del ácido aumenta y una diferencia entre las metodologías de obtención, siendo para SD levemente mayor que para SD levemente mayor que para HME. A pesar de las diferencias en las propiedades fisicoquímicas (debidas a la interacción entre los componentes), en los CPEs obtenidos por ambas metodologías el comportamiento es muy similar, lo que ya ha sido demostrado en otras investigaciones como la de Beneš et al., 2017 quienes compararon diferentes metodologías para la obtención de DSAs, encontrando una tendencia similar en el aumento de la solubilidad del activo *in-vitro* para SD y HME (234). La cantidad de ácido solubilizado se favoreció cuando la neutralización fue del 100% con el preservante, con excepción de lo ocurrido con el ácido salicílico.

Figura 3-23 Cantidad máxima de ácido solubilizado en agua para los CPEs obtenidos por HME y SD.



De esta manera, la formación del complejo mejora la solubilidad en agua de los ácidos en estudio (excepto para EuAs₁₀₀), respecto a la solubilidad de partida de los activos (Tabla 1-3), y del Eu, que es insoluble a un valor de pH superior de 5 en agua (235).

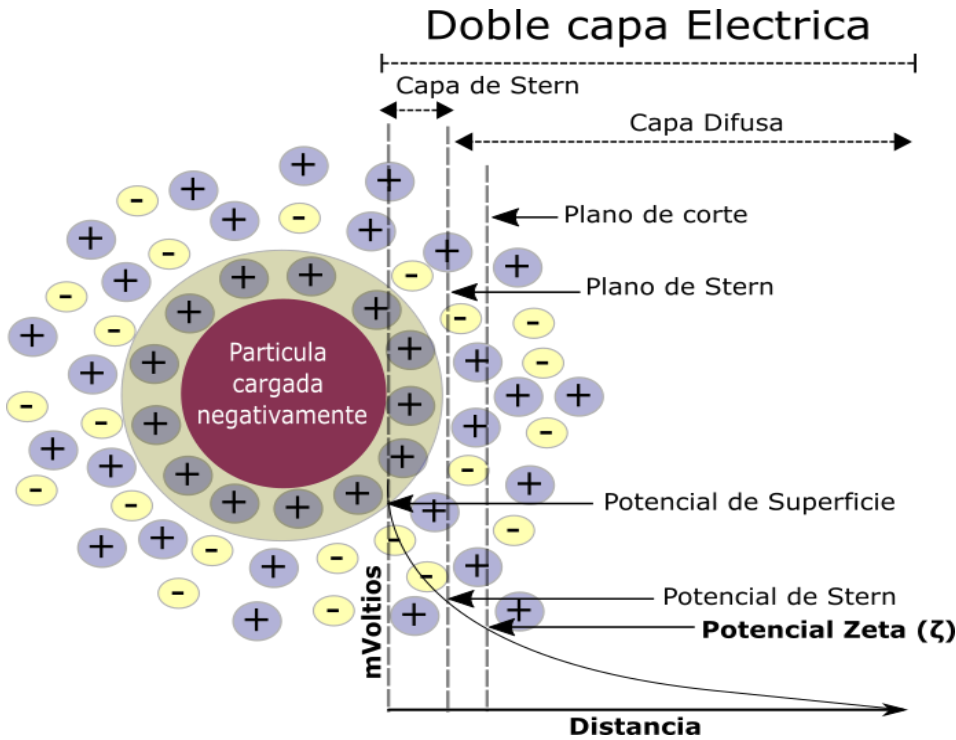
3.5.2 Evaluación del potencial ζ

Cuando hay una interfase sólido-líquido se presenta una distribución de cargas eléctricas alrededor de las partículas del sólido, dicha distribución se conoce como doble capa eléctrica (DCE) y también se evidencia en la superficie de las nanopartículas dispersas en un líquido. La DCE se forma debido a la disociación de grupos superficiales, la adsorción de iones determinantes de carga y la sustitución isomórfica (236). Esta carga superficial crea un campo electrostático que afecta la distribución local de iones en la mayor parte del líquido. Este campo electrostático, en combinación con el movimiento de los iones, crea una contra carga y, por lo tanto, apantalla la carga eléctrica superficial.

La carga eléctrica neta en esta capa difusa de apantallamiento es igual en magnitud a la carga superficial neta, pero tiene el signo opuesto. Como resultado, la estructura completa es eléctricamente neutra. Algunos de los contraiones podrían adsorberse específicamente cerca de la superficie y contribuir a lo que se llama la capa de Stern (Figura 3-24). La parte exterior de la capa de apantallamiento se suele denominar capa difusa.

La capa difusa, o al menos parte de ella, puede moverse bajo la influencia de una tensión tangencial. Hay un plano de deslizamiento introducido convencionalmente que separa el fluido móvil del fluido que permanece adherido a la superficie. El potencial eléctrico en este plano se denomina potencial electrocinético o potencial ζ (237).

Figura 3-24 Representación de la estructura de la doble capa eléctrica según el modelo de Gouy-Chapman-Stern (adaptado de la ISO 13099-1) (238).



Las partículas cargadas en su superficie, dispersas en un medio, pueden tener movimiento y desplazarse en dicho medio. En consecuencia, la velocidad de desplazamiento (V) de la partícula es directamente proporcional al producto de su carga (q) y el gradiente de potencial eléctrico (E), e inversamente proporcional al coeficiente de fricción (f) relativo a la forma y el tamaño de partícula, lo cual está relacionado con la viscosidad del medio (Ecuación 3-3).

$$V = \frac{qE}{f} \quad (3-3)$$

La movilidad electroforética (μ) es un caso particular de la velocidad de desplazamiento de una partícula cargada, cuando se aplica un campo eléctrico y su signo es igual al de la carga de la partícula. Se puede decir que la μ de una partícula coloidal que se mueve en un líquido bajo un campo eléctrico aplicado es una cualidad importante que proporciona información sobre las propiedades eléctricas de la superficie de la partícula.

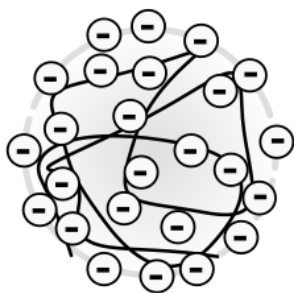
Para el cálculo de la μ hay varias fórmulas, como la de Smoluchowski (Ecuación 3-4) que relaciona la μ y el potencial ζ de la partícula.

$$\mu = \frac{\epsilon_0 \epsilon_m \zeta}{\eta} \quad (3-4)$$

Donde ϵ_0 y ϵ_m son las constantes dieléctricas en el vacío y en el líquido de las partículas, respectivamente, y η es la viscosidad dinámica del medio (237). El potencial ζ 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 (239). De esta manera, midiendo la movilidad electroforética se puede obtener el potencial ζ , mediante alguna de las ecuaciones existentes, cada una fundamentada en una teoría particular. Dependiendo de la dureza de la partícula se han generado tres teorías de la electroforesis para calcular μ : 1) para partículas duras o sólidas, 2) para polielectrolitos esféricos (o esferas porosas) y 3) para partículas suaves o blandas (Figura 3-25).

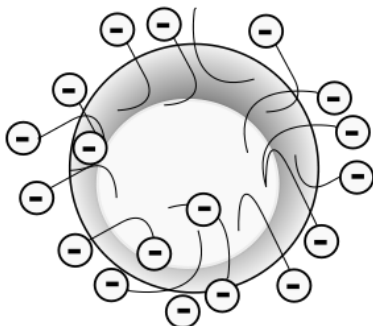
Figura 3-25 Teoría de la electroforesis para partículas esféricas duras, suaves y para polielectrolitos esféricos, y los autores que la desarrollaron (adaptado de Electrophoresis of soft particles Ohshima, Hiroyuki 1995) (240).

Polielectrolito esférico



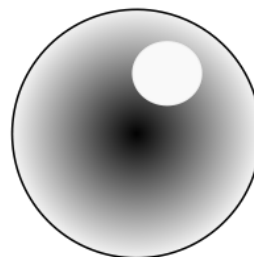
Hermans, Fujita, Overbeek, Stigter.

Partícula suave



Donath, Pas-tuschenko, Jones, Wunderlich, Levine, Sharp, Brooks, Ohshima.

Partícula dura



Smoluchowski, Htickle, Henry, Overbeek, Booth, Dukhin, Derjaguin, O'Brien, White, Hunter.

La aproximación de Smoluchowski aplica para partículas sólidas y las teorías de polielectrolitos esféricos y partículas suaves no incluyen en su modelo matemático la relación con el potencial ζ (240,241). Por lo tanto, para ninguna de las teorías mostradas en la Figura 3-25 se ha desarrollado un modelo que se ajuste a las particularidades del sistema a evaluar, de esta manera, en este estudio no se midió un potencial ζ verdadero, dado que no se generó un modelo matemático de conversión de la movilidad electroforética de un PE a potencial ζ , así que para guardar una lógica con lo explicado se utilizó la expresión pseudo potencial ζ ($F\text{-}\zeta$). Sin embargo, para efectos prácticos los resultados reportados permiten reconocer tendencias y hacer comparaciones, puesto que, dependiendo de su valor, pueden reflejar la presencia de una movilidad electroforética

positiva o negativa y pueden confirmar la presencia de moléculas cargadas. Se tuvieron en cuenta todas las características que describen y acompañan el informe de la medición del potencial ζ , como pH, concentración de electrolitos, temperatura y tiempo de lectura (242).

En esta investigación se empleó el instrumento Zetasizer Malvern Nano ZS, que permite hacer la medición del potencial ζ a partir de la señal electrocinética correspondiente a μ y la aplicación de la ecuación de Henry (Ecuación 3-5).

$$\mu = \frac{2\epsilon_m \zeta k a}{3\eta} \quad (3-5)$$

Donde $k a$ es la función de Henry, la cual generalmente usa valores de 1,5 y 1,0. Las determinaciones electroforéticas del potencial ζ se realizan con mayor frecuencia en medios acuosos y con una concentración moderada de electrolitos; para estos casos se utiliza $k a$ 1,5 que se conoce como aproximación de Smoluchowski. La μ se obtiene por electroforesis, y el instrumento somete a la solución de moléculas o a la dispersión de partículas a un campo eléctrico, generando el movimiento de estas en función de su potencial ζ , a una velocidad que es determinada por la técnica de velocimetría láser Doppler. Para este estudio se aplicó la aproximación de Smoluchowski, que ha sido reportada en estudios previos de sistemas tipo complejo polielectrolito (18,118,243–245).

Teniendo en cuenta la metodología planteada, se realizaron las mediciones del $F\text{-}\zeta$ a dispersiones de los CPEs a una concentración de 0,06% en ácido, valor que permite comparar con las otras propiedades fisicoquímicas evaluadas en dispersión, incluida la evaluación antimicrobiana (Capítulo 4), en condiciones de pH ligeramente ácidas. El rango de concentración del polímero para cada uno de los sistemas estuvo entre 0,14 y 0,21%, cercano a lo recomendado por investigaciones con sistemas similares (226,245–247).

Los resultados de $F\text{-}\zeta$ y pH para las dispersiones de los complejos se presentan en la Tabla 3-13. El $F\text{-}\zeta$ varió entre 24,3 y 40,2 mV, congruente con los potenciales positivos generados por dispersiones de PE básicos, y similar a lo reportado por Quinteros 2010, específicamente para los complejos con ácido benzoico y salicílico (248).

Las dispersiones muestran valores positivos $F\text{-}\zeta$, aunque los CPEs tengan un alto porcentaje de condensación contraiónica. El comportamiento observado puede interpretarse de acuerdo con los modelos teóricos de doble capa eléctrica dado por Jimenez-Kairuz 2004, como un modelo constituido por dos fases interpenetradas: fase

macromolecular y fase fluida (249). El modelo propone que, en condiciones de equilibrio un PE ácido que interacciona con un contraión, conforma un microentorno macromolecular donde la concentración de especies catiónicas es mayor que en el seno de la solución. Esto ocurre como consecuencia de la atracción electrostática de las cargas negativas remanentes del PE que están siendo neutralizadas con el contraión positivo por condensación iónica, en equilibrio con una proporción de contraiones con mayor grado de libertad, algunos de los cuales poseen suficiente energía cinética para migrar al seno de la solución. De esta manera, el microentorno macromolecular tendrá permanentemente cargas iónicas con capacidad de interactuar con un campo eléctrico.

Por otra parte, en la práctica valores positivos o negativos de $F-\zeta$ cercanos a $-30,0$ y $+30,0$ mV en un sistema disperso (como es el caso de los CPEs obtenidos, Tabla 3-13) se relacionan con su alta estabilidad coloidal (250), lo que concuerda con la investigación hecha por Alarcón L (2017), en la que se estudió la interacción ácido-base entre PE ácidos y fármacos de carácter básicos, demostrando la estabilidad de las dispersiones (243).

Tabla 3-13 Valores de pseudo potencial zeta ($F-\zeta$) para los diez complejos en dispersión. Concentración al 0,06 % en ácido y, medio dispersante agua desionizada con 10uL de NaCl 10mM.

<u>Secado por aspersión</u>		
	$F-\zeta$ mV (CV)	pH (CV)
EuB ₁₀₀	26,9 (2,2)	4,9 (0,4)
EuB ₇₅ Cl ₂₅	24,3 (1,2)	5,6 (0,9)
EuHB ₁₀₀	28,1 (3,4)	5,1 (1,3)
EuHB ₇₅ Cl ₂₅	24,8 (2,1)	5,6 (0,7)
EuAs ₇₅ Cl ₂₅	40,2 (3,1)	4,1 (1,2)
<u>Extrusión por fusión</u>		
	$F-\zeta$ mV (CV)	pH (CV)
EuB ₁₀₀	34,7 (1,84)	4,7 (0,8)
EuB ₇₅ Cl ₂₅	32,5 (3,3)	5,5 (1,1)
EuHB ₁₀₀	30,5 (4,4)	5,0 (0,6)
EuHB ₇₅ Cl ₂₅	26,9 (4,1)	5,4 (0,9)
EuAs ₇₅ Cl ₂₅	35,8 (2,6)	4,5 (1,4)

*Coeficiente de variación (CV)

Los resultados ilustran una tendencia de disminución del $F-\zeta$ cuando los CPEs tiene en su composición al ion cloruro. La presencia de este ion, por la neutralización con el HCl, podría facilitar la apertura de las cadenas del PE, lo que a su vez promovería la condensación iónica llevando a un descenso del $F-\zeta$. En la literatura se observa que las variaciones en composición cuando no hay ninguna interacción electrostática entre el activo y el PE, no

afectan el potencial electrocinético del sistema a diferencia de lo que sucede para los CPEs de este estudio. Ejemplo de ello son las dispersiones sólidas entre Eudragit E100 y curcumina (251) y el sistema ciprofloxacina- Eudragit RS100 (249).

Por otra parte, dada la relevancia del pH sobre el potencial electrocinético en una dispersión de CPE, se evaluó el potencial electrocinético de las dispersiones en un rango de pH de 4,5 a 9,0. En las Figuras 3-26 a la 3-30 se muestran los resultados del $F-\zeta$ en función de esta variable, para cada una de las dispersiones. Adicionalmente, se compara el $F-\zeta$ entre CPEs semejantes pero obtenidos por HME y SD.

Figura 3-26 Efecto del pH sobre el $F-\zeta$ a 25°C para EuB₁₀₀ obtenido por HME y SD.

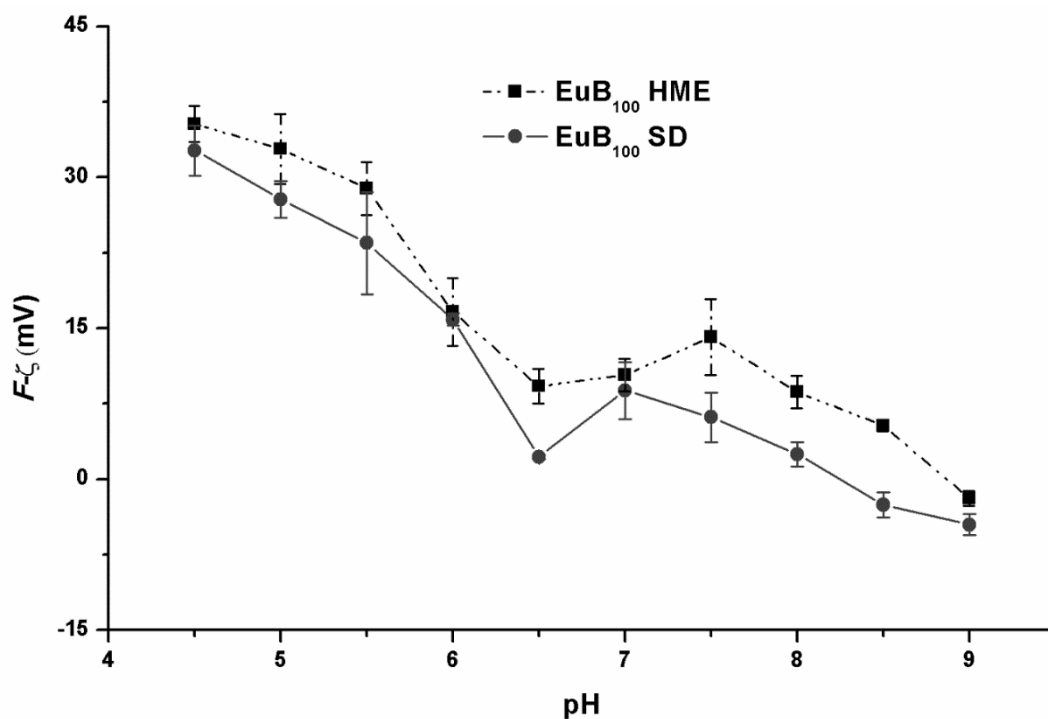


Figura 3-27 Efecto del pH sobre el $F\text{-}\zeta$ a 25°C para $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$ obtenido por HME y SD.

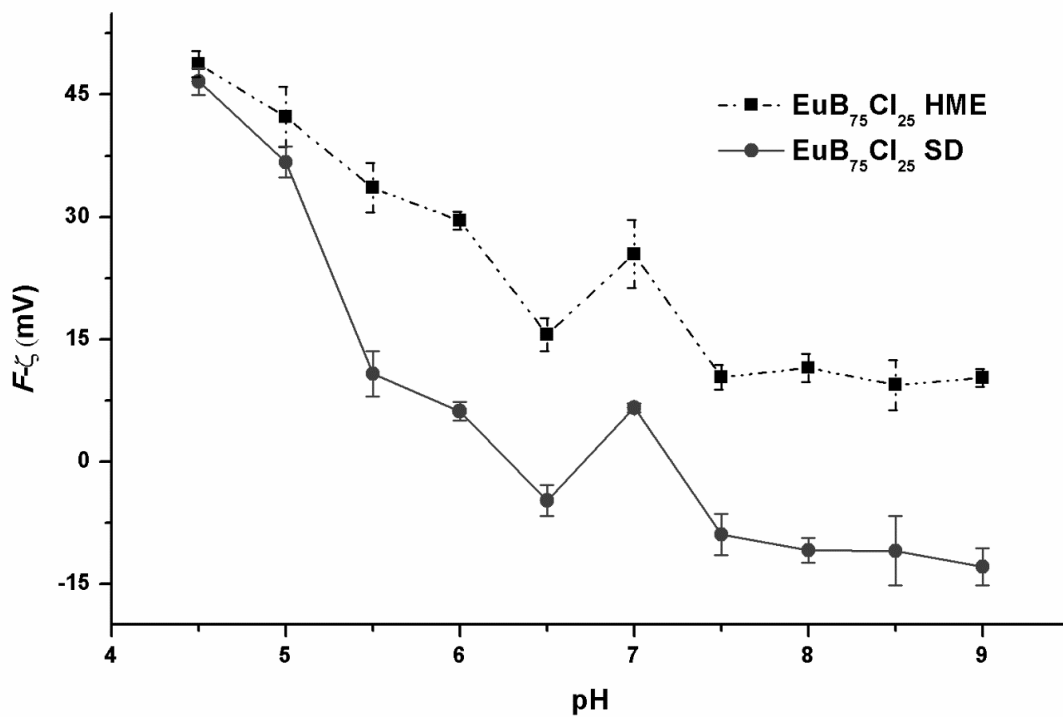


Figura 3-28 Efecto del pH sobre el $F\text{-}\zeta$ a 25°C para EuHB_{100} obtenido por HME y SD.

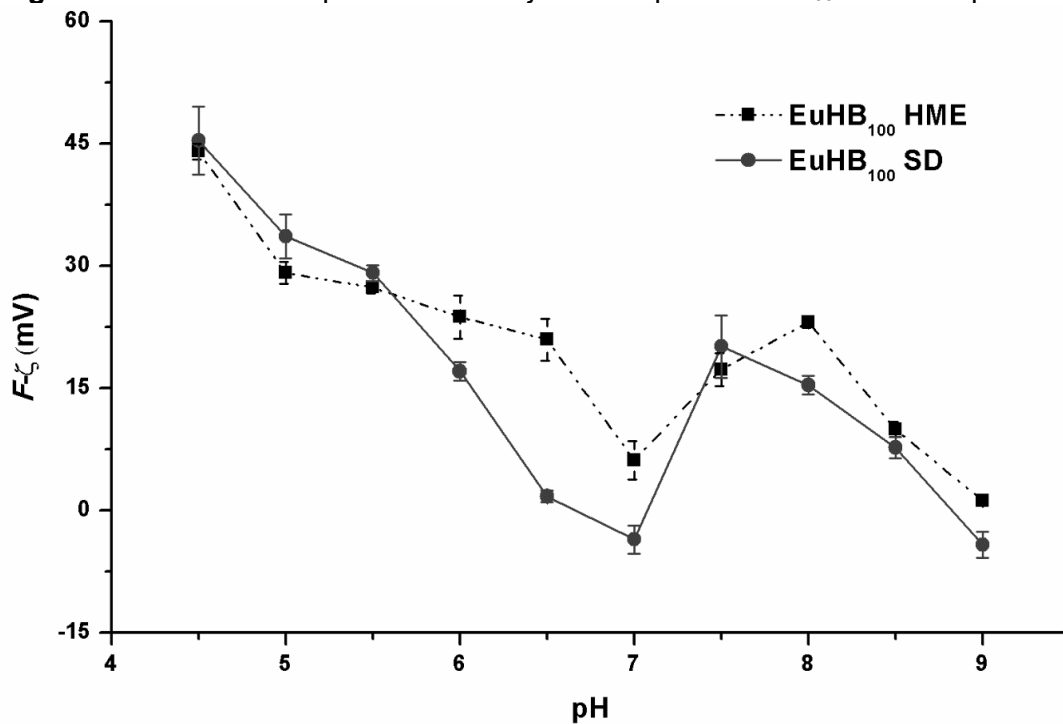


Figura 3-29 Efecto del pH sobre el $F-\zeta$ a 25°C para $\text{EuHB}_{75}\text{Cl}_{25}$ obtenido por HME y SD.

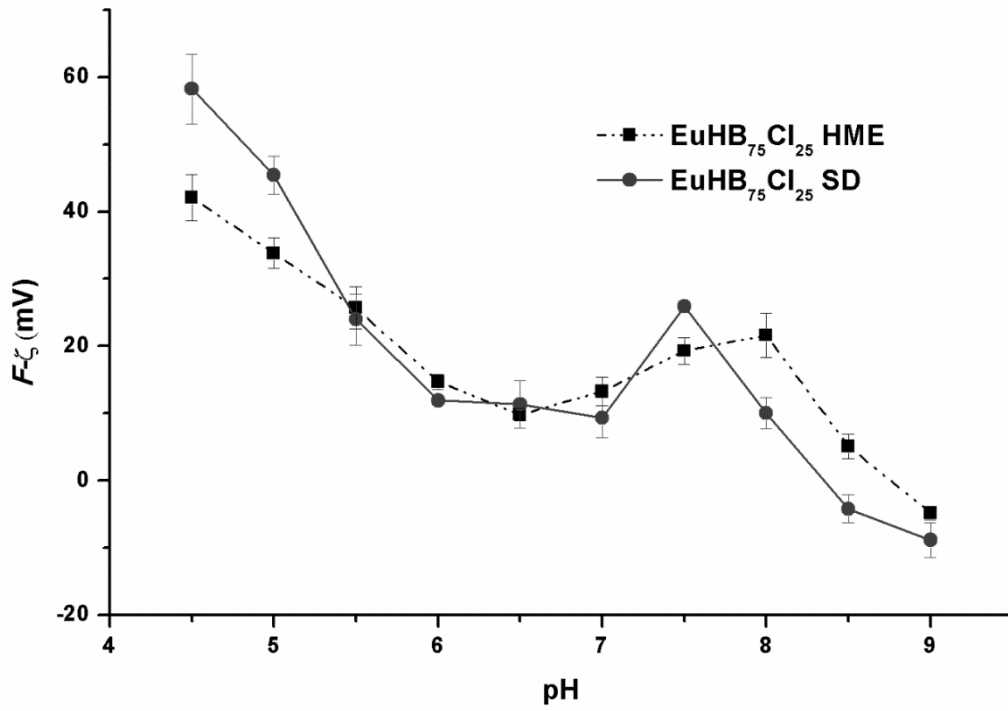
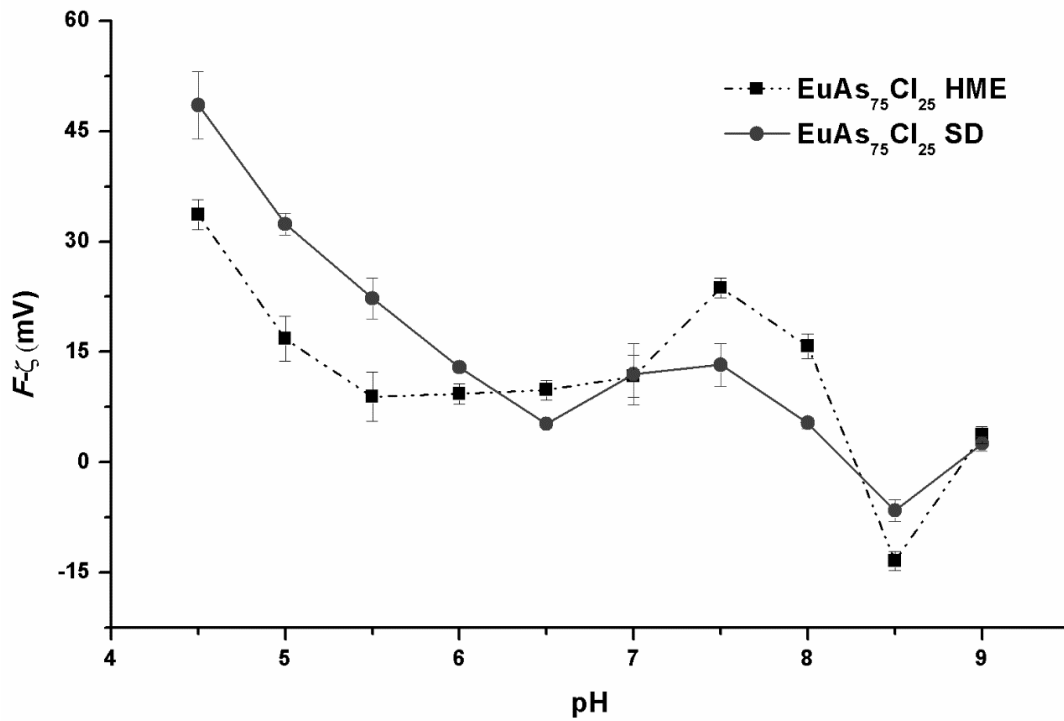


Figura 3-30 Efecto del pH sobre el $F-\zeta$ a 25°C para $\text{EuAs}_{75}\text{Cl}_{25}$ obtenido por HME y SD.

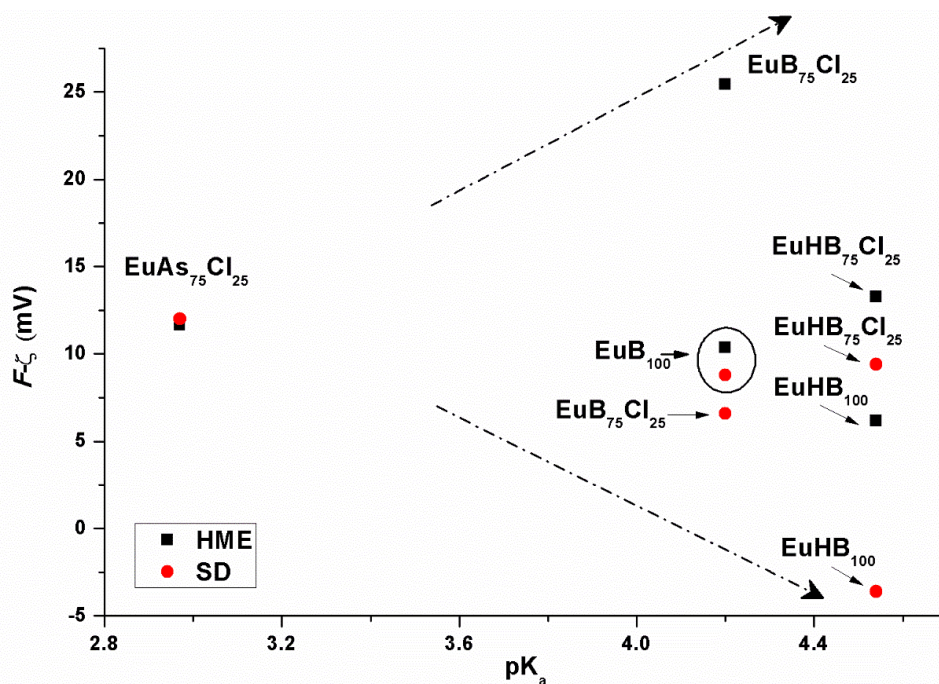


De los resultados presentados en las Figuras 3-26 a 3-30, se evidencia una tendencia de la disminución del $F\text{-}\zeta$ con el aumento del pH. Esto podría relacionarse con la variación en el grado de ionización de los grupos amino expuestos del Eu, lo cual es consistente con lo reportado por Salamanca et al., 2019 para el ionómero EuCl_{100} (245). A pH cercano al valor del pK_a (a pH superiores de 8,0), los CPEs disminuyen su ionización a tal grado, que se promueve el acercamiento entre ellos, generando agregados y formación de múltiples redes que aumentan el tamaño de partícula y la polidispersidad del sistema (252).

Adicionalmente, se observa la influencia de la metodología de obtención del CPE en el $F\text{-}\zeta$. Los valores son ligeramente mayores para los obtenidos por HME y especialmente los neutralizados con AB y AHB. Esta diferencia se entiende por la manera en que las cadenas del polímero se hidratan, siendo más fácil en aquellos CPEs elaborados por SD, en los que las cadenas están menos compactadas favoreciendo la entrada de medio, lo cual conlleva a una relajación de las cadenas poliméricas, permitiendo la neutralización de las cargas positivas en toda su estructura.

Para evaluar la influencia del ácido que hace parte del CPE sobre el $F\text{-}\zeta$, se construyó la gráfica de la Figura 3-31, empleando los resultados a pH 7,0. Se observa que a medida que el pK_a de los ácidos aumenta, los valores $F\text{-}\zeta$ de los CPEs se diferencian entre sí, incluso a un mismo valor de pK_a . Adicionalmente, se evidencia la influencia de la metodología de obtención sobre esta propiedad (con excepción del $\text{EuAs}_{75}\text{Cl}_{25}$). Este comportamiento podría estar relacionado con que, a este valor de pH los ácidos con pK_a menor se encuentran más ionizados, resultando en más cargas en el medio que podrían neutralizar las del Eu. Cuando el pK_a es mayor, la ionización ocurre en menor proporción, de tal manera que los grupos amino protonados del Eu estarán menos neutralizados con la carga negativa de los ácidos, reflejándose en una diferencia en los $F\text{-}\zeta$ de los CPEs. La inclusión de iones cloruro tuvo una gran influencia en la diferenciación de los valores de $F\text{-}\zeta$ en los CPEs. Esta diferenciación fue notoria en los CPEs con AHB aumentando el $F\text{-}\zeta$ cuando se incluyeron iones cloruro, lo que podría deberse a que el ácido AHB se disocia menos por la presencia de altas cantidades de ion H^+ proporcionadas por el HCl, manteniéndose las cargas positivas en la estructura del PE al disminuir su neutralización.

Figura 3-31 Relación entre los pKa de los ácidos estudiados y el $F-\zeta$ de las dispersiones de los CPEs a pH 7,0, con 0,06% en ácido.



3.5.3 Comportamiento de liberación de los CPEs

La evaluación de la liberación de un activo desde una forma de dosificación sólida, incluyendo las DSAs, se hace habitualmente mediante el ensayo de disolución de la farmacopea utilizando los diferentes aparatos (comúnmente 1 y 2), (58,105,167). En los CPEs, a diferencia de las DSAs, el activo está principalmente interactuando iónicamente con el PE, así que el ensayo de disolución por sí solo no tiene la capacidad de diferenciar entre el activo libre y el complejado, siguiendo metodologías analíticas sencillas como la espectrofotometría UV. Las celdas bicompartimentales de difusión estáticas y de flujo continuo, se convierten en una buena opción y son recomendadas por varias guías internacionales (253), y aplican para el estudio de la liberación de activos a partir de CPEs, cuando se emplea una membrana de diálisis entre los dos compartimentos.

Para una celda de Franz, el compartimiento donador es aquel donde se adiciona la dispersión, solución o semisólido que contiene el activo a evaluar; éste pasa por la membrana hacia el compartimiento receptor, de donde se toman las muestras correspondientes a intervalos de tiempo establecidos, para la posterior cuantificación del activo. Este proceso de difusión del

activo puede verse afectado por las condiciones y parámetros de operación del ensayo, tales como: la temperatura, la velocidad de agitación, el tipo y naturaleza de la membrana, la composición del compartimento receptor y el tener o no garantizadas las condiciones sink (sumidero o máximo gradiente) (254,255).

A partir de los resultados de la cuantificación del activo a cada tiempo de muestreo, empleando las celdas bicompartimentales, se puede evaluar la cinética de liberación, especialmente cuando se parte de sistemas de cesión controlada de moléculas biológicamente activas (52), como son los CPEs. Los modelos matemáticos empleados para tal fin, describen la dependencia de la liberación en función del tiempo (256). Estos modelos son una herramienta importante para diseñar formulaciones farmacéuticas, evaluar procesos de liberación de activos *in vitro* e *in vivo* y, en general, idear el diseño óptimo para nuevos sistemas (257).

Existen diferentes modelos matemáticos que tienen en cuenta los fenómenos fisicoquímicos y las características propias del sistema de liberación (por ejemplo, la forma). Entre los principales modelos cinéticos de liberación se destacan, orden cero, primer orden, Higuchi, Hixson–Crowell, Korsmeyer–Peppas, Baker–Lonsdale, Weibull, Hopfenberg, y Gompertz. En la Tabla 3-14 se presentan las ecuaciones asociadas a cada uno de éstos y las características que lo representan. Aunque, para los sistemas de CPEs no todos los modelos cinéticos aplican, en la Tabla 3-15 se hace un recuento de algunos de los estudios en los que se hizo uso de las celdas de Franz, para la evaluación de los ensayos de liberación a partir de CPEs y complejos interpolielectrolito (CIPEs), las condiciones de las metodologías y el modelo matemático de liberación empleado.

Tabla 3-14 Modelos matemáticos utilizados para analizar la cinética de liberación de activos.

Modelo	Ecuación	Características
Orden cero	$C_t = C_0 + k_0 t$ (3-6)	La liberación se da en función del tiempo a una velocidad constante, independiente de la concentración del activo (258). C_t es la cantidad de activo liberado en tiempo t , C_0 es la cantidad inicial de activo. k_0 constante de liberación del modelo.
Orden Uno	$LnC_t = LnC_0 + k_1 t$ (3-7)	La cantidad liberada es proporcional a la cantidad de activo que permanece en el sistema matricial (258). C_t es la cantidad de activo liberado en tiempo t , C_0 es la cantidad inicial de activo. k_1 constante de liberación del modelo.
Higuchi	$\frac{M_t}{M_\infty} = k_H t^{\frac{1}{2}}$ (3-8)	La liberación es directamente proporcional a la raíz cuadrada del tiempo (259). M_t/M_∞ es la fracción de activo liberado en tiempo t , k_H constante de liberación para el modelo.

Hixson-Crowell	$\sqrt[3]{C_0} = \sqrt[3]{C_t} + k_{HC}t \quad (3-9)$	Aplica a formas de dosificación tales como tabletas, en las que la disolución ocurre en planos paralelos a la superficie de la forma de dosificación; esta superficie disminuye proporcionalmente con el tiempo y la forma geométrica se mantiene constante (260). C _t es la cantidad de activo liberado en tiempo t, C ₀ es la cantidad inicial de activo, k _{HC} constante de liberación para el modelo.
Korsmeyer-Peppas	$\frac{M_t}{M_\infty} = k_{kp}t^n \quad (3-10)$	Dependiendo del valor de n es posible establecer el mecanismo de liberación (261). M _t /M _∞ es la fracción de activo liberado en tiempo t y n es el exponente de liberación, k _{kp} constante de liberación para el modelo.
Baker-Lonsdale	$\frac{3}{2} \left(1 - \left[1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right]^{2/3} \right) - \frac{M_t}{M_\infty} = \frac{3D_m C_{ms}}{r^0 C_0} t \quad (3-11)$	El modelo se describe para la liberación controlada de fármacos a partir de matrices esféricas (262). M _t /M _∞ es la fracción de activo liberado en tiempo t, D _m es el coeficiente de difusión, C _{ms} la solubilidad del fármaco en la matriz, r ⁰ es el radio de la matriz esférica.
Hopfenberg	$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left[1 - \frac{k_0 t}{C_0 a_0} \right]^n \quad (3-12)$	Utilizado para explicar la liberación del fármaco a partir de polímeros erosionables y diversas formas geométricas (263). M _t /M _∞ es la fracción de activo liberado en tiempo t, k ₀ la constante de velocidad de erosión, C ₀ la concentración inicial, a ₀ es el radio inicial (esfera o cilindro) o la mitad del espesor (lámina) del sistemas y n es un factor de forma que toma valor 1, 3 o 3 para láminas, cilindros o esferas, respectivamente.
Weibull	$m = 1 - \exp \left[\frac{-(t-T_i)^b}{a} \right] \quad (3-13)$	Este modelo se considera más útil para comparar los perfiles de liberación de fármacos de los sistemas de matriz (264). m es la fracción de fármaco acumulado en el tiempo, T _i es el parámetro de localización, a es el parámetro de escala y define la escala de tiempo del proceso y b es el parámetro de forma el cual es característico del tipo de curva.
Gompertz	$X_t = X_{max} \exp[-\alpha e^{\beta \text{Log}(t)}] \quad (3-14)$	Útil para comparar los perfiles de liberación de fármacos que tienen buena solubilidad y tasa de liberación intermedia (265). X _t es el porcentaje disuelto en el tiempo t dividido por 100, X _{max} es la disolución máxima, α determina la proporción no disuelta en el tiempo t = 1 y se describe como ubicación o parámetro de escala, β tasa de disolución por unidad de tiempo descrita como parámetro de forma.

Tabla 3-15 Estudios de liberación de sistemas CPEs en celdas de difusión bicompartimentales.

Autor	Año	Vol Donor (ml)	Vol Receptor (ml)	Vol. (ml) Muestra	Área de difusión (cm ²)	t final (h)	Medio	CPE Evaluado	Modelo matemático
Palena (266)	2012	1g	15	1	1.25	7	H ₂ O, NaCl, pH 6.8, pH 1.2	CIPE Eu-Fx-Eu (Fx: At, Pr y Me)	K-P
Quinteros (267)	2012	3	76	4	N.R	7	NaCl	Eu-Fx (Fx: Flur, Nap, Ket, Ind,D)	Cero
Saladini (103)	2012	15mg	12	0.1	1.5	6	pH 5.5	CIPE CH-Trac-Peptina	N.R
Battistini (268)	2013	1	17	0.9	N.R	3	H ₂ O	HA-Fx (Fx: At, Pr, Li)	N.R

Autor	Año	Vol Donor (ml)	Vol Receptor (ml)	Vol. (ml) Muestra	Área de difusión (cm ²)	t final (h)	Medio	CPE Evaluado	Modelo matemático
Ramirez-Rigo (18)	2014	4	76	1.5	N.R	7	H ₂ O y NaCl	Eu-EnM	Cero
Palena (244)	2015	1	15	1	1.25	7	H ₂ O, NaCl, pH 6.8, pH 1.2	CIPE Eu-Fx50-EuL50 Fx: AS, AB, Ket y Nap	K-P
Cerchiara (269)	2016	10 mg	N.R	N.R	N.R	6	pH 2.0 pH 7.4	CH-VM-CMC	N.R
Sonje (270)	2016	3	N.R	N.R	N.R	8	pH 6.6	CH-Ond-Gell	Cero, uno y Higuchi
Bijukumar (250)	2016	2	8	1	1.767	8	pH 7.4	CIPE Alg-HA-CH (Fx: Ind)	N.R
García (271)	2016	0.5g	15	1	1.25	24	H ₂ O NaCl pH 6.8	Dep-Cip	Higuchi
Guzman (148)	2016	1	16	1	N.R	5	H ₂ O NaCl FGS	Eu-Ris	N.R
Alarcon (243)	2017	1	16	0.9	1.25	3	H ₂ O NaCl	ADN-Fx Fx: Li, At, Pr	Higuchi
Lefnaoui (272)	2018	N.R	15	1	1.5	24	pH 7.4	CH-Alg Fx: KF	N.R
Carton (273)	2019	2	10	1	N.R	72	pH 7.4	HA-Pentamina	N.R
Sumaila (274)	2019	3	N.R	3	1.77	8	pH 6.8	CIPE SL-CH Fx: RIF	N.R
Dubey (275)	2020	3	20	2	N.R	8	FLS	CIPE CH-Peptina Fx: BZN	N.R

Convenciones: **Vol. Donor:** volumen en el compartimento donador; algunos estudios reportan el contenido en peso, estos fueron indicados en gramos (g) y miligramos (mg). **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; **Medio:** el empleado en el compartimento receptor; **t final:** tiempo total de ensayo en horas; **Modelo:** modelo cinético utilizado para estudiar la liberación. **N.R:** no reportada; **pH 2:** buffer a pH 2; **pH 1.2:** buffer a pH 1.2; **H₂O:** agua; **NaCl:** solución acuosa de NaCl al 0,9%; **pH 6,8:** buffer de fosfatos a pH 6,8; **FGS:** fluido gástrico simulado; **FLS:** fluido lacrimal simulado; **CH:** quitosano; **SL:** lecitina de soya; **Alg:** Alginato; **DeP:** polímero dendronizado; **CMC:** Carboximetilcelulosa; **Gell:** Goma gellan; **VM:** Vancomicina; **AS:** ácido salicílico; **AB:** ácido benzoico; **Ind:** indometacina; **Li:** lidocaína; **Cip:** ciprofloxacina; **Me:** metoclopramida; **Eu:** Eudragit E; **At:** atenolol; **CIPE:** complejo interpolielectrolito; **Fx:** fármaco o activo; **Pr:** propranolol; **Flur:** flurbiprofeno; **Nap:** naproxeno; **Ket:** ketoprofeno, **D:** diclofenaco; **HA:** ácido hialurónico; **Ond:** clorhidrato de ondansetrón; **EnM:** enalapril maleato; **Trac:** hidrocioruro de tacinina; **Me:** metoclopramida; **Ris:** risedronato; **KF:** Ketotifeno fumarato; **RIF:** Rifampicina; **BZN:** Brinzolamida; **K-P:** Kormeyer-Peppas; **Cero:** cinética de orden cero; **Uno:** cinética de orden uno.

Para describir el comportamiento de liberación de los CPEs se seleccionaron las condiciones teniendo en cuenta los estudios mostrados en la Tabla 3-15 y la investigación realizada por Dallos (2019) (21). De esta manera, para el volumen del compartimento donador se eligió 1ml, valor empleado en algunas investigaciones para CPEs. Para el compartimento receptor se tuvo en cuenta que el volumen fuese suficiente para mantener las condiciones sink, utilizándose un área superficial de 3,51cm² y un volumen de 58ml,

muestreando 2ml con reposición. En cuanto a la temperatura, en la mayoría de los estudios presentados estuvo en 37°C, cambiando a 32°C cuando se desafió un sistema para liberación ocular. Sin embargo, los ácidos evaluados en este estudio presentan una óptima actividad antimicrobiana en el rango de 25 a 35°C, por lo que se selecciona la temperatura de 25°C para poder relacionar posteriormente estos resultados con los de actividad. Se eligió ocho horas como tiempo total del estudio, suficiente para evaluar la cinética de liberación del activo desde un CPE. Se emplearon agua y buffer de fosfatos a pH 6,0 y 6,9, como fluidos a incluir en el medio receptor, muy empleados en este tipo de estudios, con el fin de correlacionar posteriormente los resultados de la liberación con los de la actividad antibacteriana determinados en estas condiciones.

Teniendo en cuenta los estudios mostrados, para el análisis cinético del comportamiento de liberación de los CPEs de este estudio, se emplearon los modelos cinéticos de orden cero, primer orden, Higuchi y Korsmeyer–Peppas.

▪ **Determinación de las condiciones sink**

En los ensayos de liberación es fundamental asegurar las condiciones “sink”, para lo cual se realizaron los cálculos de solubilidad para cada uno de los sistemas estudiados, fundamentados en la metodología propuesta por Quinteros et al., 2008 (46). En la Tabla 3-16 se presenta la información relacionada con la máxima concentración que se podría alcanzar en el compartimento receptor si difundiera el 100 % del activo a través de la membrana de diálisis. Adicionalmente, se incluye la solubilidad del AB, del AS y del AHB al pH del fluido del medio receptor y se determina cuantas veces cabría esa cantidad más alta de activo disuelto, en el volumen establecido (factor de saturación). Hay que tener en cuenta que para garantizar las condiciones sink o condiciones de inmersión perfectas, la concentración del activo en el medio receptor no debe superar el 10% de la solubilidad del activo en el medio utilizado o según otros autores, tener un medio de disolución que corresponda al menos de tres a diez veces el equivalente al volumen de saturación (276–279). En la Tabla 3-16, se observa que los factores calculados están muy por encima de los valores mencionados, indicando que se garantizaron las condiciones sink para la evaluación de todos los CPEs, en las diferentes condiciones de fluido receptor estudiadas. En cuanto a los valores de pH, se observa que cuando el medio era buffer (pH 6,0 y 6,9), el valor de las dispersiones no cambió, mientras que en agua sí tuvo pequeñas variaciones, como era de esperarse (Tabla 3-16).

Tabla 3-16 Demostración de las condiciones sink de los ensayos de liberación (Vol donador: 1ml, concentración de complejo: 0,6% en ácido, medio dispersión agua y buffer fosfato de potasio a pH: 6,0 y 6,9).

Complejo	Concentración máxima (mg/ml) ¹	pH ²	So del ácido (mg/ml) ³	Factor de saturación ⁴
HME (medio de liberación agua)				
EuB₁₀₀	0,1034	5,06	28,0	271
EuB₇₅Cl₂₅	0,1034	5,20	37,4	362
EuHB₁₀₀	0,1034	5,31	34,4	333
EuHB₇₅Cl₂₅	0,1034	5,63	66,5	643
EuAs₇₅Cl₂₅	0,1034	3,72	13,9	134
SD (medio de liberación agua)				
EuB₁₀₀	0,1034	5,01	25,4	245
EuB₇₅Cl₂₅	0,1034	5,12	31,7	306
EuHB₁₀₀	0,1034	5,11	23,6	228
EuHB₇₅Cl₂₅	0,1034	5,35	37,3	360
EuAs₇₅Cl₂₅	0,1034	3,61	11,2	109
HME y SD (pH 6,0)				
EuB₁₀₀	0,1034	6,00	217,9	2107
EuB₇₅Cl₂₅	0,1034	6,00	217,9	2107
EuHB₁₀₀	0,1034	6,00	149,2	1442
EuHB₇₅Cl₂₅	0,1034	6,00	149,2	1442
EuAs₇₅Cl₂₅	0,1034	6,00	2242,0	21672
HME y SD (pH 6,9)				
EuB₁₀₀	0,1034	6,90	1707,4	16505
EuB₇₅Cl₂₅	0,1034	6,90	1707,4	16505
EuHB₁₀₀	0,1034	6,90	1150,4	11121
EuHB₇₅Cl₂₅	0,1034	6,90	1150,4	11121
EuAs₇₅Cl₂₅	0,1034	6,90	1054,6	10194

* Los miligramos de ácido en el compartimento receptor en el t=0, fue de 6mg para todos lo CPEs. ¹Máxima concentración de ácido posible en el compartimento receptor asumiendo el 100% de la liberación (volumen de las celdas de Franz 58.0 ± 1ml), ²pH de la solución de ácido a la máxima concentración posible; ³solubilidad del ácido al pH medido; ⁴relación entre la solubilidad (concentración de saturación) y la concentración máxima posible.

De acuerdo con lo mencionado, los ensayos de liberación se realizaron en tres medios diferentes: agua, y buffers pH 6,0 y 6,9, como se presenta a continuación.

▪ Liberación en agua

Los resultados de la liberación acumulada del AB, el AHB y el AS a partir de los complejos obtenidos por HME y SD se presentan en las Figuras 3-32, 3-33 y 3-34. La liberación de los activos a partir de los CPEs, implica únicamente el paso de las especies de bajo peso molecular a través de una membrana de acetato de celulosa semipermeable (Sigma 12 kDa), lo que impide la difusión del Eudragit E100 y del CPE hacia el medio receptor. Se

observa que los porcentajes de liberación a partir de los CPEs no sobrepasaron el 45%, comportamiento acorde con sistemas similares con una cesión controlada del activo (46,55). Los ácidos sin complejar presentaron porcentajes de liberación superiores al 95% indicando un comportamiento de liberación inmediata.

Figura 3-32 Perfiles de liberación de ácido benzoico en agua, desde los CPEs obtenidos por HME y SD.

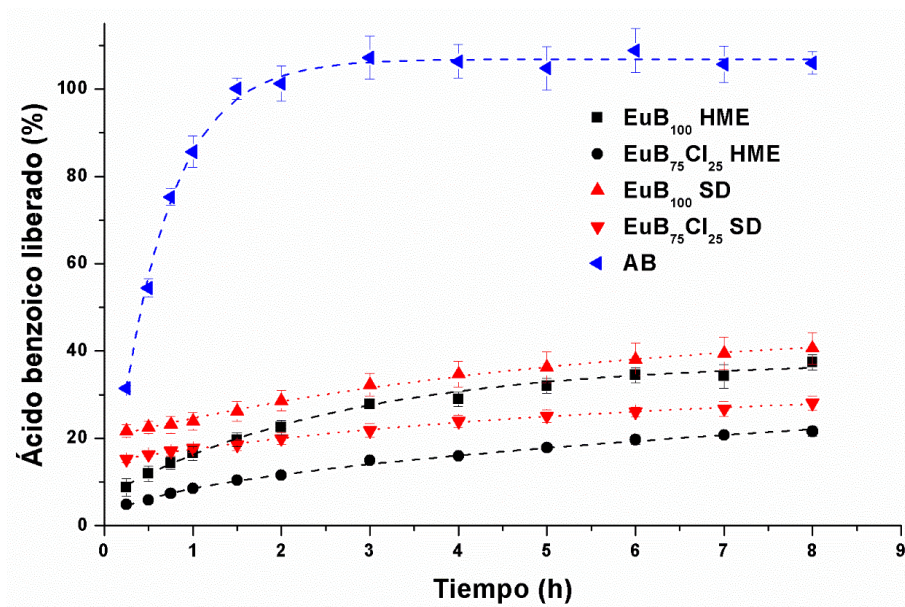


Figura 3-33 Perfiles de liberación de ácido 4-hidroxibenzoico en agua, desde los CPEs obtenidos por HME y SD.

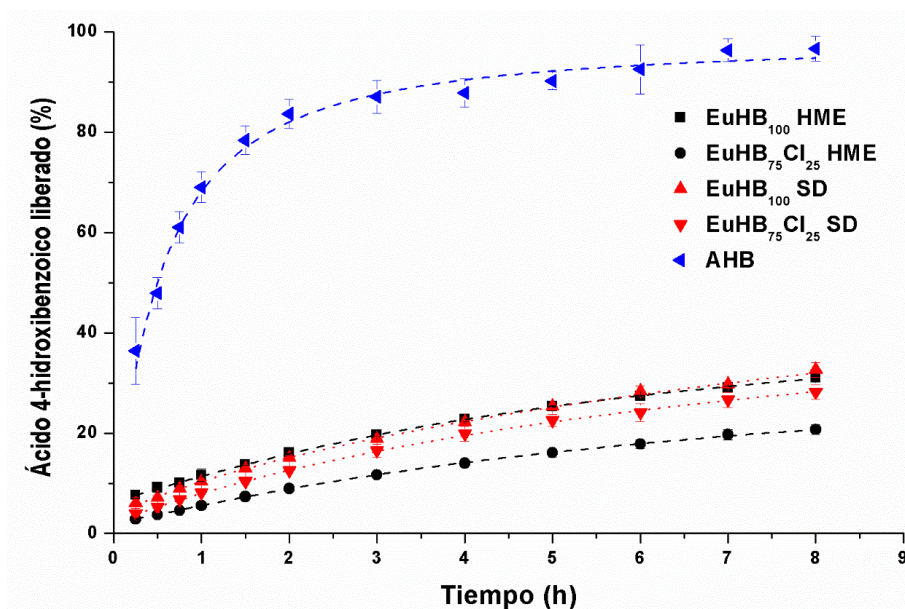
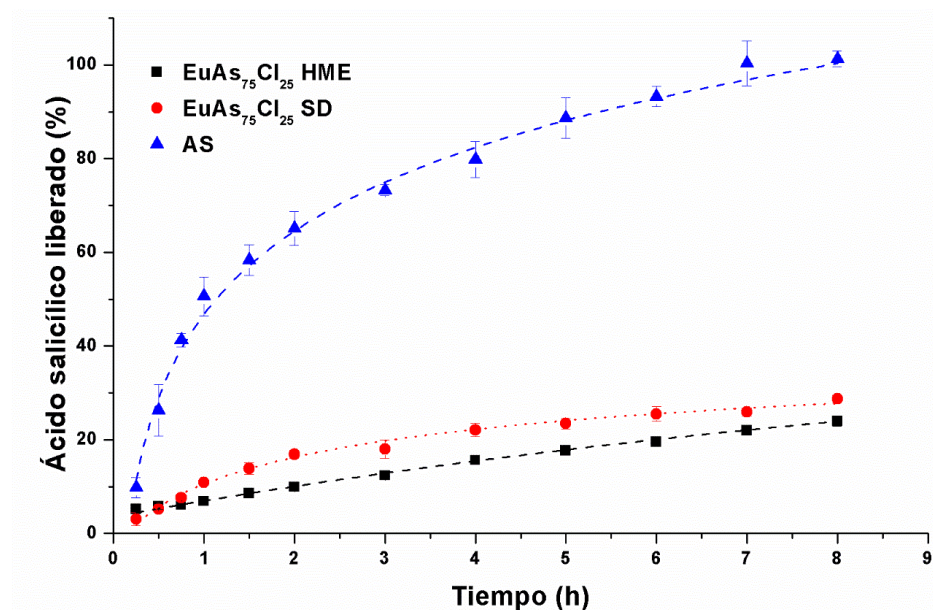


Figura 3-34 Perfiles de liberación de ácido salicílico en agua, desde los CPEs obtenidos por HME y SD.



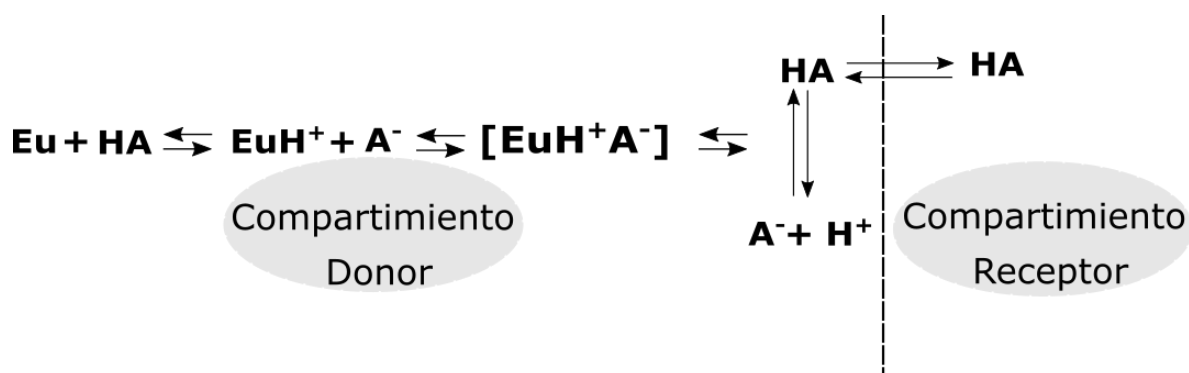
La liberación del activo se da cuando la especie disociada (A^- o H^+) y la no disociada (HA) atraviesan la membrana, teniendo en cuenta que por su tamaño son las únicas que podrían hacerlo. De acuerdo con algunas investigaciones con CPEs (41,267) se ha establecido que el mecanismo de liberación se da principalmente por la difusión de la especie neutra del activo, ya que la especie ionizada es retenida en el CPE, mediante la interacción electrostática que presenta con el PE, Eu en este estudio (Figura 3-35). Cuando la liberación del activo es baja, es una consecuencia de la baja concentración de HA libre debido al alto grado de condensación contraiónica. A medida que HA difunde hacia el medio receptor y se aleja del entorno del complejo, el equilibrio se desplaza y provee de “nuevo HA”, convirtiendo al CPE en reservorio del activo, modulando de esta manera la liberación.

En la Tabla 3-17 se observa la disminución del pH en el compartimento receptor transcurridas las ocho horas del estudio, lo que estaría confirmando la teoría de que predominantemente la especie sin disociar es la que atraviesa la membrana de acetato de celulosa. De ahí que los CPEs con las liberaciones más altas fueron las que presentaron un menor pH en el compartimento receptor al final del estudio.

Los CPEs que tuvieron como contraión al Cl^- presentaron una menor tasa de liberación, posiblemente debido a la mayor proporción de Eu en los CPEs con neutralización del 75% (Tabla 3-17). Esto aumenta la probabilidad de interacción del PE con el ácido conllevando

a una mayor retención en el CPE. Adicionalmente, la neutralización con el HCl genera un medio más ácido que podría favorecer la disociación del Eu, lo que a su vez contribuye a que el activo sea retenido en el CPE.

Figura 3-35 Equilibrio entre el CPE y un ácido orgánico de bajo peso molecular y, su paso por una membrana semipermeable.



Eu = Eudragit E100; HA = ácido orgánico de bajo peso molecular; [EuH⁺A⁻] = par iónico formado.

Tabla 3-17 Valores de porcentaje máximo liberado de ácido al t=8h y de pH relacionados con los ensayos de liberación. El pH del medio receptor (agua) en t=0 fue 5,45.

Complejos	Porcentaje de ácido liberado t= 8h	Porcentaje de Eudragit E100 en el CPE	pH del compartimento donor (t=0)	pH del compartimento receptor (t=8h)	ΔpH
HME					
EuB₁₀₀	37,4 (1,8)	1,5	5,14	4,64	0,50
EuB₇₅Cl₂₅	21,6 (1,1)	2,1	5,26	4,87	0,39
EuHB₁₀₀	31,0 (0,2)	1,4	5,22	4,76	0,46
EuHB₇₅Cl₂₅	20,7 (1,0)	1,9	5,58	5,10	0,48
EuAs₇₅Cl₂₅	23,9 (1,0)	1,9	4,11	3,42	0,69
SD					
EuB₁₀₀	40,6 (3,6)	1,5	4,95	4,25	0,70
EuB₇₅Cl₂₅	28,1 (1,6)	2,1	5,18	4,62	0,56
EuHB₁₀₀	32,6 (1,5)	1,4	5,08	4,80	0,28
EuHB₇₅Cl₂₅	28,2 (1,4)	1,9	5,41	5,23	0,18
EuAs₇₅Cl₂₅	28,7 (0,8)	1,9	4,20	3,82	0,38

El tipo de ácido orgánico que hizo parte del CPE también tuvo incidencia sobre la cantidad liberada. El comportamiento fue de mayor a menor así, AS > AB > AHB para los CPEs obtenidos por HME cuando estuvieron neutralizados en un 75% con el ácido orgánico y 25% con HCl. Por otra parte, los CPEs obtenidos por SD no tuvieron una influencia tan marcada como en HME por el tipo de ácido, aunque la tendencia se mantuvo (Tabla 3-17).

La diferencia en el comportamiento para los CPEs, parece estar relacionada con la constante disociación, presentándose una mayor liberación a menor valor de esta constante. Esto podría relacionarse con una mayor concentración de la especie neutra que es favorecida con la inclusión de HCl al sistema, y como se explicó anteriormente beneficia la difusión del activo a través de la membrana semipermeable (ver Figura 3-35).

Al comparar los perfiles de liberación teniendo en cuenta la metodología de obtención, se aprecia que los complejos producidos por extrusión por fusión tienen un menor porcentaje de liberación. Este comportamiento podría deberse a la menor difusión de los ácidos a partir de los CPEs obtenidos por esta metodología debido a la miscibilidad fármaco-polímero que favorece las interacciones por puentes de hidrogeno (280), dipolo-dipolo y van der Waals (133,152), sin dejar de lado las interacciones intermoleculares de tipo electrostático, que están presentes en los complejos obtenidos por los dos métodos (281). Estas interacciones hacen que el activo se retenga más tiempo dentro la matriz polimérica, que estaría más “compacta”, generando que la liberación se desarrolle con mayor dificultad.

Los perfiles de liberación, diferenciados por su método de obtención, se analizaron estadísticamente. En la Tabla 3-18 se presentan los valores calculados de los factores de similitud (f_2) y diferencia (f_1) para los complejos obtenidos por HME y SD. De acuerdo con estos resultados, se puede afirmar que solo los perfiles de liberación de los complejos EuHB₁₀₀ fueron similares, confirmando que para los demás casos el método de obtención sí influyó en el comportamiento de liberación de los ácidos a partir de los CPEs (234).

Tabla 3-18 Factores de similitud y diferencia, para los perfiles de liberación en agua de los CPEs producidos por HME y SD.

Extrusión por fusión Vs Secado por aspersión					
Factores	EuB ₁₀₀	EuB ₇₅ Cl ₂₅	EuHB ₁₀₀	EuHB ₇₅ Cl ₂₅	EuAS ₇₅ Cl ₂₅
Diferencia (f_1)	27	61	6	39	35
Similitud (f_2)	57	54	91	65	65
Similares	no	no	si	no	no

Para identificar los mecanismos que rigen la cinética de liberación de los ácidos a partir de las dispersiones de los CPEs y encontrar el modelo matemático al que mejor se ajusta su comportamiento, se determinaron los parámetros propios de los modelos matemáticos de orden cero, orden uno, Higuchi y Korsmeyer-Peppas. Para ello, se tuvieron en cuenta las ecuaciones planteadas en la Tabla 3-16, empleando el porcentaje de liberación para los

modelos de orden cero, uno y Higuchi, y la fracción liberada para el modelo de Korsmeyer-Peppas.

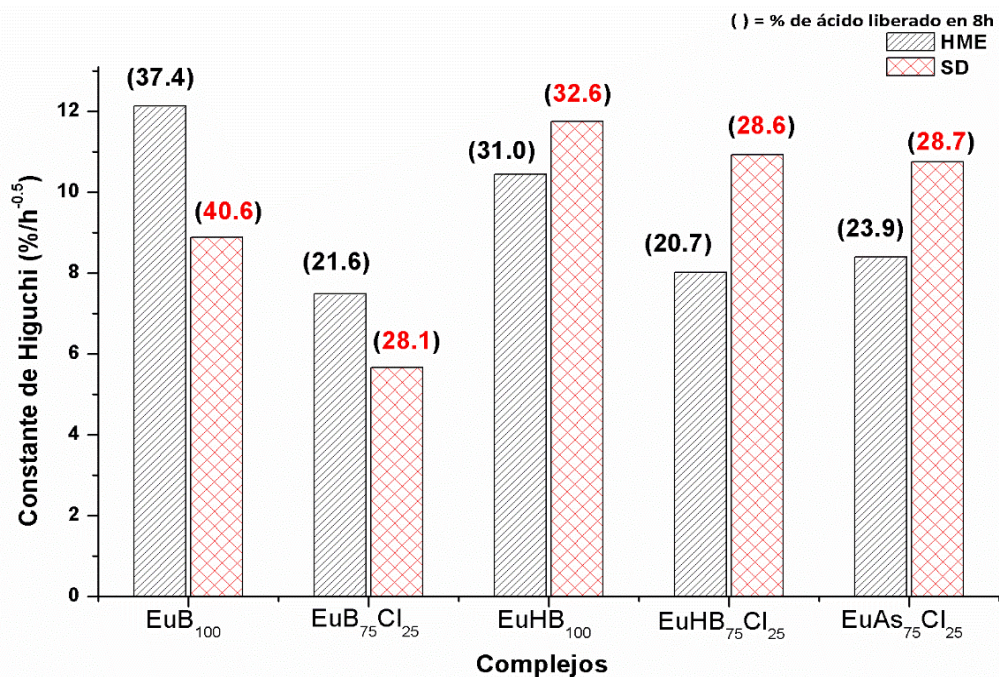
Los resultados del análisis matemático realizado se presentan en la Tabla 3-19. Los mejores ajustes, evidenciados por altos coeficientes de determinación, fueron para los modelos de Higuchi y de Korsmeyer-Peppas.

Tabla 3-19 Parámetros y coeficientes de determinación de varios modelos cinéticos de liberación para la dispersión de complejos entre Eu y los ácidos AB, AS y AHB (con concentración equivalente en ácido de 0,6 % y agua como medio receptor).

Complejos	Orden Cero		Orden Uno		Higuchi		Korsmeyer-Peppas		
	K_0 %*h ⁻¹	R ²	K_1 h ⁻¹	R ²	K_H %*h ^{-0.5}	R ²	n	K_{k-p} h ⁻ⁿ	R ²
HME									
EuB ₁₀₀	3,44	0,913	0,170	0,850	12,13	0,983	0,40	0,167	0,995
EuB ₇₅ Cl ₂₅	2,15	0,952	0,160	0,800	7,48	0,996	0,45	0,086	0,998
EuHB ₁₀₀	3,04	0,972	0,237	0,870	10,44	0,997	0,46	0,120	0,998
EuHB ₇₅ Cl ₂₅	2,36	0,980	0,171	0,896	8,01	0,996	0,62	0,058	0,999
EuAs ₇₅ Cl ₂₅	2,49	0,996	0,200	0,944	8,39	0,981	0,57	0,071	0,994
SD									
EuB ₁₀₀	2,57	0,959	0,084	0,928	8,88	0,990	0,22	0,255	0,986
EuB ₇₅ Cl ₂₅	1,64	0,967	0,076	0,939	5,66	0,996	0,20	0,181	0,988
EuHB ₁₀₀	3,43	0,979	0,203	0,885	11,75	0,997	0,54	0,106	0,999
EuHB ₇₅ Cl ₂₅	3,17	0,971	0,230	0,855	10,92	0,997	0,59	0,083	0,999
EuAs ₇₅ Cl ₂₅	3,04	0,901	0,219	0,705	10,74	0,975	0,50	0,103	0,987

En la Figura 3-36, se comparan las constantes de velocidad asociadas al modelo de Higuchi y el porcentaje liberado a las ocho horas para los complejos estudiados.

Figura 3-36 Constantes de liberación de Higuchi, de los CPEs obtenidos por HME y SD y, porcentaje de ácido liberado a las ocho horas.



De la Figura 3-36 se observa que esta constante de liberación disminuyó con la inclusión del ion cloruro en los CPEs, así como el porcentaje de ácido liberado. Este resultado está acorde con la explicación dada previamente, que a mayor presencia de especies con carga en el CPE se favorecen las interacciones iónicas que promueven la retención del activo en el complejo. Al contrastar el comportamiento de los CPEs EuB₁₀₀ y EuB₇₅Cl₂₅ obtenidos por HME con los elaborados por SD, se evidencia por HME una mayor constante de liberación y un menor de porcentaje de ácido liberado a las ocho horas. Esta tendencia se invierte en los demás complejos, lo que podría estar relacionado con la presencia del grupo hidroxilo adicional en el anillo aromático en las posiciones cuatro y dos del anillo (AHB y AS respectivamente), que influiría en la liberación del ácido al medio. Este grupo hidroxilo, interactúa con las cadenas cercanas del Eudragit E100 provocando que estas se expandan más fácilmente, lo que combinado con la menor compactación de los CPE cuando se obtiene por SD (208), permitirían la entrega del ácido a una mayor velocidad.

En cuanto a los mecanismos que rigen la liberación de los ácidos desde los CPEs, se puede afirmar que los complejos obtenidos por la interacción del Eu con AHB y AS tienen una difusión anómala o no Fickiana ($0,45 < n < 0,89$), por lo que el mecanismo de la liberación del activo estaría gobernado por la misma difusión y la expansión de las cadenas

poliméricas (282), indistintamente del método de obtención empleado. Para los demás complejos se observa un $n < 0,5$ lo que indica una difusión Fickiana, donde la velocidad de transporte del disolvente es mucho mayor que el proceso de relajación de la cadena del polímero, lo cual genera velocidades mayores de liberación (283).

▪ **Liberación a pH 6,0**

Para la evaluación de la liberación de los CPEs a este pH se empleó como medio receptor una solución acuosa de buffer de fosfato. En las Figuras 3-37, 3-38 y 3-39 se presentan los perfiles de liberación acumulada para los activos, a partir de los CPEs obtenidos por las metodologías de HME y SD. Para los CPEs evaluados, la tendencia a la modulación de la liberación se mantiene, así como los ácidos sin complejar tuvieron un comportamiento de liberación inmediata.

Figura 3-37 Perfiles de liberación del ácido benzoico en buffer pH 6,0, desde los CPEs obtenidos por HME y SD.

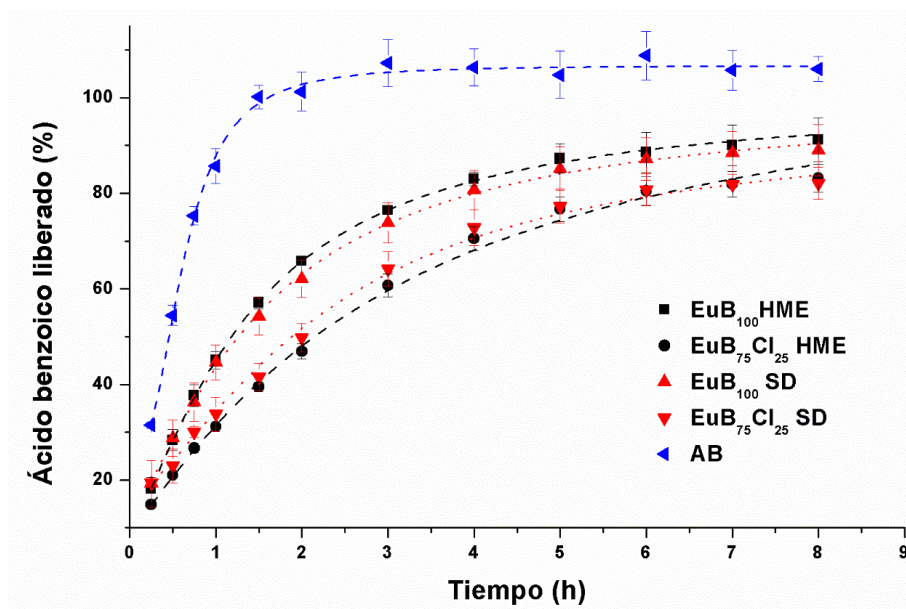


Figura 3-38 Perfiles de liberación del ácido 4-hidroxibenzoico en buffer pH 6,0, a partir de los CPEs obtenidos por HME y SD.

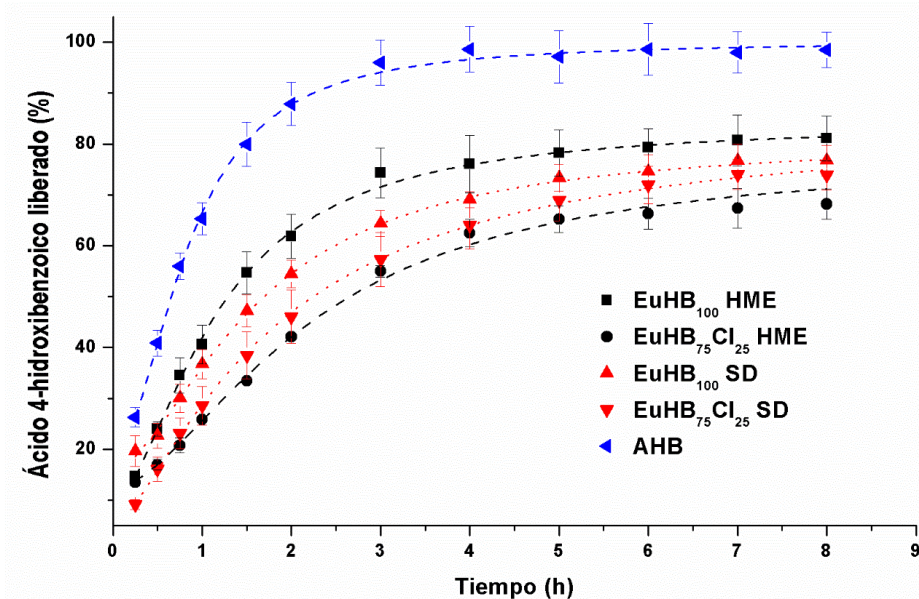
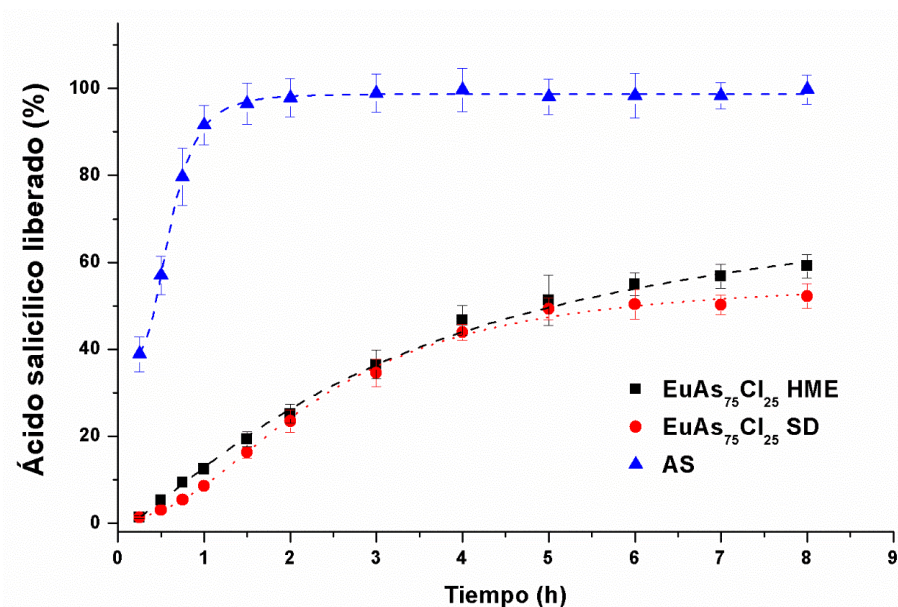


Figura 3-39 Perfiles de liberación del ácido salicílico en buffer pH 6,0, a partir de los CPEs obtenidos por HME y SD.



De acuerdo con los comportamientos de liberación presentados, es evidente la similitud de los perfiles de liberación para los diferentes CPEs producidos por las dos metodologías, lo que se confirmó con el cálculo de los factores f_1 y f_2 que se ilustran en la Tabla 3-20. Estos resultados coinciden con lo reportado por Beneš et al., 2017, donde las características fisicoquímicas como tamaño de partícula, T_g , área de superficie y espectros de IR fueron

diferentes entre múltiples sistemas de DSAs obtenidos por HME y SD, pero el comportamiento de liberación a un pH constante fue similar (234). Esto puede deberse a que los cambios en las propiedades físicas no fueron significativos, como para provocar un cambio en el comportamiento del perfil de liberación del ácido desde el CPE, en estas condiciones.

Tabla 3-20 Factores de similitud y diferencia, para los perfiles de liberación en buffer pH 6,0 de los CPE producidos por HME y SD.

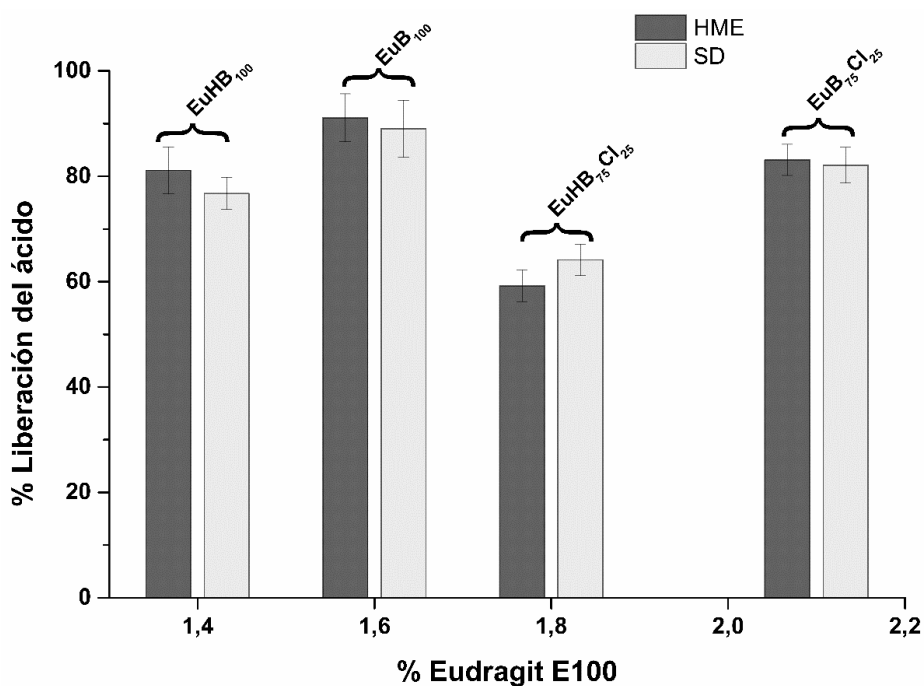
Factores	Extrusión por fusión Vs Secado por aspersión				
	EuB ₁₀₀	EuB ₇₅ Cl ₂₅	EuHB ₁₀₀	EuHB ₇₅ Cl ₂₅	EuAs ₇₅ Cl ₂₅
Diferencia (f_1)	3	4	9	5	10
Similitud (f_2)	82	79	62	71	70
Similares	Si	Si	Si	Si	Si

Al realizar la comparación de los perfiles de liberación entre los que incluyen y no incluyen el ion cloruro, para los CPEs producidos por la misma metodología y que contienen el mismo activo (exceptuando el EuAs₇₅Cl₂₅ que no tenía comparador), se observa que no son similares (Tabla 3-21). Estos resultados demuestran que, a este valor de pH la concentración del PE tendría influencia en la liberación del activo. Para complementar esta explicación, en la Figura 3-40, se grafica el porcentaje de Eudragit E100 que contiene cada CPE frente al porcentaje liberado del ácido correspondiente a las ocho horas, para las dos metodologías de obtención empleadas. Se observa una relación inversamente proporcional, es decir a menor concentración del PE mayor porcentaje de liberación para un mismo activo, dado por la cantidad de grupos ionizables disponibles del PE que retienen al ácido y evitan que se liberen de manera importante.

Tabla 3-21 Factores de similitud y diferencia, para los perfiles de liberación en buffer pH 6,0 de los CPEs producidos por HME y SD, evaluando una misma metodología, pero cambiando la composición del CPE.

Factores	EuB ₁₀₀ Vs EuB ₇₅ Cl ₂₅	EuHB ₁₀₀ Vs EuHB ₇₅ Cl ₂₅
Extrusión por fusión		
Diferencia (f_1)	18	33
Similitud (f_2)	46	34
Similares	No	No
Secado por aspersión		
Diferencia (f_1)	12	23
Similitud (f_2)	49	45
Similares	No	No

Figura 3-40 Relación entre el porcentaje de Eudragit E100 para cada CPE y porcentaje máximo liberado de activo (t=8h) para los ensayos de liberación a pH 6,0.



Los resultados del modelamiento matemático asociado a la cinética de liberación se presentan en la Tabla 3-22. De manera similar al comportamiento mostrado en agua, se observa que los coeficientes de determinación para Higuchi y Korsmeyer-Peppas son los más altos. Para todos los sistemas las constantes de velocidad K_H y K_{K-P} aumentaron respecto a lo observado en agua, posiblemente debido al efecto del pH. Al aumentar el pH del medio, el grado de ionización del Eudragit E100 se hace menor al acercarse a su pKa (8,45)(150), lo que podría estar influyendo en la formación de menos pares iónicos entre el PE y el activo, quedando un mayor porcentaje libre y por consiguiente llevando a una mayor concentración de ácido liberado.

El valor de n obtenido a partir del modelo de Korsmeyer-Peppas, para todos los sistemas corresponde a una liberación no Fickiana y fue similar para ambos métodos de producción, corroborando que en estas condiciones de pH solo el porcentaje de polímero en el CPE afectaría el comportamiento de liberación.

Tabla 3-22 Parámetros y coeficientes de determinación de varios modelos cinéticos de liberación para la dispersión de complejos entre Eu y los ácidos AB, AS y AHB, a pH 6,0.

Complejos	Orden Cero		Orden Uno		Higuchi		Korsmeyer-Peppas		
	K_0 %*h ⁻¹	R ²	K_1 h ⁻¹	R ²	K_H %*h ^{-0.5}	R ²	n	K_{k-p} h ⁻ⁿ	R ²
HME									
EuB ₁₀₀	8,71	0,810	0,160	0,670	31,64	0,921	0,63	0,445	0,999
EuB ₇₅ Cl ₂₅	9,07	0,900	0,200	0,790	31,98	0,980	0,59	0,315	0,999
EuHB ₁₀₀	7,72	0,747	0,162	0,609	28,46	0,881	0,67	0,402	0,996
EuHB ₇₅ Cl ₂₅	7,43	0,858	0,193	0,762	26,53	0,948	0,63	0,267	0,997
EuAs ₇₅ Cl ₂₅	7,77	0,929	0,353	0,667	27,67	0,984	0,69	0,153	0,985
SD									
EuB ₁₀₀	8,52	0,830	0,160	0,699	30,79	0,939	0,55	0,429	0,998
EuB ₇₅ Cl ₂₅	8,53	0,890	0,170	0,795	30,22	0,966	0,54	0,347	0,995
EuHB ₁₀₀	7,36	0,830	0,160	0,724	26,53	0,937	0,56	0,368	0,992
EuHB ₇₅ Cl ₂₅	8,23	0,863	0,210	0,694	29,45	0,959	0,68	0,279	0,997
EuAs ₇₅ Cl ₂₅	7,24	0,896	0,380	0,692	25,48	0,962	0,71	0,135	0,970

▪ **Liberación a pH 6,9**

Los perfiles de liberación a estas condiciones de estudio se presentan en las Figuras 3-41, 3-42 y 3-43, evidenciando un aumento en el porcentaje de liberación para todos los ácidos a este pH, en comparación con los medios previamente estudiados, pero manteniéndose la modulación de la liberación para los CPEs y la liberación inmediata para los ácidos sin complejar. Al igual que lo ocurrido a pH 6,0, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los perfiles de liberación de un mismo CPE obtenido por diferentes metodologías, de acuerdo con los factores f_1 y f_2 presentados en la Tabla 3-23.

Figura 3-41 Perfiles de liberación de ácido benzoico en buffer pH 6,9, desde los CPEs obtenidos por HME y SD.

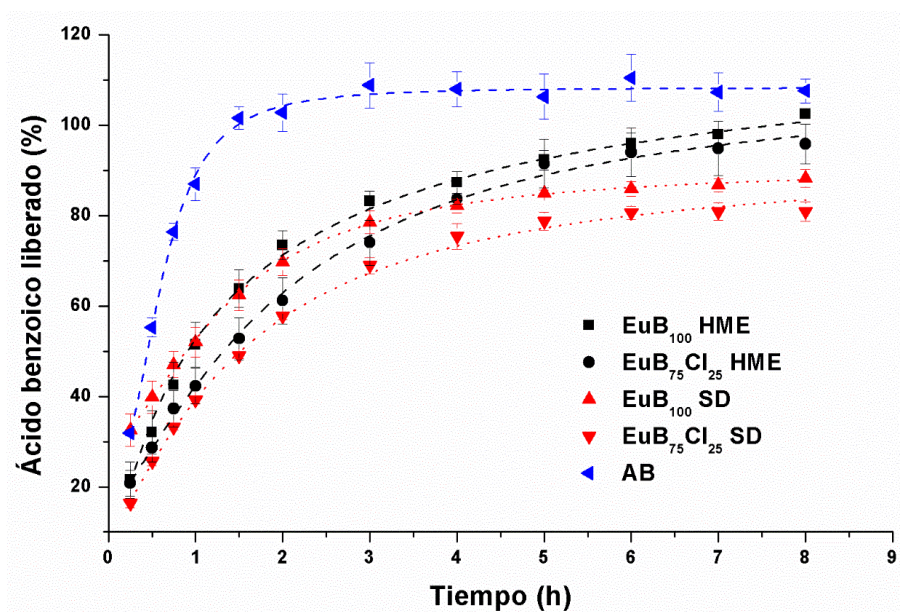


Figura 3-42 Perfiles de liberación de ácido 4-hidroxibenzoico en buffer pH 6,9, desde los CPEs obtenidos por HME y SD.

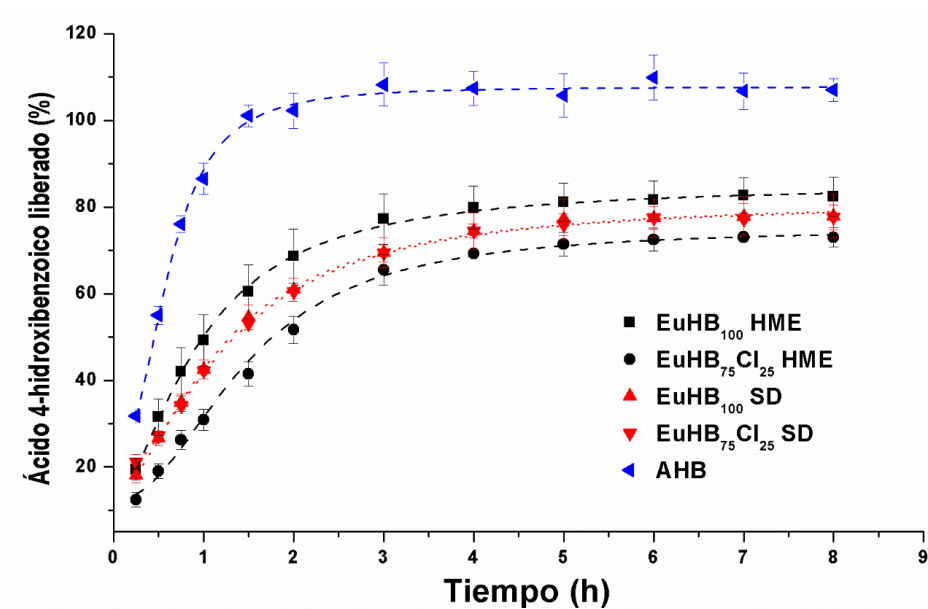


Figura 3-43 Perfiles de liberación de ácido salicílico en buffer pH 6,9, desde los CPEs obtenidos por HME y SD.

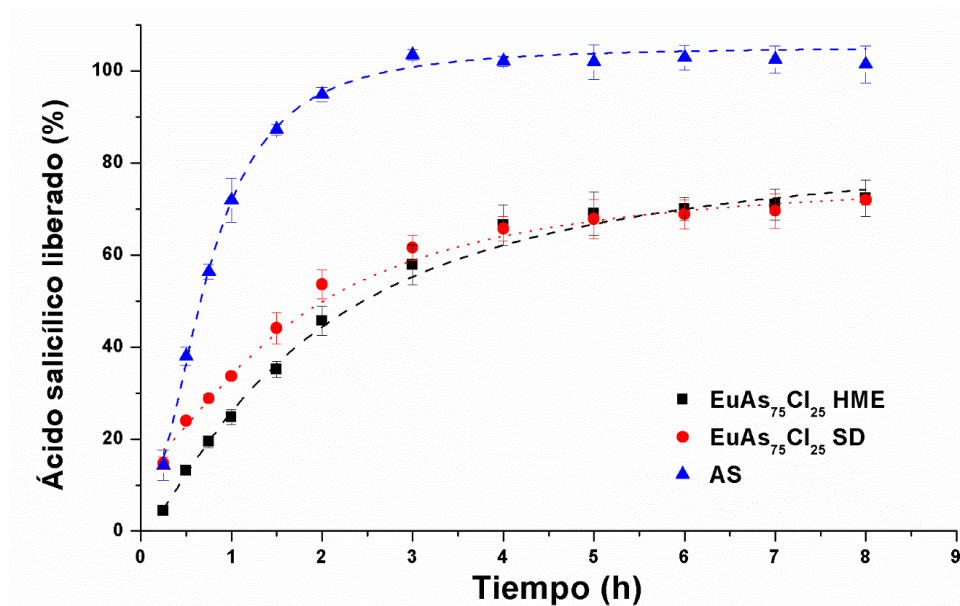


Tabla 3-23 Factores de similitud y diferencia, para los perfiles de liberación en buffer pH 6,9 de los CPE producidos por HME y SD.

Factores	Extrusión por fusión Vs Secado por aspersión				
	EuB ₁₀₀	EuB ₇₅ Cl ₂₅	EuHB ₁₀₀	EuHB ₇₅ Cl ₂₅	EuAs ₇₅ Cl ₂₅
Diferencia (f_1)	10	11	9	14	12
Similitud (f_2)	55	54	62	56	57
Similares	Si	Si	Si	Si	Si

En la Tabla 3-24 se presentan los resultados de la comparación estadística de los perfiles de liberación de los CPEs que contenían cloruros frente a los que no, producidos por una misma metodología. Se observa similitud entre la mayoría de ellos, con excepción de los complejos EuHB₁₀₀ y EuHB₇₅Cl₂₅ obtenidos por HME que mostraron diferencias. Esto se explica debido a la fácil penetración del solvente en las cadenas poliméricas de los sistemas obtenidos por HME, que facilitan la aparición de más grupos ionizables en el polímero que interactúan con el AHB, el cual está más disociado a pH 6,9 y junto con la inclusión de HCl hace que este se libere menos, evidenciado la diferencia en los factores f_1 y f_2 .

Tabla 3-24 Factores de similitud y diferencia, para los perfiles de liberación en buffer pH 6,9 de los CPEs producidos por HME y SD, evaluando una misma metodología, pero cambiando la composición del CPE.

Factores	EuB ₁₀₀ Vs EuB ₇₅ Cl ₂₅	EuHB ₁₀₀ Vs EuHB ₇₅ Cl ₂₅
Extrusión por fusión		
Diferencia (f_1)	8	20

Similitud (f_2)	58	44
Similares	Si	No
Secado por aspersión		
Diferencia (f_1)	13	1
Similitud (f_2)	51	92
Similares	Si	Si

En la Tabla 3-25 se ilustran los parámetros y coeficientes de determinación de los modelos cinéticos estudiados. Los valores de R^2 demuestran que el modelo de Korsmeyer-Peppas es el de mejor ajuste, lo que estaría relacionado con la mayor liberación que se obtuvo en esta condición de pH, comparada con las anteriores, considerando que para este modelo se requieren datos por debajo del 60%.

Tabla 3-25 Parámetros y coeficientes de determinación de varios modelos cinéticos de liberación para la dispersión de complejos entre Eu y los ácidos AB, AS y AHB, a pH 6,9.

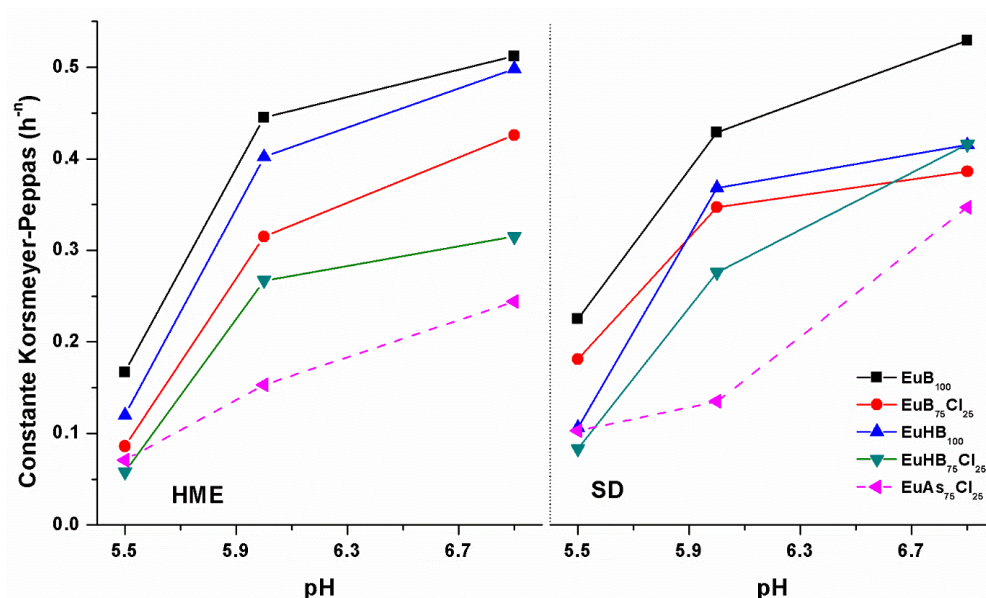
Complejos	Orden Cero		Orden Uno		Higuchi		Korsmeyer-Peppas		
	K_0 %*h ⁻¹	R^2	K_1 h ⁻¹	R^2	K_H %*h ^{-0.5}	R^2	n	K_{k-p} h ⁻ⁿ	R^2
HME									
EuB₁₀₀	9,279	0,822	0,153	0,677	33,563	0,933	0,64	0,512	0,999
EuB₇₅Cl₂₅	9,651	0,876	0,168	0,760	34,381	0,965	0,53	0,426	0,999
EuHB₁₀₀	6,923	0,702	0,131	0,578	25,823	0,847	0,66	0,498	0,999
EuHB₇₅Cl₂₅	7,679	0,793	0,185	0,672	28,024	0,911	0,70	0,315	0,999
EuAs₇₅Cl₂₅	8,535	0,829	0,253	0,613	30,796	0,936	0,82	0,244	0,995
SD									
EuB₁₀₀	6,848	0,771	0,114	0,661	25,112	0,901	0,46	0,529	0,999
EuB₇₅Cl₂₅	7,941	0,811	0,163	0,682	28,818	0,927	0,59	0,386	0,999
EuHB₁₀₀	4,048	0,752	0,144	0,632	25,970	0,885	0,59	0,415	0,997
EuHB₇₅Cl₂₅	6,925	0,767	0,139	0,668	25,400	0,896	0,55	0,538	0,997
EuAs₇₅Cl₂₅	6,749	0,796	0,157	0,671	24,570	0,916	0,61	0,347	0,998

Con respecto al mecanismo de liberación de los ácidos desde los CPEs, los valores del exponente n del modelo de Korsmeyer-Peppas estuvieron en el rango de 0,46 a 0,82 (ver Tabla 3-25) indicando una difusión no Fickiana o difusión anómala (284). A este pH (6,9), el mecanismo de liberación está regido por la expansión de las cadenas del Eu, permitiendo las interacciones con iones diferentes al ácido, neutralizando parte de las cargas del polímero y “desplazando al activo (AS, AB y AHB) del CPE, la evidencia de lo anterior es la disminución del $F-\zeta$ de los CPEs a pH 7,0 (Figuras 3-26 a 3-30).

Al comparar de manera conjunta las constantes de velocidad de liberación determinadas para los CPEs en los diferentes medios y para los dos métodos de obtención, de acuerdo

con el modelo de Korsmeyer-Peppas (Figura 3-44), se observa la influencia del pH sobre la constante de velocidad. A estos valores de pH se promueve en la mayoría de los CPEs estudiados, mecanismos de liberación anómalos o “no Fickianos” que reflejan un control de la liberación dado por la disociación del par iónico PE-activo seguido del movimiento de este activo en el medio, que corresponde a un mecanismo de difusión Fickiano (118).

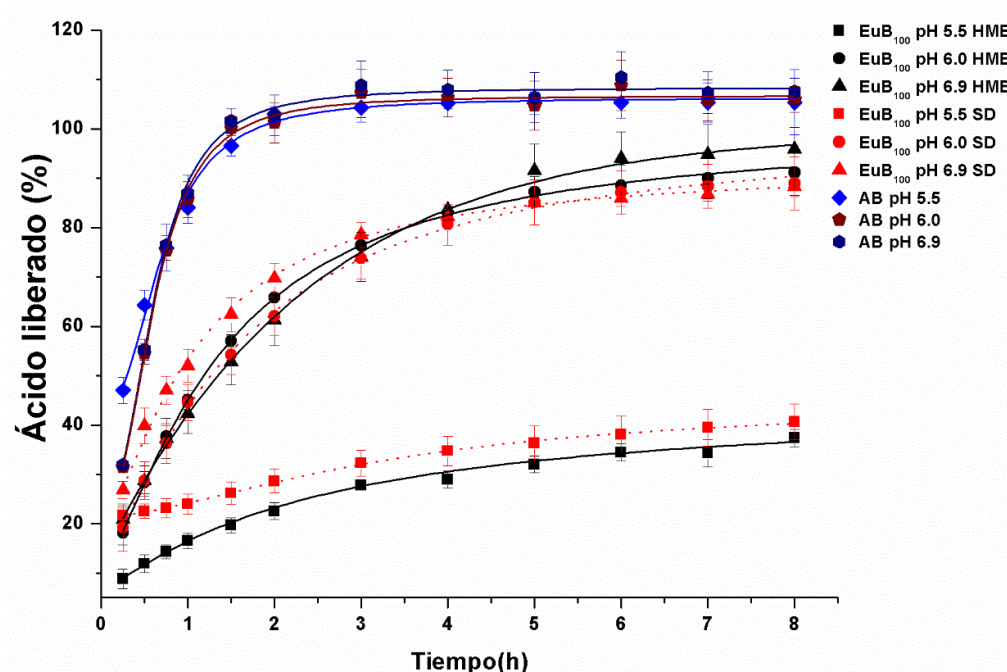
Figura 3-44 Constantes de velocidad para el modelo de Korsmeyer-Peppas en los diferentes medios usados, para los CPEs obtenidos por HME y SD.



El aumento de liberación que sucede tanto a pH 6,0 como a pH 6,9, lleva a pensar que además del impacto que tendría la modificación del pH sobre este comportamiento, como ya se ha explicado, podría atribuirse al favorecimiento del intercambio iónico dado por la presencia de los iones fosfato del medio y los contraiones benzoato, p-hidroxibenzoato y salicilato, como se ha reportado para otros estudios similares (21,46,150).

En la Figura 3-45, se hace una comparación para el CPE EuB₁₀₀ en los diferentes medios empleados y por metodología de obtención. Se demuestra claramente la influencia del pH del medio sobre la liberación de AB a partir de los CPEs, en contraste con el AB sin complejar, que no se vio afectado por la variación en el pH, evidenciando la incidencia que tiene la composición del CPE en el resultado alcanzado.

Figura 3-45 Perfiles de liberación del ácido benzoico sin complejar y complejado desde el CPE EuB₁₀₀, obtenido por SD y HME. Medios evaluados: agua (pH 5,5), buffer fosfato 6,0 y 6,9.



Es de resaltar que aunque la liberación aumenta a medida que se incrementa el pH, el control de la liberación de AB a partir de los CPEs se mantiene, en contraste con la rápida liberación que muestra el ácido benzoico sin complejar, lo que ha sido demostrado para otros sistemas de CPEs (284,285). Por otra parte, para todos los CPEs el efecto del método de obtención sobre la liberación es notorio a los pHs ensayados, aplicando también para los CPEs que contienen AS y AHB.

3.6 Conclusiones

- La técnica de XRPD evidenció el carácter amorfo de los CPEs obtenidos por secado por aspersión y extrusión por fusión, y a su vez la definición de estos sistemas como dispersiones sólidas amorfas en donde el activo está disperso homogéneamente a nivel molecular en el polímero.
- El ensayo de DSC, reveló que la inclusión del ion cloruro genera un aumento de la Tg de los CPEs debido a una mayor interacción con el PE. De manera similar, cuando se emplea la metodología de obtención por SD se generan estos aumentos en la Tg, pero en este caso por la diferencia en conducción de calor dada por las características físicas de los materiales resultantes.
- La técnica de XPS evidenció interacciones entre los oxígenos del polímero y los carbonos carboxílicos de los ácidos, además de las interacciones iónicas, siendo estas de mayor intensidad para los CPEs obtenidos por secado por aspersión en comparación con los de extrusión por fusión. La interacción iónica se observa entre la amina terciaria protonada del Eudragit E100 y el contraión correspondiente a los ácidos ionizados, lo que se confirma con el desplazamiento químico del nitrógeno, que se ve afectado por el cambio del entorno químico debido a la presencia de HCl, el tipo de ácido orgánico y la metodología de obtención.
- La SEM permitió establecer que los CPEs obtenidos por secado por aspersión, presentan una morfología correspondiente a partículas esféricas y quebradizas, que mejoran en este último aspecto en la medida que aumenta la solubilidad del ácido orgánico en el Eudragit E100 y se incluye al HCl en el CPE. No se evidenció separación de fases para los CPEs obtenidos por extrusión por fusión.
- La distribución de tamaño de partícula para los CPEs obtenidos por secado por aspersión decreció a medida que se disminuyó la velocidad de alimentación del sistema de secado. También se evidenció una disminución en los tamaños de partícula con relación al ácido orgánico empleado, AB > AHB > AS, y con la inclusión de HCl al sistema.
- Los estudios de solubilidad cualitativa demostraron la solubilidad en agua de 10 de los 12 complejos obtenidos, solo el EuAS₁₀₀ fue difícilmente dispersable. De igual

manera, se demostró la solubilidad de los 10 complejos en buffer hasta pH 7,6 y en agua hasta pH 7,2 a una concentración de 0,6%. La cantidad de ácido solubilizado aumentó a medida que el pKa de los ácidos orgánicos empleados era mayor. La metodología de secado por aspersión produjo una mayor solubilización de cada uno de los ácidos en comparación con HME, debido a la naturaleza física del material obtenido.

- Los valores de $F-\zeta$ de las dispersiones de los CPEs presentaron valores positivos debido al carácter catiónico del Eu. A una concentración de 0,06% de ácido en los CPEs obtenidos por secado por aspersión, se evidenciaron mayores valores de $F-\zeta$ en comparación con los obtenidos por extrusión por fusión, debido a la mayor protonación que proporciona el método (confirmado por XPS). A una concentración fija de ácido en los CPEs, el $F-\zeta$ disminuye a medida que aumenta el pH, con la presencia de aglomeraciones cuando el pH es superior a 8.
- El comportamiento de liberación de los CPEs en agua fue controlado, sin superar el 45% de la liberación del activo a las ocho horas de duración del ensayo. La menor velocidad de liberación se dio para el complejo $\text{EuAs}_{75}\text{Cl}_{25}$, lo cual está relacionado probablemente con su bajo pKa. La inclusión del ion cloruro en los CPEs, independiente de la metodología de obtención, disminuye la velocidad de liberación del activo debido a la mayor protonación de los grupos del Eu, teniendo mayores puntos de interacción con los ácidos. De los diez CPEs solo dos tuvieron similitud en los perfiles de liberación, evidenciando la influencia de la metodología de obtención en el comportamiento de liberación.
- La velocidad de liberación de los activos a pH 6,0 y 6,9, demostró que la cantidad de polímero en el CPE rige el comportamiento de liberación y es independiente de la metodología de obtención. Los CPEs con menor cantidad del PE, generan menor concentración de pares iónicos y por consiguiente hay más activo libre, lo que promueve una mayor velocidad de liberación.
- De acuerdo con el modelamiento de Korsmeyer-Peppas, el mecanismo que gobierna la liberación de los activos desde los CPEs, es del tipo anómalo o “no Fickiano”, que involucra la disociación del par iónico PE-activo, que controla el

proceso, seguido de la difusión del activo libre. Esta disociación está influenciada por el aumento de pH, lo que genera una mayor velocidad de liberación independiente de la metodología de obtención y del ácido orgánico empleado como activo.

4. Actividad antimicrobiana

Los medicamentos, cosméticos y alimentos, en su mayoría, son productos susceptibles a la contaminación microbiana, especialmente si contienen un alto contenido de agua, asociado con la presencia de compuestos orgánicos e inorgánicos que sirven de nutrientes para el crecimiento microbiano (286,287). La biocarga del producto se relaciona con las materias primas empleadas, los procesos de fabricación, el personal, las condiciones de almacenamiento, entre otras (288). El control del crecimiento microbiano en los productos mencionados, que dependerá de si el producto es estéril o no, sigue algunos principios de conservación que se aplican a nivel mundial (289):

1. Asepsia (mantiene los microorganismos fuera de la corriente del proceso), adherencia a las buenas prácticas de manufactura (BPM) vigentes, validación microbiológica de procesos de limpieza y programas de desinfección.
2. Eliminación de microorganismos, lavado, filtración, clarificación, sedimentación y centrifugación (290).
3. Retraso del crecimiento o eliminación de microorganismos a altas temperaturas (esterilización por calor, pasteurización), bajas temperaturas (refrigeración, congelación), secado (actividad de agua baja), pH alto / bajo, eliminación de sustratos que sirven de nutrientes, atmósfera anaeróbica (CO₂, empaque de gas N₂), conservantes o preservantes / biocidas, irradiación, rotura mecánica (molienda, alta presión).

De los principios anteriormente mencionados, el retraso del crecimiento o la eliminación de los microorganismos es relevante en la presente investigación, mediante el empleo de sistemas preservantes que actúen frente al crecimiento de hongos, bacterias y levaduras. En este capítulo se presenta la evaluación antibacteriana y antimicótica de los CPEs, obtenidos por HME y SD, para evaluar su potencialidad de ser futuramente empleados como sistemas preservantes.

La evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de un compuesto puro o de un sistema preservante, incluye los métodos de difusión en disco, dilución en caldo o agar, prueba de tiempo muerto, bioluminiscencia de ATP y los de citometría de flujo. Este última, proporciona información sobre la naturaleza del efecto inhibitor (bactericida o

bacteriostático, dependiente del tiempo o dependiente de la concentración) y del daño celular infligido al microorganismo de prueba (291).

Para algunos de los métodos mencionados, existen protocolos para la evaluación del efecto antimicrobiano en el ámbito clínico, como los establecidos por el “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) donde especifican los métodos de referencia para la evaluación de la sensibilidad de bacterias, hongos y levaduras. Aun cuando, los protocolos de la CLSI para la evaluación del efecto antimicrobiano están hechos para la práctica clínica, han sido empleados en otros campos como el fitoterapéutico, ingeniería de materiales e incluso para sistemas de CPEs (16,20,252,292–296). En la Tabla 4-1 se mencionan los medios de cultivo, el tamaño del inóculo microbiano y las condiciones de incubación para los métodos de prueba de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos recomendados por CLSI.

Tabla 4-1 Métodos recomendados por la CLSI para evaluación de susceptibilidad de bacterias, hongos y levaduras frente a agentes antimicrobianos (291).

Método	Microorganismo	Medio de crecimiento	Tamaño final del inóculo	Temperatura de incubación (°C)	Tiempo de incubación (h)	Referencia
Difusión por disco.	Bacteria	MHA	(0,5 McFarland (1-2) x 10 ⁸ UFC/ml	35 ± 2	16-18	M02-A
	Levadura	MHA+GMB	(0,5 McFarland (1-5) x 10 ⁶ UFC/ml	35 ± 2	20-24	M44-A
	Mohos	MHB	(0,4-5) x 10 ⁶ UFC/ml	-	-	M51-A
Microdilución en caldo.	Bacteria	MHB	5x10 ⁵ UFC/ml	35 ± 2	20	M07-A
	Levadura	RPMI 1640	(0,5-2.5)x10 ⁴ UFC/ml	35	24-48	M27-A
	Mohos	RPMI 1640	(0,4-5)x10 ⁴ UFC/ml	35	48	M38-A
Macrodilución en caldo.	Bacteria	MHB	5x10 ⁵ UFC/ml	35 ± 2	20	M07-A
	Levadura	RPMI 1640	(0,5-2.5)x10 ³ UFC/ml	35	46-50	M27-A
	Mohos	RPMI 1640	(0,4-5)x10 ⁴ UFC/ml	35	48	M38-A
Dilución en agar.	Bacteria	MHA	10 ⁴ UFC/mancha	35 ± 2	16-20	M07-A
Prueba de tiempo muerto.	Bacteria	MHB	5x10 ⁵ UFC/ml	35 ± 2	0,4,18, y 24	M26-A

MHA: Mueller Hinton Agar; MHB: Mueller Hinton Caldo.

GMB: Medio suplementado con 2% de glucosa y 0.5mg/ml de azul de metileno.

RPMI: Medio del Roswell Park Memorial Institute.

4.1 Métodos para la evaluación de la actividad antimicrobiana

Como se ilustró en la Tabla 4-1 existen diferentes metodologías para la evaluación de la susceptibilidad de un microorganismo a un determinado agente a continuación, se explican brevemente:

4.1.1 Método de difusión por disco

En este método se realiza la inoculación y siembra de bacterias, hongos o levaduras sobre la superficie del agar correspondiente que está en una caja de Petri. Posteriormente se impregnan discos de papel filtro con concentraciones conocidas del agente antimicrobiano, los discos son ubicados sobre la superficie del agar y se dejan reposar por alrededor de 30 minutos para evaporar el líquido. Finalmente se incuba la caja de forma invertida bajo las condiciones de temperatura y tiempo establecidas para cada microorganismo; la actividad del agente microbiano se mide en función de los halos de inhibición (297–299).

4.1.2 Métodos de dilución

Estos métodos se pueden clasificar en dos grandes grupos según el estado físico del medio de cultivo utilizado, dilución en agar y dilución en caldo; este último se puede subclasificar en microdilución y macrodilución.

- **Dilución en caldo**

Pueden emplearse métodos de dilución en caldo para medir cuantitativamente la actividad *in vitro* de un agente antimicrobiano frente a un microorganismo aislado dado (bacteria, hongo o levadura). Para realizar las pruebas se prepara una serie de tubos con un caldo (macrodilución), al que se añaden diversas concentraciones del agente antimicrobiano. A continuación, los tubos se inoculan con una suspensión estandarizada del microorganismo de prueba; adicionalmente se evalúa un control negativo (sin agente microbiano) y un control positivo (con un compuesto de acción microbiana comprobada). Después de la incubación, se evalúa el crecimiento del microorganismo en cada uno de los tubos, empleado alguna técnica de punto final (colorimetría, turbidez, liberación de CO₂, determinación de ATP) y se determina la

CMI. El mismo procedimiento puede seguirse con cantidades inferiores de volumen de caldo (inferior a 300 μ L), en este caso estaríamos en microdilución, en la que se emplean placas multipozos. El resultado final está significativamente influenciado por la metodología, que debe controlarse cuidadosamente si se quieren lograr resultados reproducibles (intralaboratorio e interlaboratorio)(300–302).

- **Dilución en agar**

En este método el agente antimicrobiano se incorpora al medio de agar a una temperatura de 40-50°C, y se sirve en cajas Petri, alcanzando concentraciones diferentes. Seguido de lo anterior, se deja solidificar el agar y se aplica una cantidad del inóculo sobre la superficie del agar a cada caja Petri, procediendo a la incubación del sistema incluyendo los controles positivos y negativos correspondientes. Para este método, la CMI se define como la menor concentración capaz de inhibir al microorganismo y por lo tanto no hay crecimiento visible al compararlo con los controles (300).

De los métodos descritos anteriormente, en este estudio se empleó el de la microdilución en caldo teniendo en cuenta los resultados encontrados por Dallos 2019 (21). Aplicando esta metodología se determinó la CMI, la concentración mínima bactericida (CMB) y la concentración mínima fungicida (CMF). En los estudios previos del grupo de investigación, se había demostrado para los métodos de dilución en agar y difusión por disco, que se presentaba una interacción de los CPEs con el agar de cultivo empleado, problemas en el ajuste de pH para el agar, y dificultad en la lectura de los halos en los discos.

La evaluación de la actividad antimicrobiana de los CPEs se realizó frente a *Candida albicans*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Se eligieron estos microorganismos porque son los que referencia la USP para las pruebas de eficacia antimicrobiana (303). Se seleccionaron los valores de pH 6,0 y 6,9 debido a que los ácidos estudiados en esta investigación tienen poca o nula actividad antimicrobiana en estas condiciones. A continuación, se describen las características principales de los microorganismos empleados:

Candida albicans

Clasificación taxonómica (304)

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>albicans</i>

Características morfológicas

Candida albicans es un hongo patógeno oportunista que existe como comensal inofensivo en los tractos gastrointestinal y genitourinario en alrededor del 70% de los humanos y alrededor del 75% de las mujeres sufren de infección por *C. albicans* al menos una vez en su vida. Sin embargo, se convierte en patógeno oportunista para pacientes inmunodeprimidos, para algunos individuos inmunológicamente débiles o incluso para personas sanas. La infección causada por *C. albicans* se conoce comúnmente como candidiasis (305).

C. albicans se encuentra más comúnmente en forma de levadura o filamentosa. Las levaduras son células de forma ovalada de gemación única, típicamente de varios micrones de diámetro. Por el contrario, los filamentos son células alargadas unidas de un extremo a otro. Los filamentos hifales tienen típicamente alrededor de 2,0 μm de diámetro, tienen paredes de lados paralelos y carecen de constricciones en las uniones septales. Los filamentos pseudohifas, por otro lado, suelen ser algo más anchos en diámetro ($\geq 2,8 \mu\text{m}$), carecen de lados paralelos y tienen constricciones en las uniones septales, así como en el cuello de la yema madre (306). Aunque *C. albicans* se ha descrito durante años como la principal especie de infecciones fúngicas invasivas, también se reconocen a la *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* y otras *Candida spp.* Las tasas de mortalidad en pacientes críticamente enfermos con infecciones invasivas por *C. albicans* son altas, oscilando entre el 40% y 70%, dependiendo de la gravedad de la infección. Incluso entre los pacientes que reciben tratamiento antifúngico, la tasa de mortalidad puede alcanzar el 67% (307).

Escherichia coli

Clasificación taxonómica (308)

Dominio:	<i>Bacteria</i>
Reino:	<i>Eubacteria</i>
Filo:	<i>Proteobacteria</i>
Clase:	<i>Gammaproteobacteria</i>
Orden:	<i>Enterobacteriales</i>
Familia	<i>Enterobacteriaceae</i>
Género	<i>Escherichia</i>
Especie:	<i>Escherichia coli</i>

Características morfológicas

Escherichia coli son bacterias gramnegativas, en forma de bastoncillo (2,0 a 6,0 µm de longitud y 1,1 a 1,5 µm de ancho bacilos) con extremos redondeados. Sin embargo, la forma real de estas bacterias varía desde células esféricas (cocos) hasta bastones alargados o filamentosos. La *Escherichia coli* no forma esporas y suele ser móvil mediante la acción de los flagelos peritricos. La *Escherichia coli* es facultativamente anaeróbica y, produce gas a partir de la fermentación de carbohidratos, como la lactosa que es fermentada en un rango 37 a 44°C de temperatura (309). *Escherichia coli* se asocia con una variedad de infecciones humanas, cuando se disemina en los intestinos causa diarreas, y es la causa más común de infecciones urinarias agudas y sepsis del tracto urinario (309,310). Aunque desde la implementación de las buenas prácticas de manufactura para productos farmacéuticos y cosméticos, la contaminación microbiana ha desaparecido, algunos estudios al respecto muestran hallazgos sobre estos y en especial de *Escherichia coli* (311,312).

Staphylococcus aureus

Clasificación taxonómica

Dominio:	<i>Bacteria</i>
Filo:	<i>Firmicutes</i>
Clase:	<i>Bacilli</i>
Orden:	<i>Lactobacillales</i>
Familia	<i>Staphylococcaceae</i>
Género	<i>Staphylococcus</i>
Especie:	<i>Staphylococcus aureus</i>

Características morfológicas

Los estafilococos fueron aislados por primera vez del pus humano en 1880 por el cirujano escocés Alexander Ogston: el nombre deriva de estafilo (racimo de uvas) y kokkos (baya)

porque las bacterias se parecían a racimos de uvas cuando se miraban microscópicamente. En 1886, Anton J. Rosenbach, un cirujano alemán, aisló el *S. aureus*, llamado así por el color de las colonias pigmentadas (*aureus* significa color dorado en latín) (313). El *S.aureus* es un coco grampositivo, anaerobio facultativo. *Staphylococcus aureus* es un patógeno humano oportunista líder, reconocido por su capacidad para evadir el sistema inmunológico y causar una variedad de infecciones diferentes. Las infecciones por *S.aureus* pueden variar desde lesiones cutáneas superficiales, pasando por abscesos profundos hasta sepsis potencialmente mortal. La diversidad de modalidades de enfermedad ha dificultado la comprensión de los principios subyacentes de la infección y se presenta principalmente en las fosas nasales, de donde puede sembrar la infección (314).

4.1.3 Estudios complementarios para la evaluación de los cambios en la morfología y potencial ζ en la superficie de las bacterias

Adicional a la evaluación de la capacidad de un sistema para inhibir el crecimiento o eliminar microorganismos (bacterias o levaduras), es importante el entendimiento del mecanismo o los posibles mecanismos involucrados. La práctica más común en este sentido son los estudios convencionales en los que se estudia la respuesta del microorganismo a los sistemas antimicrobianos en cultivos a granel, aportando información para el uso adecuado de ellos, profundizando en cómo los microorganismos se vuelven resistentes. Por otro lado, desde el enfoque de la biología física, se hacen análisis de las células individuales, lo que permite una comprensión de cómo ocurre la muerte celular después de la interacción principal: antimicrobiano-objetivo (315).

Los estudios con las células microbianas se realizan mediante un análisis individual orientado a examinar los cambios; de este grupo de células son preferidas las bacterias, por desarrollar más fácilmente resistencia a los antibióticos (316). Entre los cambios superficiales estudiados, se destacan la topografía y la carga eléctrica de la membrana bacteriana después de haber estado en contacto con un sistema antibacteriano. Para el caso de la topografía de la membrana celular, se emplea la técnica de microscopía de fuerza atómica (AFM por sus siglas en inglés). Las imágenes de alta resolución a partir de muestras biológicas, proporcionan información significativa sobre propiedades estructurales, dimensionales y funcionales con un detalle superior a las obtenidas por microscopía electrónica (317–319).

La técnica de AFM permite el examen de muestras en diversos entornos sin pretratamiento, como fijación química, deshidratación, sequedad y/o recubrimientos metálicos, que pueden provocar cambios en las propiedades de la superficie. Puede emplearse tanto para obtener imágenes de la topografía de la superficie a alta resolución, como para medir localmente los datos tridimensionales verdaderos, la fuerza de adhesión y las propiedades mecánicas a nivel molecular (320). Adicionalmente, permite la medición precisa de la rugosidad de la superficie (321).

Por otra parte, la evaluación de la carga superficial de las membranas bacterianas se hace indirectamente mediante la evaluación del potencial ζ y está determinado por la carga eléctrica neta de las moléculas expuestas en la superficie de las membranas (322). Esta característica física es fundamental para mantener una función celular óptima, y en general su comportamiento dependerá de la bacteria y del compuesto estudiado. Se ha establecido una relación del potencial ζ y la viabilidad bacteriana, convirtiéndose en una herramienta muy útil para desentrañar el efecto antimicrobiano de un sistema probado directamente sobre bacterias (323).

En esta investigación, se evaluó el cambio morfológico, la rugosidad y el potencial ζ en función del tiempo de la *E.coli* frente al CPE de mejor actuación en la inhibición del crecimiento bacteriano. La elección de la *E.coli*, obedece a su alto porcentaje de resistencia frente a los antibióticos (316).

4.2 Metodología

La metodología estuvo dividida en cuatro partes: ensayos de actividad antibacteriana, ensayos de actividad antimicótica, evaluación de los cambios en la morfología y de la carga superficial de la *E.coli*.

4.2.1 Materiales

Ácido benzoico (99% de pureza) Merck®, hidróxido de sodio Merck®, ácido clorhídrico, ácido salicílico (99% de pureza) Merck®, ácido 4-hidroxibenzoico (98% de pureza) Merck®, Solución de NaCl 0,9%, resazurina sódica Merck®, todos de calidad analítica. Los medios de cultivo utilizados fueron, agar tripticasa de soja (TSA por sus siglas en inglés) marca Scharlau®, caldo Müller Hinton (MHB por sus siglas en inglés) marca Merck®, agar papa dextrosa (PDA por sus siglas en inglés) marca Scharlau® y caldo Sabouraud dextrosa (SDB

por sus siglas en inglés) marca Difco™ preparados según las instrucciones de la etiqueta. Se utilizaron cepas derivadas ATCC® de *Escherichia coli* ATCC® 43890™, *Staphylococcus aureus* ATCC® BAA-1708™ y *Candida albicans* ATCC®10231 de la marca Microbiologics Inc®. Para las reconstituciones y preparaciones se empleó agua desionizada.

4.2.2 Evaluación antibacteriana

Se realizó la activación y la creación de un cepario para cada una de las bacterias (Anexo F). Las cepas bacterianas empleadas están clasificadas, según la descripción general dada por ATCC, en el nivel 1 de bioseguridad para el manejo de agentes infecciosos. Este nivel de bioseguridad, indica que los microorganismos están completamente caracterizados y no ocasionan enfermedad, representando un mínimo riesgo o ninguno, para el personal de laboratorio o para el medio ambiente. Es importante aclarar que las concentraciones utilizadas en los ensayos de actividad microbiológica se realizaron en función de la concentración del ácido correspondiente que hace parte del CPE. De los métodos explicados al inicio de este capítulo, se decidió emplear la dilución en caldo, debido a la formación de precipitado que se presentó entre el agar y los CPE (ensayos preliminares), lo que dificultaba las lecturas.

▪ Dilución en caldo

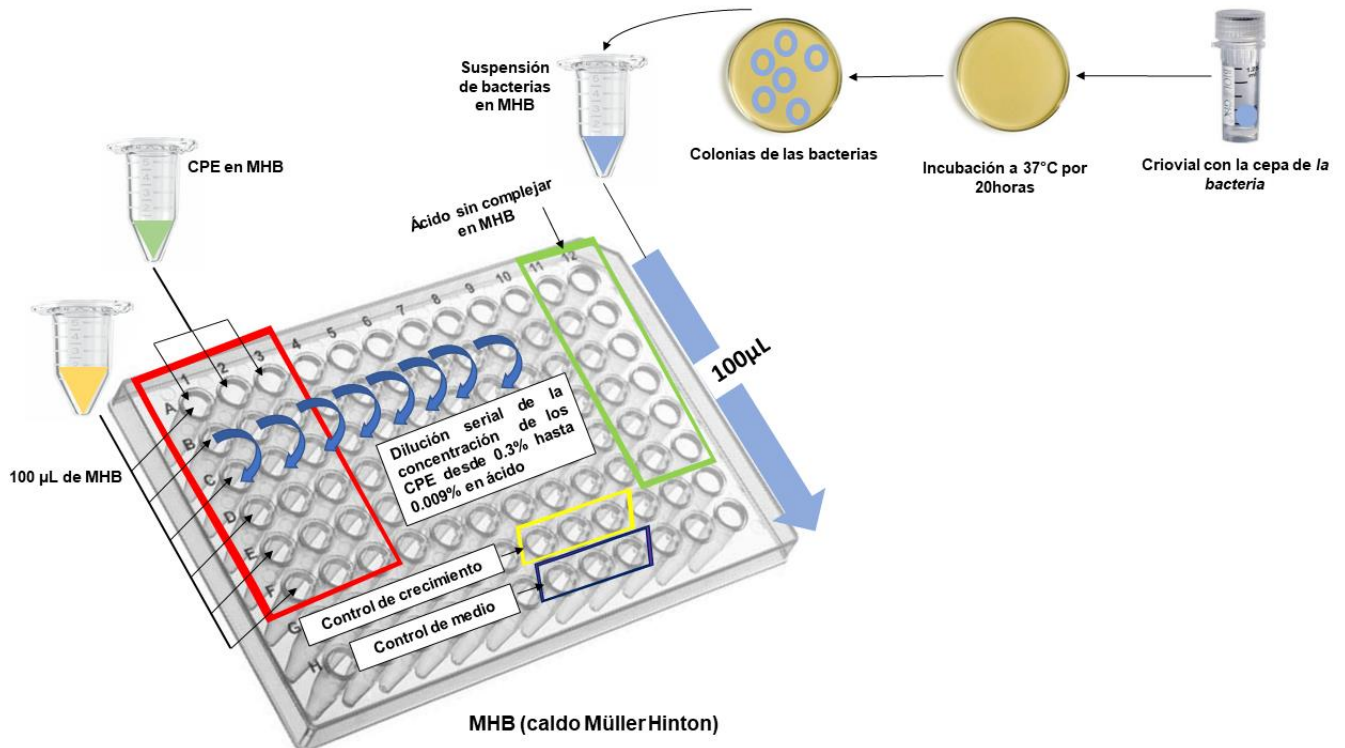
Los ensayos de actividad antibacteriana por la metodología de dilución se llevaron a cabo en dos fases. En la primera fase se buscaba evaluar la actividad antimicrobiana y determinar la CMI y la CMB para cada uno de los CPE a pH 6,0 y 6,9. En la segunda fase se evaluó la cantidad de células que quedaron viables después de estar en contacto con el CPE y el ionómero EuCl_{100} en un periodo de tiempo de 20 horas, a las mismas condiciones de pH.

- Fase 1.

El procedimiento realizado se describe de manera resumida en la Figura 4-1. En esta fase se realizó la evaluación de la actividad antimicrobiana siguiendo las pautas de la técnica normalizada de microdilución en caldo para bacterias (300). Se evaluaron las concentraciones de 0,300%; 0,150%; 0,075%; 0,038%; 0,019% y 0,009% en ácido para cada uno de los CPEs obtenidos por HME y SD (exceptuando al EuAs_{100} por su dificultad para dispersarse en agua), empleando placas multipozos. Los CPEs fueron dispersados en

MHB, el pH ajustado a 6,0 y 6,9 de manera independiente y esterilizados por calor húmedo mediante el empleo de autoclave (All American®, modelo 75X). Posteriormente, una suspensión de bacterias en caldo, de 5×10^5 UFC/ml, se agregó a las dispersiones de los CPEs preparadas previamente, manteniendo el pH indicado (Anexo F). Estas dispersiones de los CPEs con el inóculo de bacterias correspondiente se llevaron a las placas multipozos y se incubaron a $37^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 20 horas. Finalizado este tiempo, se realizó la lectura de la densidad óptica a 590 nm (lector de placas Biochrom Asys Expert Plus®) y se verificó visualmente con la adición de una solución de $700\mu\text{M}$ de resazurina (color azul violeta negativo y, rosa positivo para bacterias viables). Finalmente, se realizó un repique en placa sobre agar TSA para establecer la CMB de los CPEs en estudio.

Figura 4-1 Representación esquemática del procedimiento de microdilución en caldo para bacterias recomendado por CLSI, a pH ajustado a 6,0 o 6,9.



- **Fase 2.**

En esta etapa se realizó un conteo en placa para cuantificar el número de UFC viables, después de estar en contacto con un CPE a una determinada concentración. Aquí se empleó el método de vertimiento en placa por triplicado para cada uno de los sistemas evaluados y, se hizo uso del recuento medio de los resultados. Para las bacterias se preparó una dispersión en caldo BHM (1×10^8 UFC/ml), la cual se incubó por 24 horas a $37^\circ\text{C} \pm$

0,5°C con cada uno de los CPEs a diferentes concentraciones y a dos pHs. Una vez terminado el tiempo de incubación, una porción de la dispersión se agregó a una caja Petri vacía y, luego se vertió en ella agar TSA (temperatura no mayor de 50°C). La caja se dejó enfriar, y posteriormente se incubó a 37°C ± 0,5°C durante 20 horas, el conteo de las UFC se realizó después de este tiempo (UFC muestras). Simultáneamente, se preparó un inóculo con la misma concentración de UFC/ml de las preparaciones anteriores incubándose en idénticas condiciones, pero sin la presencia del CPE (UFC control). Hay que aclarar que para los sistemas donde hubo mucho crecimiento microbiano en las placas, se realizó las respectivas diluciones con agua peptonada ajustada al pH correspondiente. La reducción logarítmica de UFC se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Reducción logarítmica de UFC} = [\log_{10}(\text{UFC control}) - \log_{10}(\text{UFC muestra})] \quad (4-1)$$

En esta fase se evaluaron los diez CPEs frente a *E. coli* y *S. aureus* a una concentración de 0,3%; 0,015%; 0,075% y 0,038% equivalente en ácido, en caldo BHM ajustado a un pH de 6,0 y de 6,9. No se evaluó la concentración de 0,6% porque en ensayos previos no creció ninguna colonia y, por lo tanto, se descartó. Se incluyó el ionómero EuCl₁₀₀, con la finalidad de evaluar el polímero sin ningún ácido. En este sistema se neutralizó el 100% de los grupos del dietilamino con HCl y, se evaluó en las mismas concentraciones de los CPEs de EuB₁₀₀.

4.3 Evaluación antimicótica

Para los ensayos antimicóticos se aseguró el adecuado manejo de bioseguridad para las cepas que, de manera similar a lo explicado para los ensayos antibacterianos, están catalogadas según la descripción general dada por ATCC, en nivel de bioseguridad 1. Para los microorganismos utilizados se realizó su activación y su respectivo cepario (ver Anexo F), semejante a lo realizado para la evaluación frente a bacterias. Las concentraciones empleadas se calcularon en función del ácido correspondiente al CPE que lo contiene y se empleó el método de microdilución en caldo dividido en dos fases.

- Fase 1.

Para esta fase se siguió la técnica normalizada de microdilución en caldo para hongos y levaduras (301,302). El procedimiento, fue similar al utilizado en la fase 1 de evaluación antibacteriana, pero el caldo usado para las dispersiones de los CPEs fue el SDB. En el

caso de la levadura (*C.albicans*) se realizó la lectura de la placa a 600nm (lector de placas) después de la incubación por 24 horas a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. También se incluyó la adición solución de resazurina para visualizar mejor la inhibición que causan los CPEs. Durante el procedimiento se empleó Fungizol en un rango de concentraciones de 15 $\mu\text{g/ml}$ a 0,117 $\mu\text{g/ml}$, como control positivo de la actividad antimicótica.

Las dispersiones de los CPEs fueron esterilizadas por calor húmedo empleando una autoclave (All American®, modelo 75X). Finalmente, para establecer la CMF de los CPEs se realizó un repique sobre agar PDA de cada uno de los CPE evaluados.

- Fase 2.

Para esta etapa de manera similar a la fase 2 de la evaluación antibacteriana, se realizó un conteo de las células viables en el punto final por la técnica de conteo por placa. En esta fase se empleó el caldo SDB y para el recuento de las placas agar PDA. Este conteo se llevó a cabo después de la incubación ($37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24 horas).

Se evaluaron todos los CPEs (exceptuando al EuAs₁₀₀) frente a *C.albicans*, en las concentraciones de 0,300%; 0,015%; 0,075% y 0,038% equivalente en ácido en el caldo SDB, a un pH ajustado de 6,0 y de 6,9. De manera similar, se incluyó una dispersión de *C.albicans* sin CPEs (UFC control) y una dispersión con el ionómero EuCl₁₀₀. La reducción logarítmica de UFC se calculó con la Ecuación 4-1.

4.4 Evaluación de la influencia de la presencia de un CPE sobre la morfología y rugosidad de la *E.coli*

La evaluación de la superficie y la morfología de la bacteria *Escherichia coli*, expuesta al CPE con menor CMI, se realizó mediante AFM. Las condiciones para la obtención de las imágenes fueron las siguientes: un cultivo fresco de células de *E.coli* se incubó a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ junto con el CPE en la CMI correspondiente, en caldo MHB ajustado a pH 6,9 y se tomaron imágenes a los tiempos de contacto de 30, 45 y 60 minutos. Se tuvo en cuenta como control la dispersión de *E.coli* en las mismas condiciones mencionadas, pero sin la adición del CPE.

Para la consecución de la imagen, se aplicaron 100 μL de la dispersión de bacterias de cada tiempo ensayado sobre un portaobjetos de vidrio revestido con poli-L-lisina (MasterFlex®, referencia: 067-CP) se dejó reposar por 15 minutos a $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ en una cámara de flujo

laminar (estos 15 minutos fueron tenidos en cuenta al momento de la toma de la muestra). Después de la deposición, la muestra se lavó seis veces con agua Mili-Q con la finalidad de retirar el exceso de medio de cultivo, y después se secó en corriente de aire a $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Se obtuvieron células bacterianas individuales a alta resolución para cada tiempo de incubación evaluado. Este experimento se realizó con cultivos duplicados para el CPE probado. La morfología de la bacteria se examinó con un microscopio de fuerza atómica MFP-3D (Asylum Research, Oxford instruments, Reino Unido) en modo de contacto intermitente utilizando una sonda AC160TS (20 N/m a 300 kHz, Olympus Instruments, Japón).

Para el análisis de la rugosidad superficial, se tomaron los datos generados a partir de algunas de las imágenes de altura de AFM. Utilizando el software Gwyddion v2.59 (Instituto de Metrología Checa, Brno, República Checa), se estimó la forma de las células bacterianas mediante la aplicación de un filtro medio a los datos brutos. La sustracción de la imagen tratada de la original generó una representación aplanada de la superficie de la célula bacteriana (retroceso de deflexión). La rugosidad de la superficie en una dimensión fue calculada a partir de una línea recta (1nm) dentro de la imagen aplanada. De esta manera, se obtuvo la desviación promedio del perfil de rugosidad de todos los puntos, de una línea media a lo largo de la longitud de evaluación, lo cual se conoce como rugosidad promedio (R_a) (Ecuación 4-2).

$$R_a = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N |z_j - \bar{z}| \quad (4-2)$$

Donde, N es el número total de puntos en la longitud de evaluación, z_j es la altura del punto j y \bar{z} es la altura media (324,325). La lectura fue hecha por triplicado.

4.5 Evaluación de la influencia de la presencia de un CPE sobre del potencial ζ de las dispersiones de *E.coli*

Partiendo de un cultivo fresco preparado en caldo MHB, el cual fue incubado a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 360 minutos, se preparó una dispersión de bacterias de aproximadamente $1,1 \times 10^9$ UFC/ml, ($\text{OD}_{590}=0,4$). Las dispersiones de las bacterias se llevaron a tubos cónicos, las cuales fueron centrifugadas a 10000 rpm por 20 minutos (centrifuga, Thermo Scientific Heraeus Megafune 16 USA), y lavadas cinco veces con buffer fosfato de potasio 0,5mM (pH 6,9). La dispersión final de las bacterias se ajustó a una OD_{590} entre 0,12 - 0,15, y fueron

lavadas e incubadas a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ con el CPE de mejor desempeño, a la concentración mínima inhibitoria. Paralelamente se preparó una dispersión de las bacterias en las mismas condiciones mencionadas, la cual fue empleada como control. Las medidas de potencial ζ se realizaron a estas dispersiones, a 0, 30, 45 y 60 minutos siguiendo la metodología dada por Halder et al., 2015 (326), a un pH de 6,9 (buffer 0,5mM fosfato de potasio). El potencial ζ se midió con la ayuda de un dispositivo Zetasizer Nano ZS 90 Malvern equipado con láser de Helio-Neón (633 nm) como fuente de luz, con la detección en un ángulo de dispersión de 90 grados a temperatura (28°C). Las lecturas fueron realizadas por triplicado.

4.6 Análisis estadístico de la reducción logarítmica del crecimiento de las bacterias y la *C.albicans*

Para el manejo de los resultados se realizó inicialmente un análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de significancia de 0,05, que se traduce en una confianza del 95%. Posteriormente se aplicó el método de Tukey y el de mínima diferencia significativa (DMS), para evidenciar si existían o no estas diferencias entre tratamientos.

4.7 Presentación y discusión de los resultados

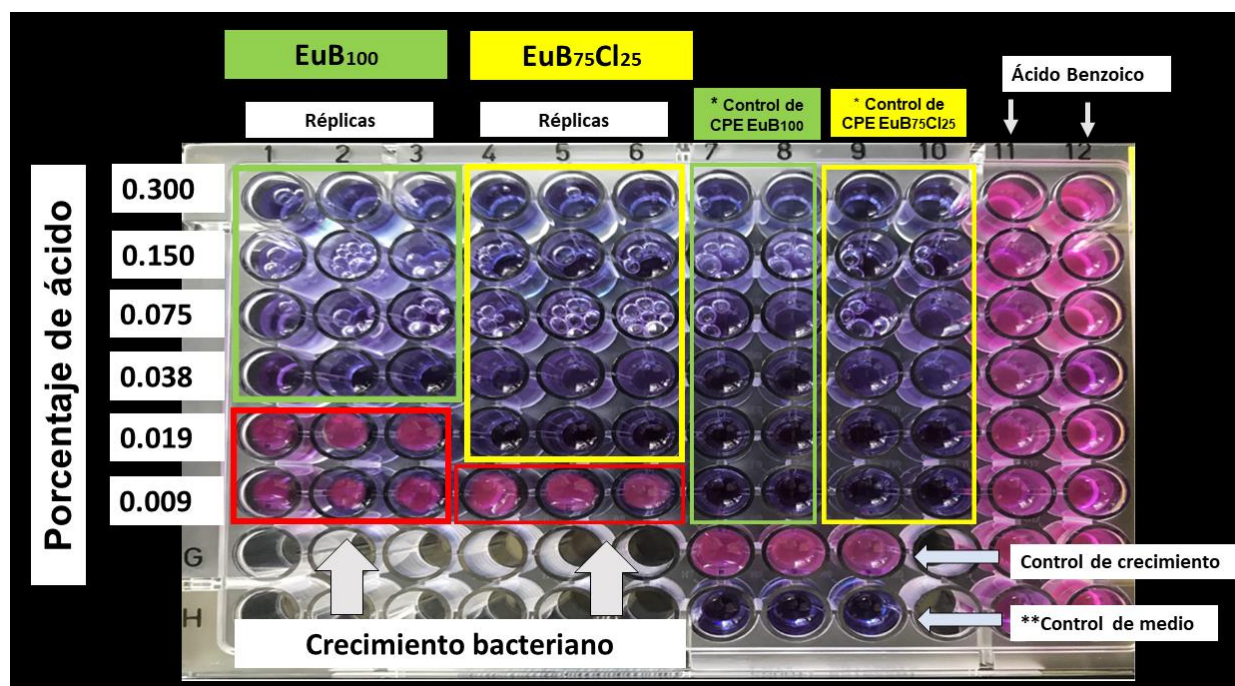
4.7.1 Evaluación antibacteriana

Como se indicó en la metodología, la evaluación antibacteriana se realizó en dos fases:

- **Fase 1.**

En la Figura 4-2 se puede observar, a manera de ejemplo, la evaluación de los CPEs EuB₁₀₀ y EuB₇₅Cl₂₅ obtenidos por HME, a pH 6,9 frente a *E. coli* después de la adición de 10uL de solución de resazurina e incubación por 2 horas a 37°C ± 0,5°C.

Figura 4-2 Resultados de la metodología de dilución en caldo MHB a pH 6,9, para la determinación de la CMI de EuB₁₀₀ y EuB₇₅Cl₂₅ obtenidos por HME frente a *Escherichia coli*.



**Control de medio: caldo MHB ajustado a pH 6,9

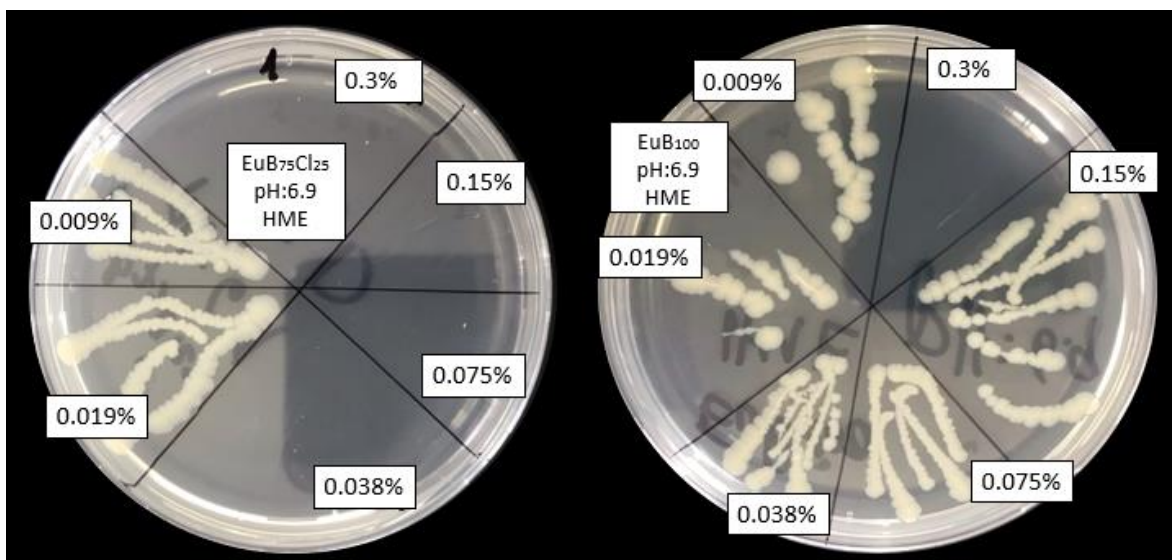
*Control de CPE EuB₁₀₀ y EuB₇₅Cl₂₅: dispersión de los CPE sin inóculo de *E. coli*

En la Figura 4-2 se evidencian los resultados satisfactorios para los controles de crecimiento (color rosado); los controles negativos: correspondientes al medio de cultivo y a las dispersiones de cada CPE en el medio de cultivo, ambas sin ningún inóculo (color violeta); y para el ácido benzoico que no presenta ninguna actividad a este pH (color violeta). Aunque el tono del color es muy leve en las últimas concentraciones, con la lectura de densidad óptica (ver Anexo G), previa a la adición de resazurina, se pudo constatar la CMI para cada sistema. Esta concentración se estableció en el cambio de coloración a una concentración

posterior a la de 0,038% para el EuB₁₀₀ y de 0,019% para EuB₇₅Cl₂₅. Este valor de concentración en donde no hubo crecimiento (color violeta), previo al cambio de color (color rosado) es el dato que se tomó como CMI.

En la Figura 4-3, también a manera de ejemplo, se ilustra el crecimiento en placa de cada una de las concentraciones de los CPEs EuB₁₀₀ y EuB₇₅Cl₂₅ obtenidos por HME, a pH 6,9 frente a *E.coli*, después del período de incubación correspondiente. Estos resultados confirman el mayor efecto bactericida del CPE EuB₇₅Cl₂₅ en comparación con el EuB₁₀₀, como se evidenciaba en los resultados de la Figura 4-2.

Figura 4-3 Resultados de repique en agar TSA incubados a 37°C ± 0,5°C por 20 horas para determinar la CMB de los CPEs EuB₁₀₀ y EuB₇₅Cl₂₅, frente a *Escherichia coli* utilizando caldo MHB ajustado a pH 6,9.



Los resultados de la CMI y de la CMB de todos los complejos a pH 6,0 y a pH 6,9 frente a *E.coli* y *S.aureus* se presentan en las Tablas 4-2 y 4-3. Estos resultados muestran que en ambas condiciones de pH y frente a las cepas empleadas, los CPEs obtenidos por las dos metodologías mantuvieron la actividad antibacteriana. La actividad antibacteriana depende de varios factores como son el pH, la fuerza iónica, el peso molecular del compuesto a evaluar, entre otros. En este estudio además del pH, las variables estuvieron asociadas con el tipo de ácido que forma parte del CPE y su método de obtención.

En cuanto al tipo de ácido y su comportamiento frente a *E.coli*, se evidencia una mayor actividad en los CPEs que contienen AB, reflejado en una menor CMI, seguidos de los que contienen ácido AHB y AS (AB>AHB>AS), esto se relaciona con el porcentaje de AB

liberado a pH 6,0 el cual fue mayor para los CPEs EuB₁₀₀ (Figura 3-40). Los valores de la CMI frente a *S. aureus* fueron mayores o se mantuvieron iguales en comparación con los obtenidos frente a *E. coli* (Figura 4-4). Estos resultados son lógicos, teniendo en cuenta que la *E. coli* es una bacteria Gram negativa mientras el *S. aureus* es Gram positivo, lo que se relaciona con la capacidad de interacción por cargas del CPE con la célula bacteriana correspondiente, siendo esta interacción uno de los mecanismo aceptados de actividad antibacteriana para sistemas macromoleculares (327). El aumento en la CMI frente al *S. aureus* estaría dado por la disminución de la interacción electrostática entre el CPE y la membrana plasmática, teniendo en cuenta que los CPEs son de carga positiva mostrando valores que van desde +4,0 hasta +32,0 mV en los pHs de 6,0 y 6,9, por lo que primaría una mayor afinidad con las bacterias Gram negativas como lo es *E. coli*.

Tabla 4-2 CMI y CMB frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* para los diez CPEs, obtenidos por las dos metodologías, a pH 6,9 incubados a 37°C ± 0,5°C por 24 horas en caldo MHB.

	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	CMI (% de ácido)	CMB (% de ácido)	CMI (% de ácido)	CMB (% de ácido)
Extrusión por fusión				
EuB ₁₀₀	0,038	0,300	0,150	0,300
EuB ₇₅ Cl ₂₅	0,019	0,038	0,150	< 0,300
EuHB ₁₀₀	0,075	0,150	0,150	0,300
EuHB ₇₅ Cl ₂₅	0,075	0,150	0,075	0,300
EuAs ₇₅ Cl ₂₅	0,150	0,300	0,300	<0,300
Secado por aspersión				
EuB ₁₀₀	0,300	0,300	0,300	0,300
EuB ₇₅ Cl ₂₅	0,150	0,150	0,150	0,300
EuHB ₁₀₀	0,300	0,300	0,075	0,300
EuHB ₇₅ Cl ₂₅	0,075	0,150	0,075	0,150
EuAs ₇₅ Cl ₂₅	0,150	0,300	0,150	0,300

Tabla 4-3 CMI y CMB frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* para los diez CPEs, obtenidos por las dos metodologías, a pH 6,0 incubados a 37°C ± 0,5°C por 24 horas en caldo MHB.

	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	CMI (% de ácido)	CMB (% de ácido)	CMI (% de ácido)	CMB (% de ácido)
Extrusión por fusión				
EuB ₁₀₀	0,019	0,150	0,150	0,300
EuB ₇₅ Cl ₂₅	0,009	0,075	0,075	0,150
EuHB ₁₀₀	0,075	0,075	0,150	0,150
EuHB ₇₅ Cl ₂₅	0,075	0,075	0,075	0,300
EuAs ₇₅ Cl ₂₅	0,150	0,300	0,300	0,300

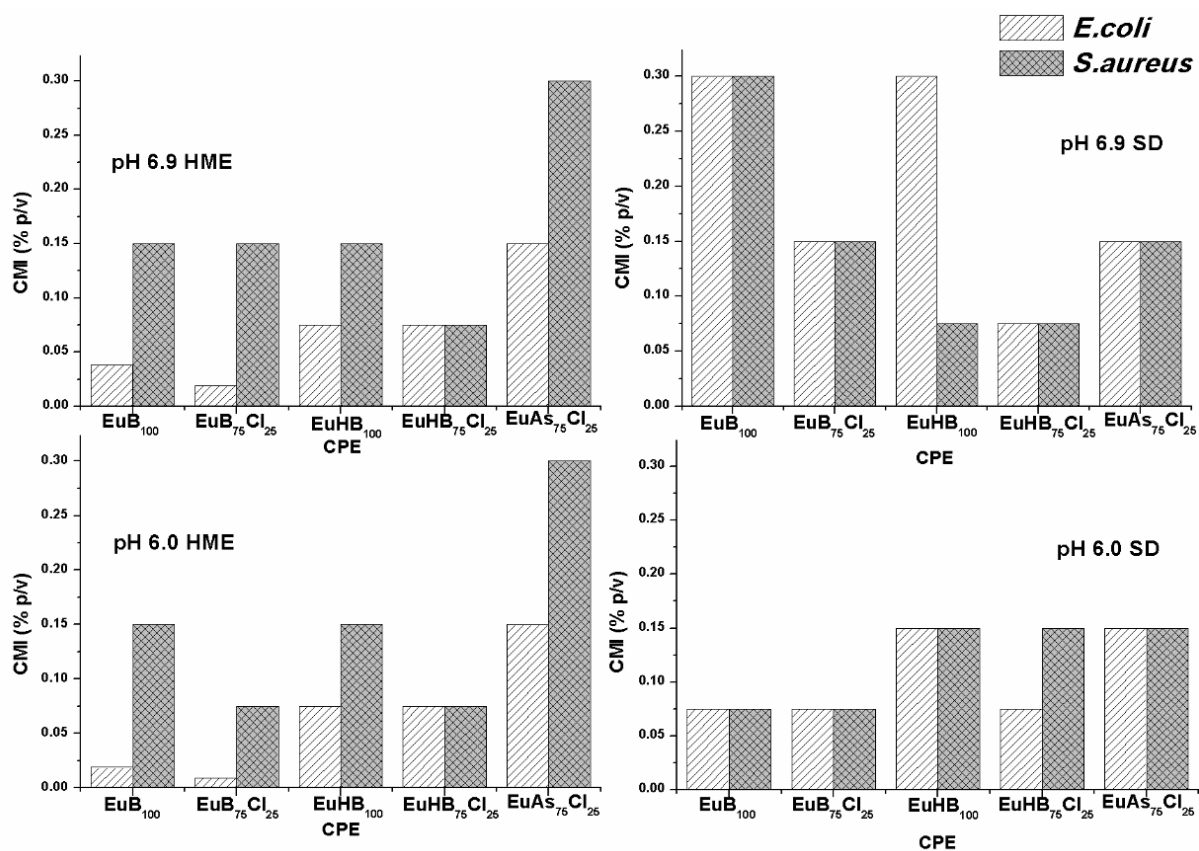
Secado por aspersión				
EuB ₁₀₀	0,075	0,150	0,075	0,150
EuB ₇₅ Cl ₂₅	0,075	0,150	0,075	0,150
EuHB ₁₀₀	0,300	0,300	0,150	0,150
EuHB ₇₅ Cl ₂₅	0,075	0,150	0,150	0,150
EuAs ₇₅ Cl ₂₅	0,150	0,300	0,075	0,300

La interacción electrostática funciona de dos maneras. La primera, permeando la superficie celular conduciendo a la salida de constituyentes intracelulares (como ácidos nucleicos, proteínas, materiales de bajo peso molecular), perturbando las actividades fisiológicas de los microorganismos (292). La segunda, permitiendo la entrada de sustancias que estén próximas al sitio de la interacción electrostática (328–331). Los dos mecanismos de acción basados en la interacción electrostática, en conjunto, inhiben el crecimiento celular de las bacterias.

En el caso de los ácidos sin complejar, a los pH de estudio (6,0 y 6,9), estos se encuentran predominantemente disociados y con carga negativa dificultándose la permeación hacia dentro de la bacteria. En contraste, cuando el ácido está complejado en dispersión, las cargas positivas predominantes dan lugar a una interacción con las cargas negativas de la superficie de las bacterias. Esta alta densidad de cargas positivas sobre la membrana, lleva a una anormal asimetría en la distribución de estas, ocasionando que las cargas negativas de las moléculas lipídicas se concentren y agrupen fuera de la membrana (efecto “flip-flop”) (332,333). De esta manera, se promueve al máximo las interacciones con las cargas positivas externas dadas por el CPE, llevando a la disrupción de la membrana favoreciendo el flujo de ácido (AB, AHB o AS), disociado y sin disociar al interior de la bacteria.

En cuanto a la influencia del pH, se evidenció actividad antibacteriana en las dos condiciones estudiadas (Figura 4-4). Los valores de la CMI de los CPEs aumentaron o se mantuvieron iguales a pH de 6,9, en comparación con lo sucedido a pH 6,0. Esto estaría relacionado con la disminución de las cargas positivas en el CPE a pH 6,9, que llevaría a un aumento en la liberación del ácido al medio (al desestructurarse el par iónico), en gran parte en forma ionizada, lo cual limitaría su difusión al interior de la bacteria de manera similar a lo que ocurre cuando el ácido no está complejado. Por otra parte, la disminución de cargas eléctricas reduciría la interacción electrostática con la membrana celular de la bacteria, lo cual está relacionado con la dependencia del $F-\zeta$ con el pH. Para los CPEs hubo una disminución del potencial a medida que el pH aumentó y por consiguiente un incremento en el porcentaje de ácido liberado de acuerdo con lo mostrado en el Capítulo 3.

Figura 4-4 CMI de los complejos obtenidos por HME y SD a pH 6,0 y 6,9 frente a *E.coli* y *S.aureus*.



La influencia de las dos metodologías de obtención de los CPEs se puede apreciar en la Figura 4-4. En la mayoría de los casos, los CPEs elaborados mediante HME tuvieron una menor CMI en comparación con los obtenidos por SD. Estos resultados estarían relacionados con la diferencia en la velocidad de liberación del ácido hacia el medio de cultivo, lo que concuerda con los resultados de liberación del capítulo anterior, presentados acá como la velocidad de liberación ajustados a una cinética de orden cero para los primeros 90 minutos de liberación (Tabla 4-4). Para los CPEs obtenidos por HME esta velocidad es mayor a pH 6,0 y 6,9, en comparación con los elaborados por SD. Si la liberación se da de manera más rápida las posibilidades de interacción del PE con la superficie bacteriana aumentan, debido a una mayor cantidad de cargas disponibles lo que conlleva a que los mecanismos de acción ya mencionados, de permeación de la superficie de la bacteria y el aumento de la difusión del ácido, sean los predominantes.

Tabla 4-4 Velocidades de liberación de los CPEs estudiados, calculados en los primeros 90 minutos a partir de los resultados de liberación reportados en capítulo 3.

	Velocidad de liberación (%/min)	
	pH 6,0	pH 6,9
Extrusión por fusión		
EuB₁₀₀	35,07	33,97
EuB₇₅Cl₂₅	20,09	25,40
EuHB₁₀₀	31,77	32,35
EuHB₇₅Cl₂₅	23,35	26,15
EuAs₇₅Cl₂₅	14,30	24,62
Secado por aspersión		
EuB₁₀₀	31,68	23,65
EuB₇₅Cl₂₅	19,75	23,43
EuHB₁₀₀	31,48	29,22
EuHB₇₅Cl₂₅	16,27	23,11
EuAs₇₅Cl₂₅	12,11	23,08

Los resultados de la actividad antibacteriana mostrados para los CPEs con los diferentes ácidos son muy promisorios (Tabla 4-2 y 4-3), al comparar con las CMI que se han reportado para los ácidos sin complejar, frente a *E.coli* y *S.aureus*. La CMI del ácido benzoico está en un rango del 0,5% al 1,0% (334), para el ácido 4-hidroxibenzoico entre 0,14% y 0,28% (335) y para el ácido salicílico fluctúa entre 0,25 % y 0,5% (336). Las CMI mencionadas de la literatura científica fueron determinadas a un pH no mayor de 5, ya que como se conoce, estos ácidos pierden su actividad a valores de pH superiores. La investigación desarrollada evidencia de manera general, una disminución de las CMI frente a las cepas estudiadas y una notable ampliación en el rango de pH en el que los ácidos evaluados presentan actividad antibacteriana cuando hacen parte del CPE.

Por otra parte, la actividad bactericida o bacteriostática de un agente depende de su mecanismo de acción, y por lo tanto de su estructura, pero también contribuyen paralelamente otros factores como la concentración alcanzada en el sitio de crecimiento, el tipo de microorganismo, el tamaño del inóculo, el tiempo de acción y la fase de crecimiento (337). Para el caso de los ácidos débiles, la difusión de moléculas de ácido (sin disociar) a través de la membrana citoplasmática de las bacterias es un paso crucial para la actividad de inactivación y, su posterior mecanismo de acción (338). Esta difusión de moléculas de ácido es facilitada por las disrupciones a nivel de la membrana de la bacteria provocadas por las interacciones de los CPEs ya comentadas anteriormente, lo que conlleva a una disminución de la concentración del ácido necesario para inhibir y eliminar las bacterias. Dado que la cantidad de ácido disponible difunde en mayor proporción al interior de las

bacterias cuando está haciendo parte del CPE se alcanzan valores de la CMI y de la CMB mucho menores que los ácidos sin complejar.

- **Fase 2.**

En esta etapa se realizó el conteo de los microorganismos que se reducen por la acción de los CPEs a unas condiciones específicas, mediante la cuantificación de las unidades formadoras de colonias (UFC) viables. Esta etapa permitió conocer el efecto de la concentración y el pH sobre la capacidad bacteriostática o bactericida de los CPEs estudiados. Con la inclusión del ionómero EuCl₁₀₀ se verificó el efecto del PE sin el ácido, al que se le neutralizó el 100% de los grupos DMAE con ácido clorhídrico. La concentración empleada correspondió a la que está presente en las dispersiones de EuB₁₀₀; 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 EuCl₁₀₀.

En las Tablas 4-5 a 4-8, se muestra la reducción logarítmica de las UFC para las bacterias *E.coli* y *S.aureus* cuando estuvieron en contacto con los CPEs obtenidos por HME y SD a dos condiciones de pH. Al igual que en la fase anterior hay una evidente relación entre la inhibición, la concentración y el pH del medio. En las Tablas indicadas se discriminó también la reducción logarítmica con respecto al método de obtención, observándose una mayor influencia sobre el crecimiento de las colonias de las bacterias de *E.coli*, cuando el método de obtención fue el de HME.

Tabla 4-5 Reducción logarítmica de UFC de *E.coli* como respuesta a la aplicación de los CPEs obtenidos por HME, a diferentes concentraciones y a pH 6,0 y 6,9.

	Reducción logarítmica de UFC a diferentes porcentajes del ácido			
	0,300%	0,150%	0,075%	0,038%
pH 6,0				
EuB₁₀₀	8,68 (2,57)	8,68 (2,57)	7,30 (16,04)	6,78 (11,90)
EuB₇₅Cl₂₅	8,68 (2,57)	8,68 (2,57)	8,68 (2,57)	8,68 (2,57)
EuHB₁₀₀	8,68 (2,57)	8,68 (2,57)	8,68 (2,57)	6,05 (18,78)
EuHB₇₅Cl₂₅	8,68 (2,57)	8,68 (2,57)	8,68 (2,57)	7,24 (6,82)
EuAs₇₅Cl₂₅	8,68 (2,57)	6,36 (9,29)	5,51 (8,23)	4,84 (8,27)
EuCl₁₀₀	5,74 (7,63)	4,25 (6,92)	2,01 (12,37)	1,19 (7,21)
pH 6,9				
EuB₁₀₀	8,01 (5,21)	7,30 (9,92)	6,34 (6,48)	5,00 (17,43)
EuB₇₅Cl₂₅	8,01 (5,21)	8,01 (5,21)	8,01 (5,21)	8,01 (5,21)
EuHB₁₀₀	8,01 (5,21)	8,01 (5,21)	5,33 (11,23)	4,63 (10,97)
EuHB₇₅Cl₂₅	8,01 (5,21)	8,01 (5,21)	6,15 (7,46)	5,12 (9,47)
EuAs₇₅Cl₂₅	8,01 (5,21)	6,02 (8,73)	4,00 (13,18)	3,75 (14,68)

EuCl₁₀₀	5,23 (18,04)	2,66 (12,48)	1,04 (47,21)	0,67 (28,20)
---------------------------	--------------	--------------	--------------	--------------

Entre paréntesis, el coeficiente de variación (CV).

Tabla 4-6 Reducción logarítmica de UFC de *S.aureus* como respuesta a la aplicación de los CPEs obtenidos por HME, a diferentes concentraciones y a pH 6,0 y 6,9.

	Reducción logarítmica de UFC a diferentes porcentajes del ácido			
	0,300%	0,150%	0,075%	0,038%
pH 6,0				
EuB₁₀₀	8,06 (5,89)	5,31 (11,65)	4,43 (7,83)	3,22 (4,39)
EuB₇₅Cl₂₅	8,06 (5,89)	8,06 (5,89)	4,90 (11,03)	4,02 (18,69)
EuHB₁₀₀	8,06 (5,89)	8,06 (5,89)	4,21 (10,31)	3,52 (8,40)
EuHB₇₅Cl₂₅	8,06 (5,89)	8,06 (5,89)	4,26 (14,17)	3,81 (4,70)
EuAs₇₅Cl₂₅	8,06 (5,89)	4,41 (8,93)	2,15 (7,62)	1,81 (7,09)
EuCl₁₀₀	4,02 (18,9)	3,13 (9,10)	1,52 (13,62)	1,09 (3,99)
pH 6,9				
EuB₁₀₀	7,67 (2,45)	3,76 (20,18)	2,79 (19,01)	1,58 (54,37)
EuB₇₅Cl₂₅	5,16 (9,71)	4,62 (9,46)	3,42 (19,91)	1,92 (9,43)
EuHB₁₀₀	7,67 (2,45)	3,01 (16,76)	2,04 (26,93)	1,44 (43,26)
EuHB₇₅Cl₂₅	7,67 (2,45)	3,76 (20,38)	2,18 (23,95)	1,87 (7,88)
EuAs₇₅Cl₂₅	4,21 (5,77)	2,77 (26,53)	2,07 (11,84)	0,80 (11,82)
EuCl₁₀₀	3,02 (10,96)	2,12 (16,26)	0,90 (15,82)	0,73 (7,39)

Entre paréntesis, el coeficiente de variación (CV).

Tabla 4-7 Reducción logarítmica de UFC de *E.coli* como respuesta a la aplicación de CPEs obtenidos por SD, a diferentes concentraciones y a pH 6,0 y 6,9.

	Reducción logarítmica de UFC a diferentes porcentajes del ácido			
	0,300%	0,150%	0,075%	0,038%
pH 6,0				
EuB₁₀₀	8,68 (2,57)	8,68 (2,57)	6,95 (6,43)	6,12 (9,99)
EuB₇₅Cl₂₅	8,68 (2,57)	8,68 (2,57)	7,81 (10,56)	6,80 (17,15)
EuHB₁₀₀	8,68 (2,57)	7,10 (4,73)	6,40 (6,55)	4,67 (18,69)
EuHB₇₅Cl₂₅	8,68 (2,57)	8,68 (2,57)	6,95 (11,21)	4,94 (8,24)
EuAs₇₅Cl₂₅	8,68 (2,57)	6,25 (7,95)	5,30 (8,51)	4,05 (14,36)
EuCl₁₀₀	5,74 (7,63)	4,25 (6,92)	2,01 (12,37)	1,19 (7,21)
pH 6,9				
EuB₁₀₀	8,01 (5,21)	6,42 (5,31)	5,33 (7,57)	3,47 (16,79)
EuB₇₅Cl₂₅	8,01 (5,21)	8,01 (5,21)	5,65 (6,28)	5,33 (7,52)
EuHB₁₀₀	8,01 (5,21)	5,57 (13,04)	4,72 (11,42)	3,81 (28,99)
EuHB₇₅Cl₂₅	8,01 (5,21)	8,01 (5,21))	5,15 (11,33)	4,45 (5,76)
EuAs₇₅Cl₂₅	8,01 (5,21)	5,32 (5,05)	3,27 (8,85)	2,37 (25,57)
EuCl₁₀₀	5,23 (18,04)	2,66 (12,48)	1,04 (47,21)	0,67 (28,20)

Entre paréntesis, el coeficiente de variación (CV).

Tabla 4-8 Reducción logarítmica de UFC de *S.aureus* como respuesta a la aplicación de CPEs obtenidos por SD, a diferentes concentraciones y a pH 6,0 y 6,9.

	Reducción logarítmica de UFC a diferentes porcentajes del ácido			
	0,300%	0,150%	0,075%	0,038%
pH 6,0				
EuB₁₀₀	8,06 (5,89)	8,06 (5,89)	3,82 (0,61)	2,49 (0,59)
EuB₇₅Cl₂₅	8,06 (5,89)	8,06 (5,89)	4,16 (0,45)	3,24 (0,32)
EuHB₁₀₀	8,06 (5,89)	8,06 (5,89)	3,37 (0,30)	2,68 (0,51)
EuHB₇₅Cl₂₅	8,06 (5,89)	8,06 (5,89)	2,36 (0,30)	1,48 (0,15)

EuAs₇₅Cl₂₅	8,06 (5,89)	3,29 (0,21)	1,80 (0,53)	1,27 (0,29)
EuCl₁₀₀	3,41 (9,71)	3,13 (9,10)	1,52 (13,62)	1,09 (3,99)
pH 6,9				
EuB₁₀₀	7,67 (2,45)	2,80 (0,64)	2,24 (0,45)	1,12 (0,32)
EuB₇₅Cl₂₅	4,21 (0,80)	3,41 (0,70)	2,41 (0,45)	1,59 (0,65)
EuHB₁₀₀	7,67 (2,45)	2,44 (0,60)	1,62 (0,20)	0,77 (0,06)
EuHB₇₅Cl₂₅	7,67 (2,45)	3,09 (0,19)	1,79 (0,06)	1,42 (0,11)
EuAs₇₅Cl₂₅	3,69 (0,66)	2,44 (0,72)	1,79 (0,06)	0,73 (0,05)
EuCl₁₀₀	3,02 (10,96)	2,12 (16,26)	0,90 (15,82)	0,73 (7,39)

Entre paréntesis, el coeficiente de variación (CV).

Teniendo en cuenta las Tablas 4-5 a 4-8, de reducción logarítmica de crecimiento y para una mejor comprensión de los resultados se construyeron las Figuras 4-5 a 4-12, en las que se relacionan la reducción logarítmica con la concentración del ácido del CPE, para cada uno de los métodos de obtención.

Las Figuras 4-5 y 4-6 corresponden a los resultados presentados en la Tabla 4-5, relacionados con el comportamiento de los CPEs obtenidos por la metodología de HME frente a *E.coli*, a pH 6,0 y 6,9. Al analizar los resultados, las tendencias son similares a lo presentado en la fase 1, con excepción de lo obtenido para el ácido AHB. Se observa un aumento en la reducción logarítmica de las colonias a medida que la concentración aumenta, salvo en el complejo EuB₇₅Cl₂₅ el cual tuvo una reducción logarítmica constante de las colonias, independiente de la concentración y este comportamiento se mantuvo en las dos condiciones de pH empleadas. Este comportamiento podría estar relacionado con *F-ζ*, debido a que este CPE fue el que presentó los más altos valores (Figura 3-27), lo cual facilita la interacción con la *E.coli* y su mejor desempeño a los pH estudiados. El crecimiento de las colonias estuvo afectado por el pH del medio de forma similar a lo explicado en la fase anterior, de manera que a pH 6,9 la reducción logarítmica de las colonias disminuyó en comparación con lo ocurrido a pH 6,0. Con relación al tipo de CPE, la reducción logarítmica del crecimiento se dio en el siguiente orden: EuB₇₅Cl₂₅ > EuHB₇₅Cl₂₅ > EuB₁₀₀ > EuHB₁₀₀ > EuAs₇₅Cl₂₅ > EuCl₁₀₀. Esta relación muestra que la inclusión del ion cloruro al sistema, favorece la reducción de las colonias para los CPEs que contienen ácidos cuyo pKa está más cercano al pH del medio.

Frente a *S.aureus* tanto a pH 6,0 como a 6,9 (Figuras 4-7 y 4-8), la reducción del crecimiento fue menor en comparación con lo obtenido frente a *E.coli*, que como se explicó para la fase 1, se debe principalmente a la mayor interacción de los CPEs con las cargas negativas de la superficie de las bacterias (*E.coli*), que ha sido demostrada para sistemas de macromoléculas, nanopartículas y algunos CPEs en estudios de terapia antimicrobiana

(339). De manera similar a lo que ocurrió frente a *E.coli*, la reducción logarítmica de las colonias de *S.aureus* estuvo afectada por el pH siendo menor a pH 6,9. y el orden en la reducción logarítmica con relación a los CPEs se comportó de manera parecida.

Figura 4-5 Reducción logarítmica de UFC de *E.coli* como respuesta a la aplicación de los CPEs obtenidos por HME a pH 6,0.

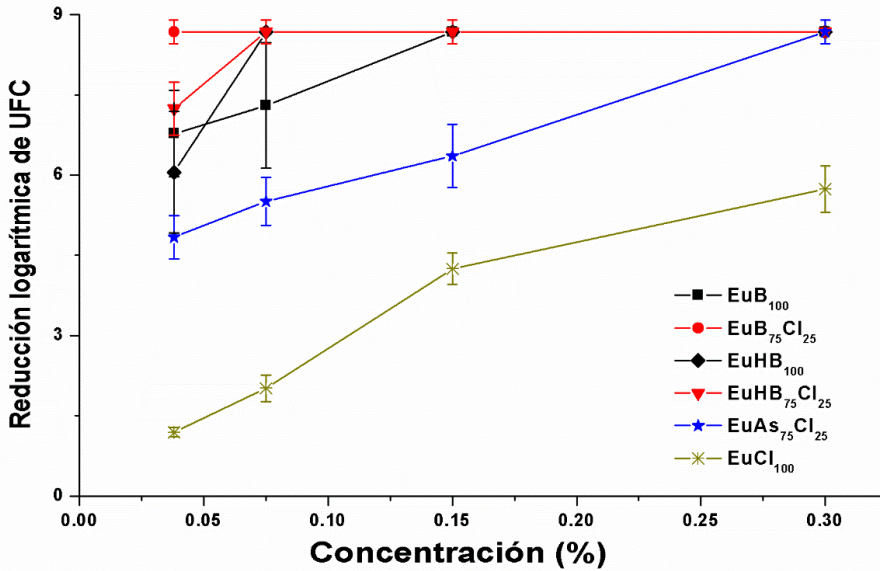


Figura 4-6 Reducción logarítmica de UFC de *E.coli* como respuesta a la aplicación de los CPEs obtenidos por HME a pH 6,9.

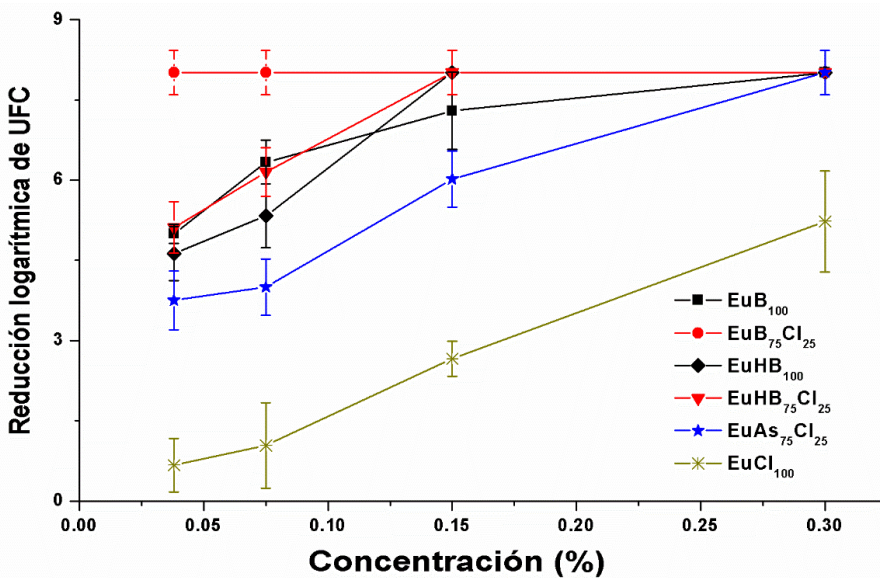


Figura 4-7 Reducción logarítmica de UFC de *S.aureus* como respuesta a la aplicación de los CPEs obtenidos por HME a pH 6,0.

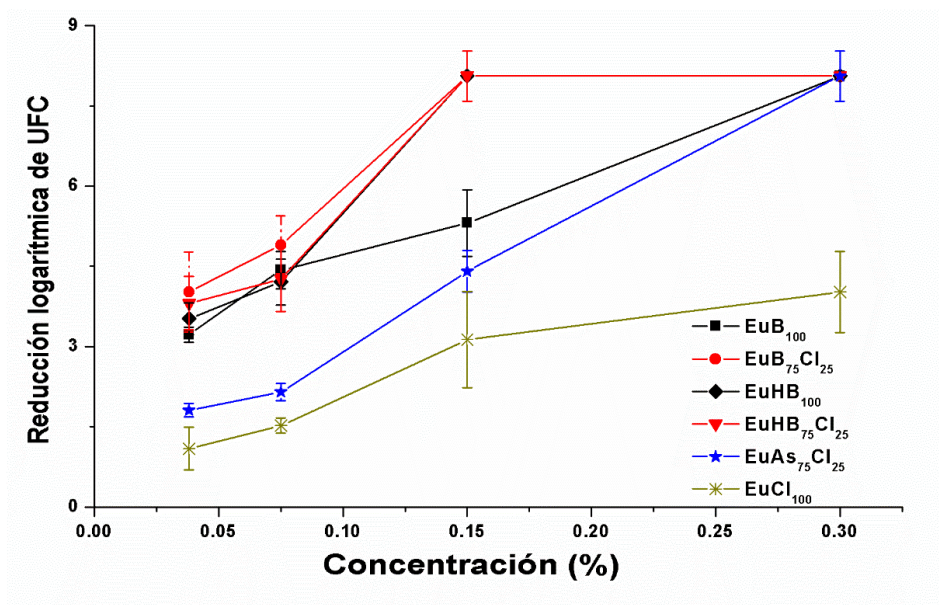
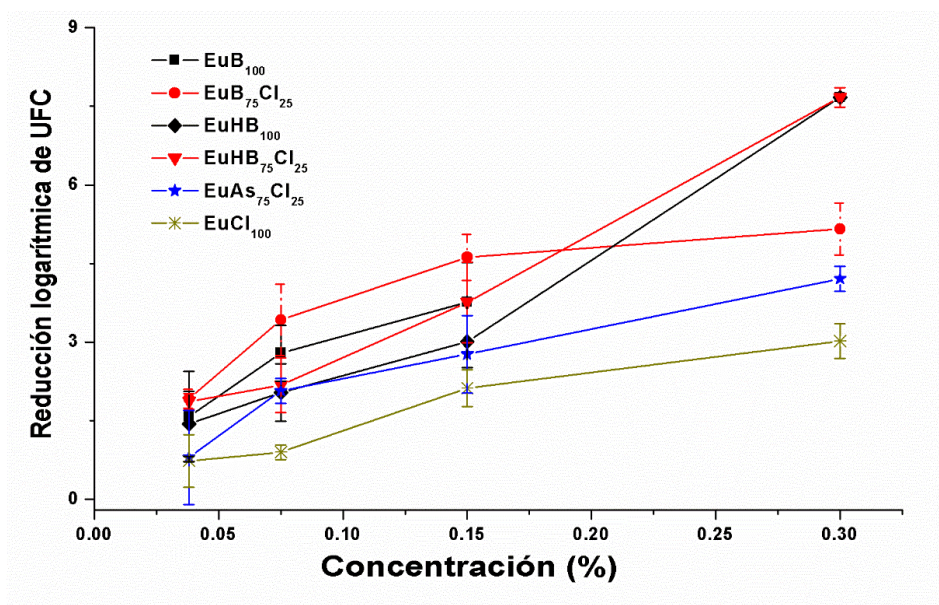


Figura 4-8 Reducción logarítmica de UFC de *S.aureus* como respuesta a la aplicación de los CPEs obtenidos por HME a pH 6,9.



De forma análoga a lo descrito para los CPEs obtenidos por HME, las Figuras 4-9 y 4-10 ilustran los resultados de los CPEs obtenidos por SD frente a *E.coli* a pH 6,0 y 6,9 (resultados mostrados en la Tablas 4-7). Se evidencia una mayor reducción de las colonias a medida que la concentración del ácido en el CPE aumenta y un mayor crecimiento cuando

el pH es más alto. También es evidente, que no hubo una inhibición completa del crecimiento de las colonias por parte de las dispersiones de los CPEs en las concentraciones evaluadas, siendo los de mejor desempeño el $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$ y el $\text{EuHB}_{75}\text{Cl}_{25}$, manteniendo una tendencia similar a la presentada en HME y un comportamiento parecido al observado en la fase 1.

Como era de esperarse y, de acuerdo con lo ya explicado, la reducción logarítmica de colonias encontrada para *S.aureus* fue menor en comparación con la alcanzada para *E.coli*, manteniendo la misma tendencia. Los CPEs con mejor desempeño fueron $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$, $\text{EuHB}_{75}\text{Cl}_{25}$ y EuB_{100} de manera similar al orden que se mostró para HME (Figuras 4-11 y 4-12 construidas a partir de los resultados presentados en la Tabla 4-8).

Como se ha indicado la interacción electrostática de los CPEs con la membrana celular, es uno de los fenómenos cruciales en la actividad antibacteriana de estos sistemas. Esta interacción electrostática es favorecida en la medida que el CPE tenga más cargas en su estructura. Para los CPEs evaluados, los de mayor proporción de Eu son los CPEs $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$ (2,1% de Eu), obtenidos por ambas metodologías, los cuales presentaron el menor valor de CMI en los pHs estudiados. El CPE elaborado por HME presentó un pseudo potencial de +25,4 mV, superior a los demás CPEs, lo que explica su mejor desempeño en términos de su actividad antibacteriana.

Figura 4-9 Reducción logarítmica de UFC de *E.coli* como respuesta a la aplicación de los CPEs obtenidos por SD a pH 6,0.

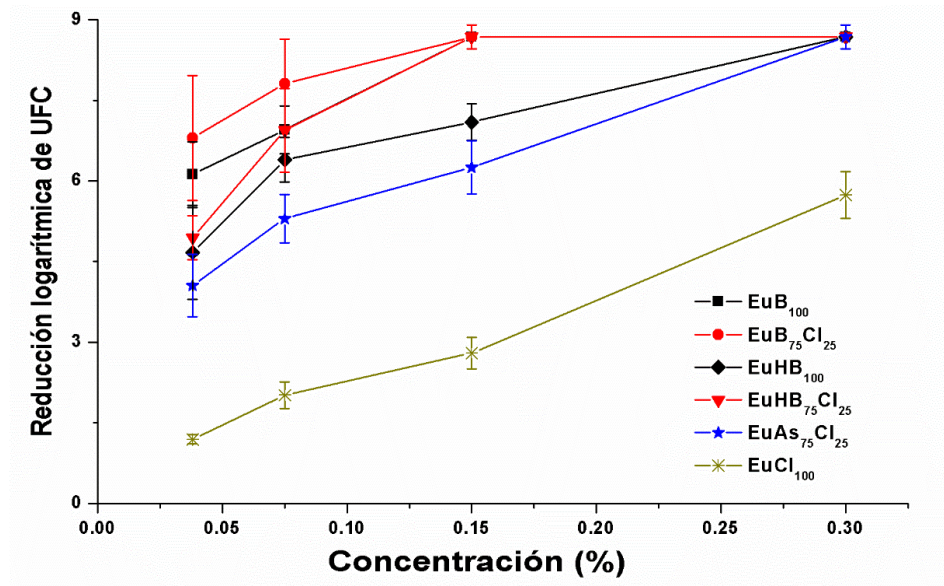


Figura 4-10 Reducción logarítmica de UFC de *E.coli* como respuesta a la aplicación de los CPEs obtenidos por SD a pH 6,9.

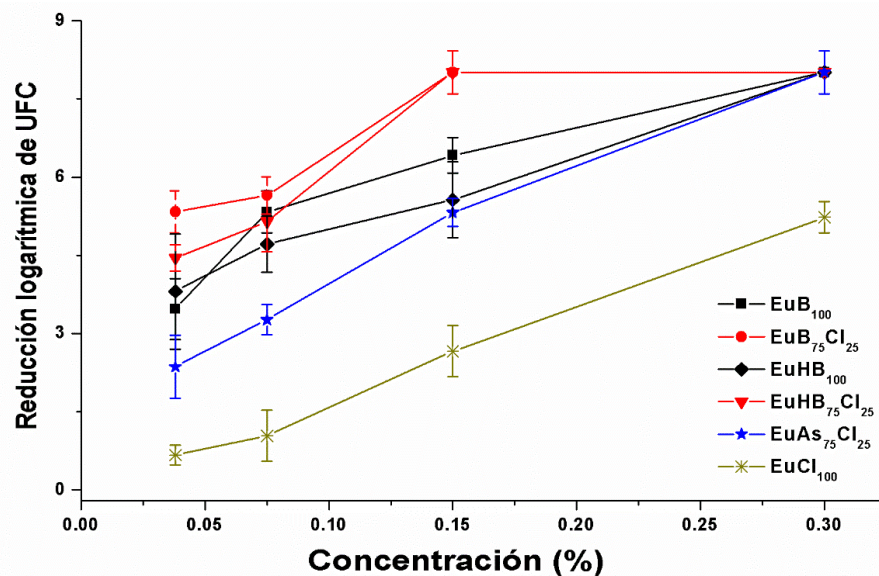


Figura 4-11 Reducción logarítmica de UFC de *S.aureus* como respuesta a la aplicación de los CPEs obtenidos por SD a pH 6,0.

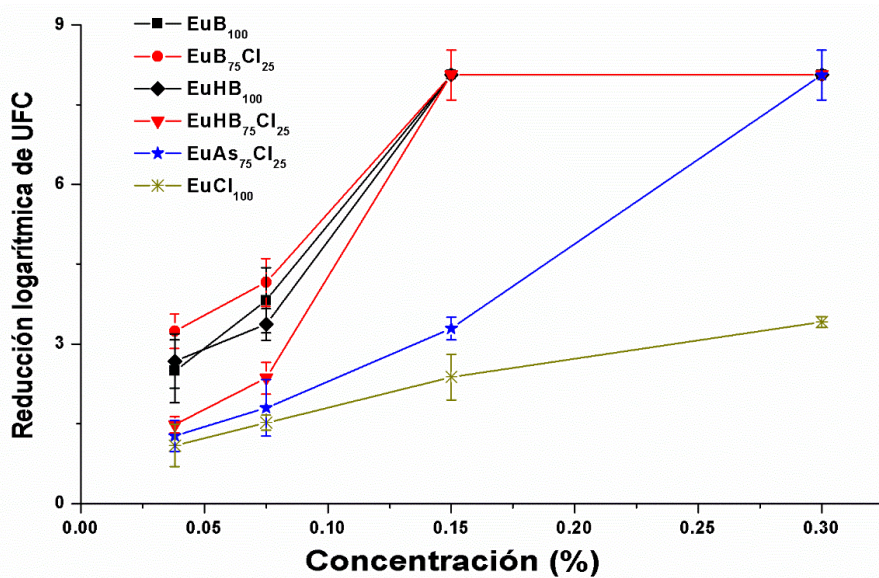
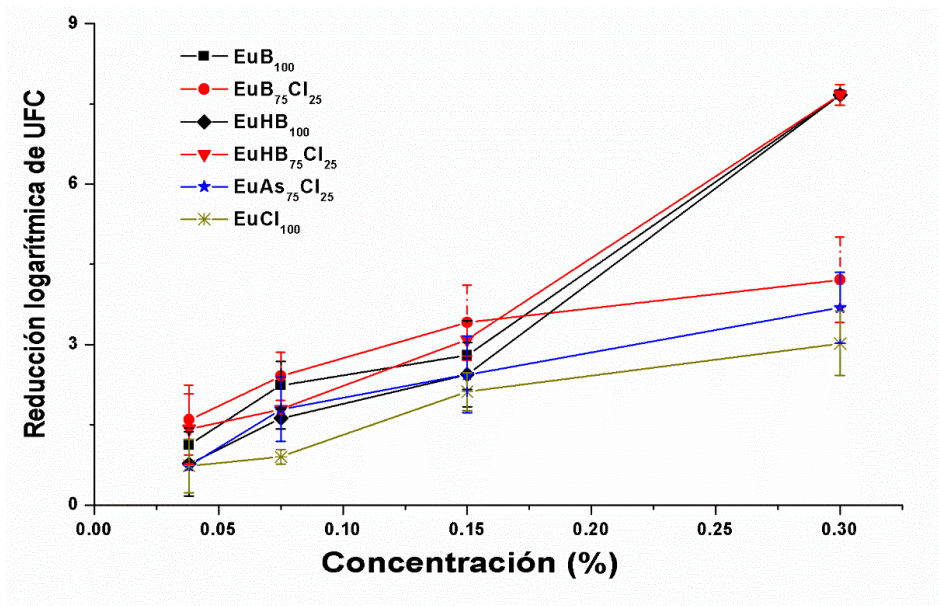


Figura 4-12 Reducción logarítmica de UFC de *S.aureus* como respuesta a la aplicación de los CPEs obtenidos por SD a pH 6,9.



En cada uno de los ensayos de reducción de crecimiento de colonias el ionómero EuCl₁₀₀ mantuvo actividad antibacteriana frente a los dos microorganismos, la cual fue inferior a la registrada por los CPEs (Figuras 4-5 a 4-12). Este resultado, está acorde con investigaciones previas en las que se ha comprobado la capacidad que tiene el ionómero de establecer interacciones de tipo electrostáticas con las membranas celulares, entre las cargas catiónicas del polímero y los grupos negativos de la superficie de la célula bacteriana, lo que conlleva a una aglomeración entre el polielectrolito y las estructuras de la membrana de tipo hidrofóbico (340–343). De manera similar, en varias investigaciones donde se empleó el polímero Eudragit E100 asociado a un compuesto antimicrobiano, se evidenció un efecto potenciador sobre la actividad antibacteriana contra *P.aeruginosa*, *E.coli*, *S.aureus* y *Staphylococcus pneumonia* atribuido al aumento de la permeación por parte del compuesto antimicrobiano y a la interacción de los grupos amina terciaria protonados (dimetilaminoetilo) del polímero (56,344,345).

4.7.2 Análisis estadístico de la reducción logarítmica del crecimiento de las bacterias

Con la finalidad de poder analizar estadísticamente la capacidad bactericida de los CPEs obtenidos por las dos metodologías, se evaluaron las diferencias entre los resultados para cada uno de los CPEs y el ionómero EuCl₁₀₀ a los valores de pH estudiados, y a todos los

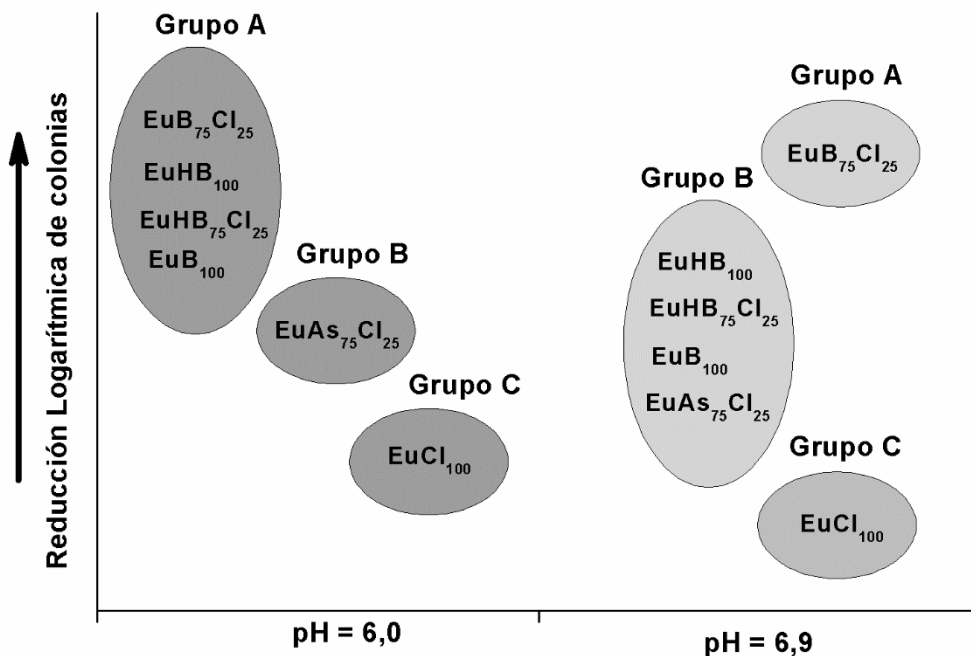
CPEs en conjunto. En la Tabla 4-9 se muestran las agrupaciones mediante análisis estadístico de Tukey de los CPEs obtenidos por las metodologías de HME y SD. En cada agrupación se tuvo en cuenta la reducción de las UFC, la concentración de ácido y el pH del medio. Los grupos que corresponden a una misma tendencia estadística de comportamiento frente a los microorganismos se nombraron con las letras del alfabeto siendo la letra “A” la correspondiente al mejor desempeño antibacteriano, cuando hay varios grupos.

Tabla 4-9 Agrupación por reducción logarítmica de UFC de *E.coli* y *S.aureus* de los CPEs y EuCl₁₀₀ en dispersión.

	Extrusión por fusión		Secado por aspersión	
	<i>E.coli</i> (grupos)	<i>S.aureus</i> (grupos)	<i>E.coli</i> (grupos)	<i>S.aureus</i> (grupos)
pH 6,0				
EuB₁₀₀	A	A	B	A
EuB₇₅Cl₂₅	A	A	A	A
EuHB₁₀₀	A	A	B	A
EuHB₇₅Cl₂₅	A	A	B	A
EuAs₇₅Cl₂₅	B	A	B	A
EuCl₁₀₀	C	A	C	A
pH 6.9				
EuB₁₀₀	B	A	A	A
EuB₇₅Cl₂₅	A	A	A	A
EuHB₁₀₀	B	A	A	A
EuHB₇₅Cl₂₅	B	A	A	A
EuAs₇₅Cl₂₅	B	A	A	A
EuCl₁₀₀	C	A	A	A

En la Figura 4-13 se puede ver de manera gráfica las agrupaciones de los CPEs obtenidos por HME y el EuCl₁₀₀ considerando su actividad frente a *E.coli*. Las agrupaciones presentadas confirman su comportamiento dependiente del pH y se diferencian estadísticamente en tres grupos que cambian su conformación cuando el pH pasa de 6,0 a 6.9. Aunque, en la mayoría de los casos los CPEs que forman los grupos cambian con el pH (Figura 4-13 y Tabla 4-9), el CPE EuB₇₅Cl₂₅ mantiene su actividad superior a los demás y se diferencia como un grupo aparte a pH 6.9. Por el contrario, el ionómero EuCl₁₀₀ mantuvo una actividad antibacteriana muy reducida en comparación con el EuB₇₅Cl₂₅, presentando a los dos pHs el menor desempeño en reducción de colonias de *E.coli*.

Figura 4-13 Agrupación de los CPEs obtenidos por HME y EuCl_{100} con respecto a la reducción de las colonias de *E.coli* a pH 6,0 y 6,9.



Para los CPEs obtenidos por SD su comportamiento en la reducción de colonias de *E.coli* solo se diferenció estadísticamente en grupos cuando el pH fue 6,0 y el CPE con mejor desempeño fue el $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$ (Tabla 4-9). Este comportamiento confirma lo explicado en la fase 1, que se relaciona con las velocidades de liberación que tienen los CPEs obtenidos por SD a pH 6,9 (Tabla 4-4) y las cargas que se generan a este valor de pH.

En cuanto a los resultados de reducción de colonias de *S.aureus* por parte de los CPEs y el ionómero EuCl_{100} , obtenidos por las dos metodologías (Tabla 4-9), no hubo un comportamiento diferenciador entre los sistemas evaluados ni cuando se modificó el pH, esto indica que la reducción de colonias de *S.aureus* depende más de la concentración que del tipo de complejo empleado (Figuras 4-5 a la 4-12).

Adicionalmente, se realizó un análisis conjunto en el que se agruparon los sistemas empleados de acuerdo con el comportamiento de reducción de colonias, sin tener en cuenta la metodología de obtención (Tabla 4-10). Se encontró que algunos CPEs tienen una tendencia similar en reducción de colonias independientemente del método de obtención, aunque cabe destacar al $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$ obtenido por HME quien se diferenció de su contraparte obtenida por SD en su comportamiento frente a *E.coli*. Este comportamiento se puede explicar por el mayor $F-\zeta$ positivo del $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$ HME a ambos valores de pH, lo cual

favorece la interacción con la membrana de la bacteria. Frente a *S.aureus*, como era de esperarse solo se tiene una agrupación para todos los CPEs, presentando un comportamiento homogéneo a los valores de pH trabajados, indistinto del método de obtención.

Tabla 4-10 Agrupación estadística de los CPEs (obtenidos por ambas metodologías), teniendo en cuenta la reducción logarítmica de colonias frente a *E. coli* y *S. aureus* a pH 6,0 y 6,9.

<i>E.coli</i> pH 6,0		<i>E.coli</i> pH 6,9		<i>S.aureus</i> pH 6,0		<i>S.aureus</i> pH 6,9
EuB ₇₅ Cl ₂₅ HME EuHB ₁₀₀ HME EuHB ₇₅ Cl ₂₅ HME	[A]	EuB ₇₅ Cl ₂₅ HME	[A]	EuB ₁₀₀ HME EuB ₇₅ Cl ₂₅ SD EuB ₁₀₀ SD		EuB ₁₀₀ HME EuB ₇₅ Cl ₂₅ SD EuB ₁₀₀ SD
EuB ₁₀₀ HME EuB ₇₅ Cl ₂₅ SD	[B]	EuB ₁₀₀ HME EuB ₇₅ Cl ₂₅ SD EuB ₁₀₀ SD EuHB ₇₅ Cl ₂₅ SD EuHB ₁₀₀ SD EuAS ₇₅ Cl ₂₅ HME EuAS ₇₅ Cl ₂₅ SD	[B]	EuHB ₇₅ Cl ₂₅ SD EuHB ₁₀₀ SD EuAS ₇₅ Cl ₂₅ HME EuAS ₇₅ Cl ₂₅ SD EuCl ₁₀₀ HME EuCl ₁₀₀ SD EuCl ₁₀₀ HME EuCl ₁₀₀ SD	[A]	EuB ₁₀₀ HME EuB ₇₅ Cl ₂₅ SD EuB ₁₀₀ SD EuHB ₇₅ Cl ₂₅ SD EuHB ₁₀₀ SD EuAS ₇₅ Cl ₂₅ HME EuAS ₇₅ Cl ₂₅ SD EuCl ₁₀₀ HME EuCl ₁₀₀ SD EuCl ₁₀₀ HME EuCl ₁₀₀ SD
EuB ₁₀₀ SD EuHB ₇₅ Cl ₂₅ SD EuHB ₁₀₀ SD EuAS ₇₅ Cl ₂₅ HME EuAS ₇₅ Cl ₂₅ SD	[C]	EuCl ₁₀₀ HME EuCl ₁₀₀ SD	[C]			
EuCl ₁₀₀ HME EuCl ₁₀₀ SD	[D]	-----				

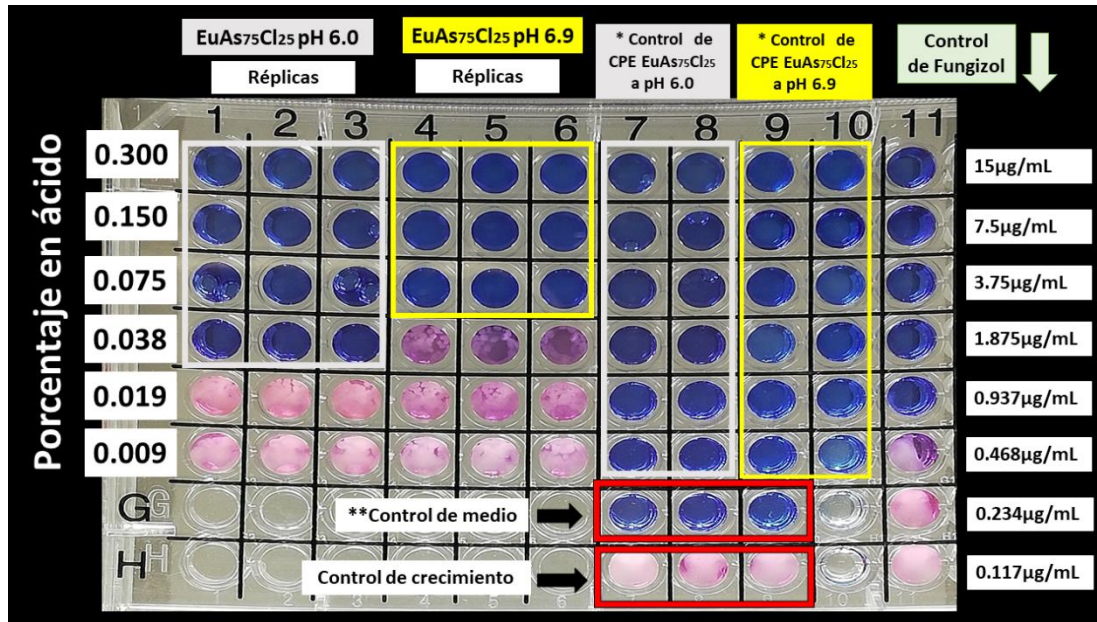
4.7.3 Evaluación antimicótica

Como se indicó en la metodología, de manera similar a lo realizado para la actividad antibacteriana, la evaluación antimicótica se realizó en dos etapas:

- Fase 1.

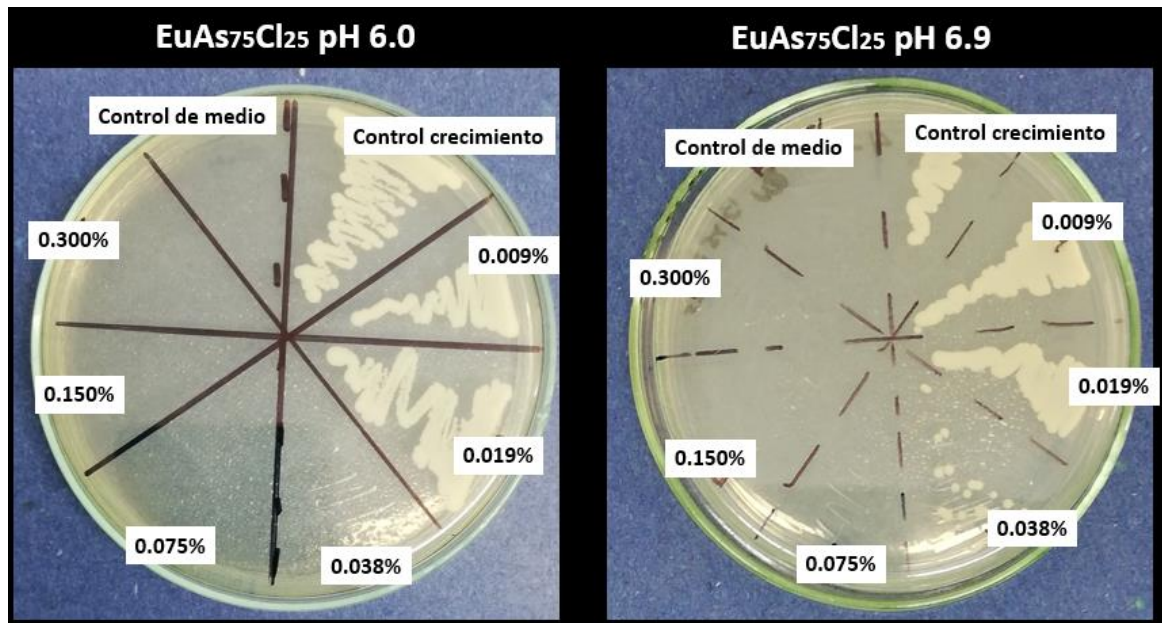
En la Figura 4-14, a manera de ejemplo, se muestra el resultado de actividad del CPE EuAS₇₅Cl₂₅ obtenido por SD frente a *Candida albicans*. La CMI que se observa es de 0,038% a pH 6,0 y de 0,075% a pH 6,9. En la Figura 4-15 se ilustra la imagen del repique en placa, en la que se puede establecer la CMF del CPE EuAS₇₅Cl₂₅ a los dos pHs, que concuerdan con los resultados de la CMI.

Figura 4-14 Resultados de la metodología dilución en caldo para la determinación CMI de EuAs₇₅Cl₂₅ obtenido por SD frente a *Candida albicans*, utilizando caldo SDB ajustado a pH 6,0 y 6,9.



**Control de medio: caldo SDB ajustado a pH 6.9.
 *Control de CPE EuAs₇₅Cl₂₅: dispersión de los CPE sin inóculo de *Candida albicans*.

Figura 4-15 Resultados de repique en agar TSA para determinar la CMF del CPE EuAs₇₅Cl₂₅ obtenido por SD frente a *Candida albicans*, utilizando caldo SDB ajustado a pH 6,0 y 6,9.



Los valores de CMI y CMF frente a *Candida albicans*, para los diez CPEs obtenidos por las dos metodologías y evaluados a pH 6,0 y 6,9, se presentan en la Tabla 4-11. En los resultados se aprecia que la CMI se mantuvo en 0,038% para nueve de los diez CPEs estudiados. A pH 6,0, solo el CPE EuAs₇₅Cl₂₅ obtenido por HME tuvo un valor mayor que fue de 0,150%. A pH 6,9 hubo un aumento de la CMI para la mayoría de los CPEs, con excepción de EuB₁₀₀ y EuB₇₅Cl₂₅ obtenidos por SD, que mantuvieron su CMI a pesar del cambio del pH. La CMF fue de 0,038% para ocho de los CPEs a pH 6,0. A pH 6,9 la CMF aumentó para casi todos los CPEs, excepto para el EuB₇₅Cl₂₅ obtenido por SD, la cual se mantuvo en 0,038%.

Tabla 4-11 CMI y CMF frente a *Candida albicans* para los diez CPEs, obtenidos por las dos metodologías, en caldo SDB ajustado a pH de 6,0 y 6,9.

	<i>Candida albicans</i>			
	pH 6,0		pH 6,9	
	CMI	CMF	CMI	CMF
Extrusión por fusión				
EuB ₁₀₀	0,038	0,038	0,150	0,300
EuB ₇₅ Cl ₂₅	0,038	0,038	0,075	0,150
EuHB ₁₀₀	0,038	0,038	0,150	0,300
EuHB ₇₅ Cl ₂₅	0,038	0,038	0,075	0,150
EuAs ₇₅ Cl ₂₅	0,150	0,300	0,300	0,300
Secado por aspersion				
EuB ₁₀₀	0,038	0,075	0,038	0,300
EuB ₇₅ Cl ₂₅	0,038	0,038	0,038	0,038
EuHB ₁₀₀	0,038	0,038	0,075	0,150
EuHB ₇₅ Cl ₂₅	0,038	0,038	0,075	0,075
EuAs ₇₅ Cl ₂₅	0,038	0,038	0,075	0,075

De acuerdo con lo explicado, la CMI frente a *C.albicans* fue diferente para algunos CPEs, destacando que la CMI más baja obtenida (0,038%), fue inferior a estudios reportados en la literatura en los que emplearon a los AB, AS y AHB (Tabla 4-12). Esta mayor inhibición del crecimiento de las colonias de la *C.albicans* por estos CPEs, se atribuye a un mecanismo sinérgico entre el PE y el ácido que hacen parte del CPE, que impactan sobre la membrana celular del hongo; un sinergismo similar ha sido demostrado entre timol y AS frente a *Fusarium solani*, lo cual se ha relacionado con el contenido de ergosterol en la membrana plasmática del hongo, que disminuye por efecto de la inhibición de la ruta biosintética (346).

El ergosterol es el esteroles más abundante en las membranas celulares de los hongos, regulando la permeabilidad y, es el responsable de mantener la función y la integridad

estructural a nivel celular (347). La inhibición de una o varias rutas de biosíntesis del ergosterol provoca un aumento del valerato de metilo, destruyendo las estructuras de la membrana e inhibiendo el crecimiento de las células fúngicas (346). Una las principales propiedades que tienen moléculas pequeñas como el AS, el AB y el AHB es su carácter lipofílico, que le permite disolverse en el biofilm del hongo reduciendo la síntesis de ergosterol, lo que sumado a la interacción disruptiva que ejercen las cargas positivas de los CPEs, provoca la fuga de sustancias intracelulares, la reducción en el crecimiento y la proliferación de colonias (348–350).

Tabla 4-12 Valores de CMI del ácido benzoico, ácido salicílico y 4-hidroxibenzoico frente a *C. albicans* reportados en la literatura.

Ácido	CMI reportada	pH	Referencia
Ácido benzoico	>1,0mg/ml	7,0	(351)
Ácido salicílico	1,0mg/ml	No especificado	(352)
Ácido 4-hidroxibenzoico	1380µg/ml	No especificado	(353)

- **Fase 2.**

Para esta etapa, empleando un procedimiento similar a lo realizado frente a bacterias, se efectuó el conteo de las UFC viables de *C.albicans* que disminuyeron por la acción de los CPEs y también se incluyó el ionómero EuCl₁₀₀. Las concentraciones evaluadas fueron 0,300; 0,150; 0,075 y 0,038% del ácido correspondiente. La reducción de crecimiento fue calculada con la Ecuación 4-1.

En las Tablas 4-13 y 4-14, se presentan los resultados de la reducción logarítmica de las UFC para *C.albicans* después de su exposición a los CPEs, obtenidos por HME y SD, a pH 6,0 y 6,9. Se observa una inhibición casi completa a pH 6,0 con todos los CPEs, independiente de la metodología de obtención y de la concentración. A pH 6,9, la reducción en el crecimiento disminuye al bajar la concentración, encontrando la mayor reducción a concentración de 0,300% del ácido. El ionómero EuCl₁₀₀ también mostró actividad, incluso mayor que algunos CPEs, confirmando la influencia del PE que hace parte del CPE sobre la actividad antimicótica. El nivel de actividad del ionómero se mantuvo independientemente de la concentración empleada, pero disminuyó con el aumento del pH.

Como se explicó en la fase 1, la posible disrupción ejercida por el CPE conlleva a la pérdida de la estructura de la *C.albicans*, esto combinado con el aumento de la permeación y la liberación controlada de los ácidos son la clave de la actividad antifúngica. Esto concuerda con lo evaluado en otros estudios como los de Karlsson et al., 2010, y Gifu et al., 2019 en

los que el empleo de un PE y la conformación de sistemas de liberación de agentes antifúngicos reduce la formación de biopelículas e inhiben el crecimiento de las colonias de *C.albicans* (354,355). Para el caso específico del ionómero EuCl₁₀₀, la interacción por medio de sus cargas son la posible explicación de su actividad. Por otra parte, el aumento del pH provoca sobre el ionómero una redistribución de las cadenas del polímero, y una disminución del $F-\zeta$ cuando el pH es superior a 6.5 (245). Este resultado se asocia con una menor densidad de cargas positivas y mayores aglomeraciones en el CPE que dificultan la interacción con la *C.albicans* lo que implica una disminución de la actividad antifúngica.

Tabla 4-13 Reducción logarítmica de UFC de *Candida albicans* como respuesta a la aplicación de CPEs obtenidos por HME a diferentes concentraciones y ajustado a pH 6,0 y 6,9.

Reducción logarítmica de UFC a diferentes porcentajes del ácido				
	0,300	0,150	0,075	0,038
pH 6.0				
EuB₁₀₀	7,53 (1,74)	7,53 (1,74)	7,53 (1,74)	7,53 (1,74)
EuB₇₅Cl₂₅	7,53 (1,74)	7,53 (1,74)	7,53 (1,74)	7,53 (1,74)
EuHB₁₀₀	7,53 (1,74)	7,53 (1,74)	7,53 (1,74)	7,53 (1,74)
EuHB₇₅Cl₂₅	7,53 (1,74)	7,53 (1,74)	7,53 (1,74)	7,53 (1,74)
EuAs₇₅Cl₂₅	7,53 (1,74)	7,53 (1,74)	3,27 (21,62)	3,18 (8,88)
EuCl₁₀₀	4,15 (7,59)	3,98 (5,08)	4,05 (9,88)	3,98 (11,53)
pH 6.9				
EuB₁₀₀	7,20 (1,93)	3,57 (7,58)	3,16 (7,75)	2,04 (10,03)
EuB₇₅Cl₂₅	7,20 (1,93)	7,20 (1,93)	3,82 (5,05)	3,57 (7,76)
EuHB₁₀₀	7,20 (1,93)	3,08 (5,12)	2,44 (14,78)	2,03 (13,50)
EuHB₇₅Cl₂₅	7,20 (1,93)	7,20 (1,93)	3,44 (10,49)	2,36 (7,64)
EuAs₇₅Cl₂₅	7,20 (1,93)	2,89 (7,44)	2,13 (12,93)	1,33 (6,99)
EuCl₁₀₀	2,88 (7,26)	2,93 (8,54)	2,81(5,79)	2,89 (11,28)

Tabla 4-14 Reducción logarítmica de UFC de *Candida albicans* como respuesta a la aplicación de CPEs obtenidos por SD a diferentes concentraciones y ajustado a pH 6,0 y 6,9.

Reducción logarítmica de UFC a diferentes porcentajes del ácido				
	0,300	0,150	0,075	0,038
pH 6,0				
EuB₁₀₀	7,53 (1,74)	7,53 (1,74)	7,53 (1,74)	2,38 (8,62)
EuB₇₅Cl₂₅	7,53 (1,74)	7,53 (1,74)	7,53 (1,74)	7,53 (1,74)
EuHB₁₀₀	7,53 (1,74)	7,53 (1,74)	7,53 (1,74)	7,53 (1,74)
EuHB₇₅Cl₂₅	7,53 (1,74)	7,53 (1,74)	7,53 (1,74)	7,53 (1,74)
EuAs₇₅Cl₂₅	7,53 (1,74)	7,53 (1,74)	7,53 (1,74)	7,53 (1,74)
EuCl₁₀₀	4,15 (7,59)	3,98 (5,08)	4,05 (9,88)	3,98 (11,53)
pH 6,9				
EuB₁₀₀	7,20 (1,93)	3,73 (8,55)	3,07 (9,74)	1,95 (11,42)
EuB₇₅Cl₂₅	7,20 (1,93)	7,20 (1,93)	7,20 (1,93)	7,20 (1,93)
EuHB₁₀₀	7,20 (1,93)	7,20 (1,93)	2,53 (16,91)	2,16 (12,08)
EuHB₇₅Cl₂₅	7,20 (1,93)	7,20 (1,93)	7,20 (1,93)	2,42 (6,22)
EuAs₇₅Cl₂₅	7,20 (1,93)	7,20 (1,93)	7,20 (1,93)	1,38 (8,09)
EuCl₁₀₀	2,88 (7,26)	2,93 (8,54)	2,81(5,79)	2,89 (11,28)

Para facilitar la comprensión del efecto de los CPEs sobre la reducción logarítmica de las UFC de *C.albicans*, se presentan los resultados de las Tablas 4-13 y 4-14 a pH 6,9, en las Figuras 4-16, 4-17, 418 y 4-19. En ellas se evidencia de manera más marcada la influencia de la concentración del ácido y del método de obtención. Se observa, que a medida que aumenta la concentración del ácido en el CPE, la reducción logarítmica de las colonias se hace mayor. En cuanto al desempeño de los CPEs en la reducción del crecimiento, se evidenció el siguiente orden, $EuB_{75}Cl_{25} > EuHB_{75}Cl_{25} > EuB_{100} > EuHB_{100} > EuAs_{75}Cl_{25}$, que es independiente del método de obtención. Para el $EuCl_{100}$ el efecto de la reducción en el

crecimiento se dio independiente de la concentración, ya que no se presentan diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro valores de concentración estudiados.

Figura 4-16 Efecto de la concentración de ácido en la reducción logarítmica de UFC de *C. albicans* para los CPEs obtenidos por HME y el ionómero EuCl_{100} a pH 6,9.

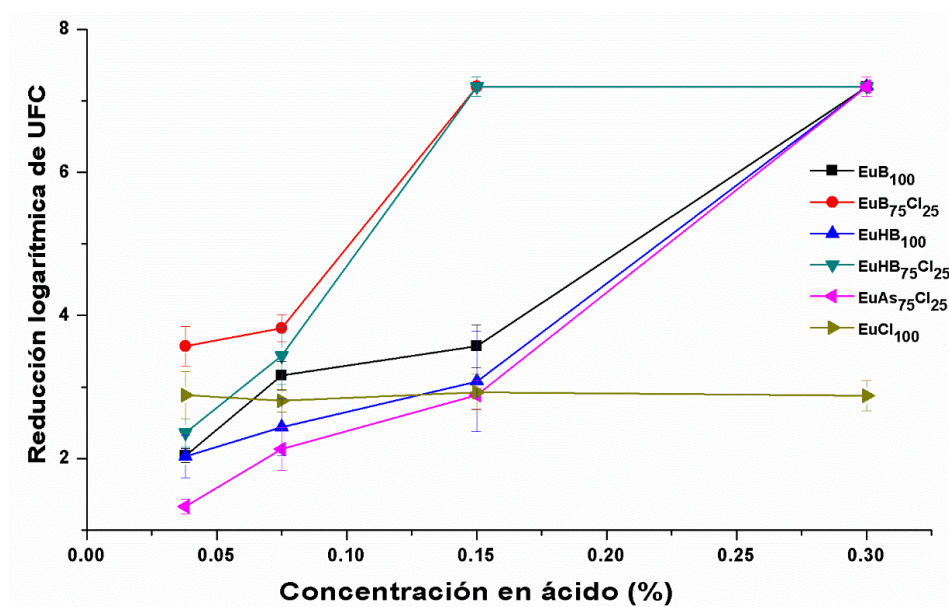


Figura 4-17 Efecto de la concentración de ácido en la reducción logarítmica de UFC de *C. albicans* para los CPEs obtenidos por SD y el ionómero EuCl_{100} a pH 6,9.

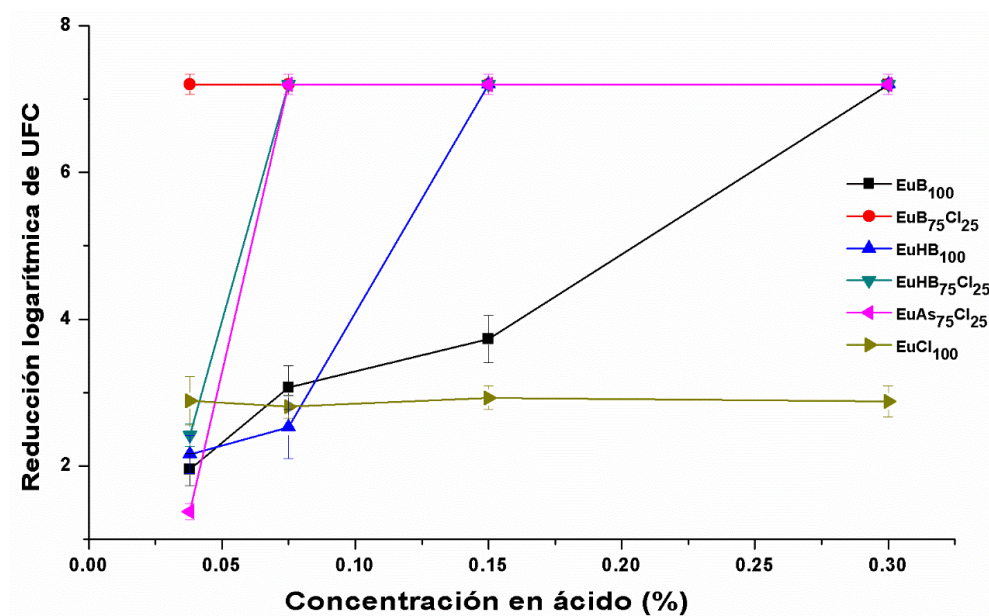


Figura 4-18 Efecto de la concentración de ácido en la reducción logarítmica de UFC de *C. albicans* para los CPEs obtenidos por HME y el ionómero EuCl₁₀₀ a pH 6,0.

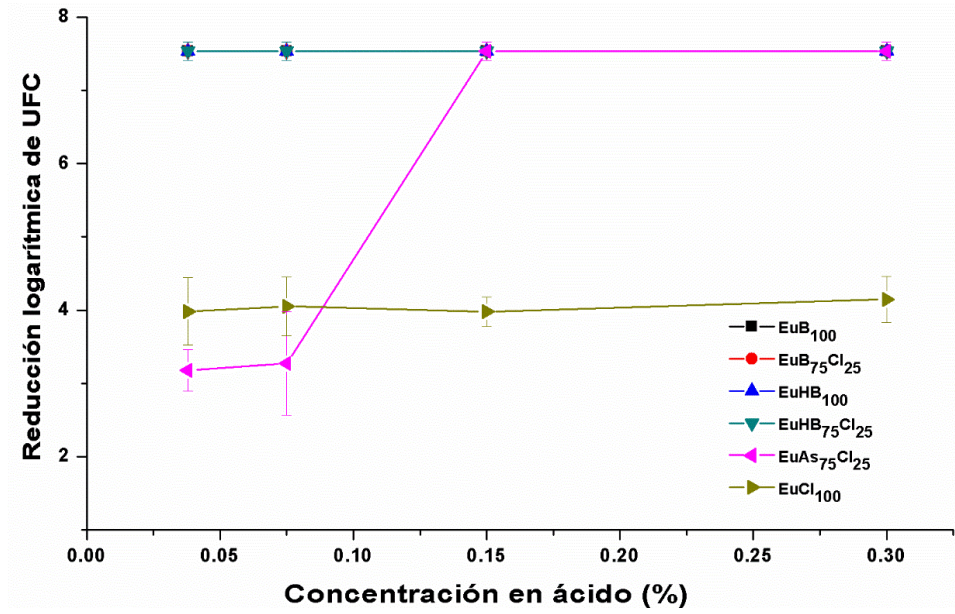
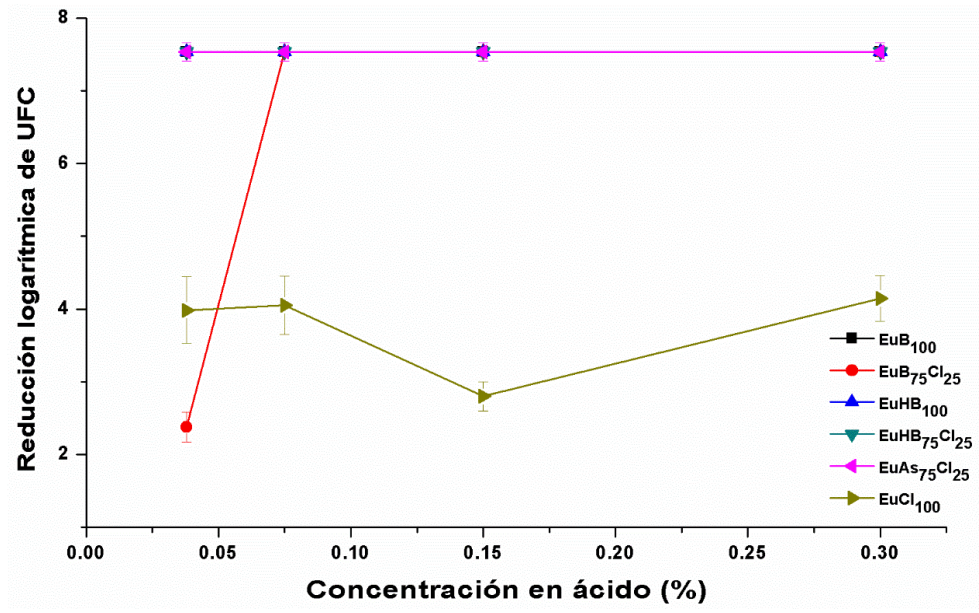


Figura 4-19 Efecto de la concentración de ácido en la reducción logarítmica de UFC de *C. albicans* para los CPEs obtenidos por SD y el ionómero EuCl₁₀₀ a pH 6,0.



4.7.4 Evaluación estadística de la reducción logarítmica de las colonias de *C.albicans*

En la Tabla 4-15 se muestran las agrupaciones mediante el análisis estadístico de Tukey de los CPEs obtenidos por SD y HME, similar a lo realizado en el análisis de la evaluación frente a bacterias. Cada grupo corresponde a un mismo comportamiento o tendencia en la reducción de las unidades formadoras de colonias de la *C.albicans*, de acuerdo con lo explicado en la metodología. Estos grupos se nombraron con letras del alfabeto, de esta manera los de mejor actuación son los agrupados con la letra "A". Los resultados de agrupación muestran que para pH 6,0 hay tres grupos, independiente del método de obtención, estando acorde con lo indicado en las gráficas de reducción 4-18 y 4-19. Los sistemas de peor desempeño fueron el EuAs₇₅Cl₂₅ y el ionómero EuCl₁₀₀.

Tabla 4-15 Agrupación por reducción logarítmica de UFC de *Candida albicans* de los CPEs y del EuCl₁₀₀ en dispersión.

	Extrusión por fusión	Secado por aspersión
	pH 6,0	
EuB₁₀₀	A	A
EuB₇₅Cl₂₅	A	A
EuHB₁₀₀	A	A
EuHB₇₅Cl₂₅	A	A
EuAs₇₅Cl₂₅	B	B
EuCl₁₀₀	C	C
	pH 6,9	
EuB₁₀₀	A	A
EuB₇₅Cl₂₅	A	A
EuHB₁₀₀	A	A
EuHB₇₅Cl₂₅	A	A
EuAs₇₅Cl₂₅	A	A
EuCl₁₀₀	A	A

A pH 6,9, el análisis estadístico no mostró ninguna agrupación, debido principalmente a que en el promedio las medias de la reducción logarítmica de las UFC entre los CPEs son iguales. Este efecto lo propicia la primera concentración (0,3%), en donde para todos los sistemas (exceptuando el ionómero EuCl₁₀₀) el crecimiento fue inhibido. Por lo que se decidió hacer una comparación múltiple descartando la primera concentración, y utilizando el método de DMS con una confianza del 95%, este método es menos conservador que la prueba de Tukey, permitiendo ver diferencias entre los grupos de estudio.

De esta manera, este análisis estadístico evidencia tres grupos para HME a pH 6,9 y ninguna diferencia para los sistemas obtenidos por SD a pH 6,9 (Tabla 4-16).

Tabla 4-16 Agrupación por reducción logarítmica de UFC de *Candida albicans* de los CPEs y del EuCl₁₀₀ en dispersión, a pH 6.9, mediante la prueba estadística de DMS.

	Extrusión por fusión	Secado por aspersión
	pH 6,9	
EuB ₁₀₀	C	A
EuB ₇₅ Cl ₂₅	A	A
EuHB ₁₀₀	C	A
EuHB ₇₅ Cl ₂₅	B	A
EuAs ₇₅ Cl ₂₅	C	A
EuCl ₁₀₀	C	A

Los resultados mostrados en la Tabla 4-16, están acordes con la tendencia vista en las Figuras 4-16 y 4-17 e incluso con los datos de la evaluación bacteriana, destacando al CPE EuB₇₅Cl₂₅ como el de mayor efecto sobre la reducción de colonias y al ionómero EuCl₁₀₀ como el de menor efecto. Adicionalmente, se evidencia que los CPEs obtenidos por HME presentaron un mejor comportamiento frente a la reducción de colonias (Tabla 4-13 y 4-14), lo que también coincide con los resultados de la reducción bacteriana.

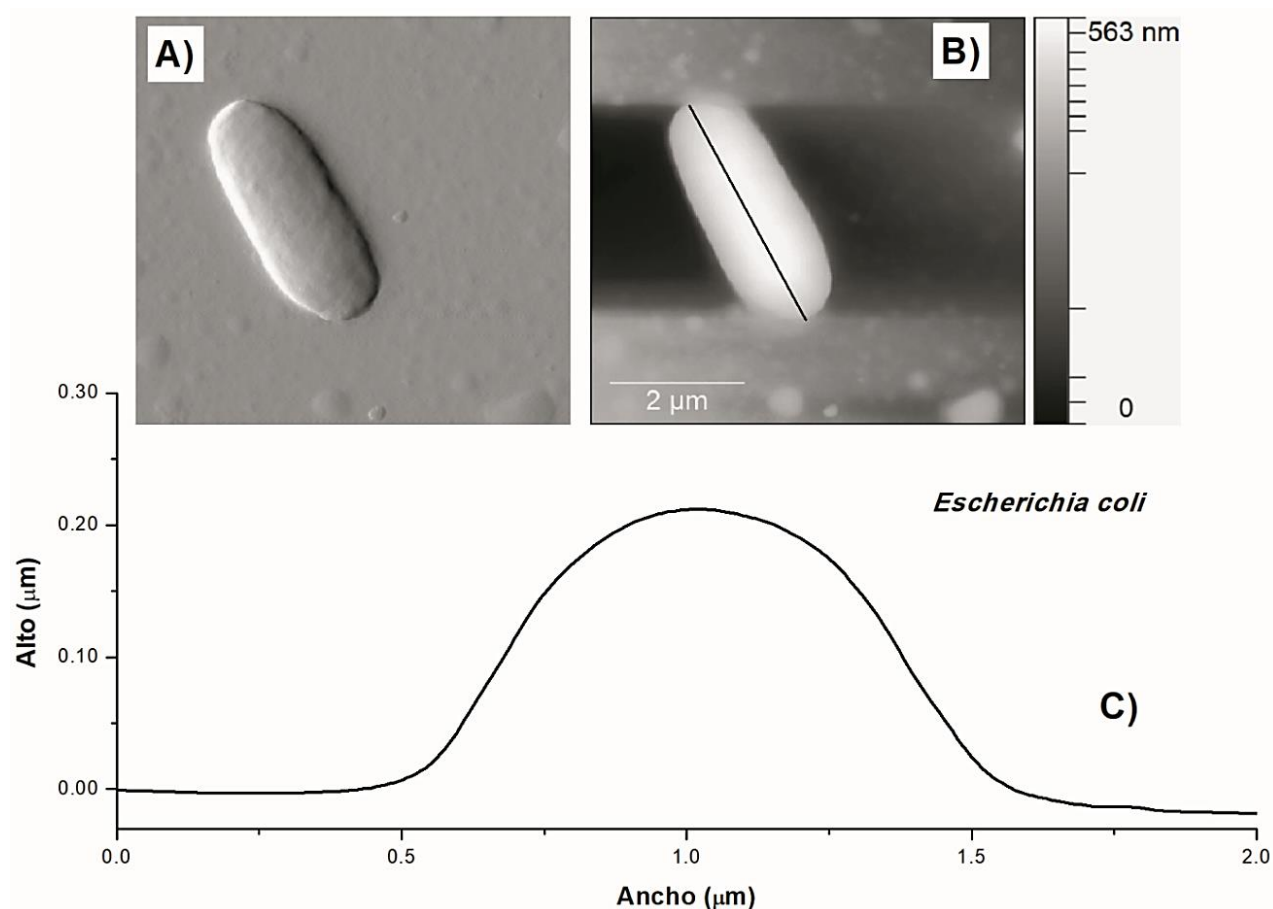
4.7.5 Evaluación de la influencia de la presencia un CPE sobre la morfología y rugosidad de la *E.coli*

Los resultados de inhibición para la bacteria *E.coli*, mostraron que el CPE EuB₇₅Cl₂₅ obtenido por HME tuvo la menor CMI (0,019% - Tabla 4-2), por lo que fue elegido para observar los cambios en morfología y rugosidad de la bacteria, mediante AFM. La Figura 4-18 ilustra una bacteria de *E.coli* sin tratamiento con el CPE, bajo la condiciones de evaluación, en la que se observa la integridad de la célula bacteriana, sin rupturas ni poros visibles en toda la superficie (Figura 4-20, A). A partir de esta imagen, se establecieron las dimensiones de la célula no tratada, trazando una línea longitudinal sobre el plano de la bacteria y midiendo su distancia. Por otro lado, se extrajeron las medidas de altura y ancho a partir de la sección transversal de la imagen, utilizando la herramienta perfiles a lo largo de los ejes del software Gwyddion (Figura 4-20, B y C). Los datos promedio de ancho, altura y longitud fueron de $1,23 \pm 0,11\mu\text{m}$; $0,21 \pm 0,01\mu\text{m}$; $3,30 \pm 0,02\mu\text{m}$, respectivamente, estando de acuerdo con lo encontrado en otras investigaciones (356,357).

Como se indicó en la metodología, se tomaron las imágenes de las células tratadas con el CPE EuB₇₅Cl₂₅ en los tiempos 0, 30, 45 y 60 minutos. En la Figura 4-21, se puede apreciar

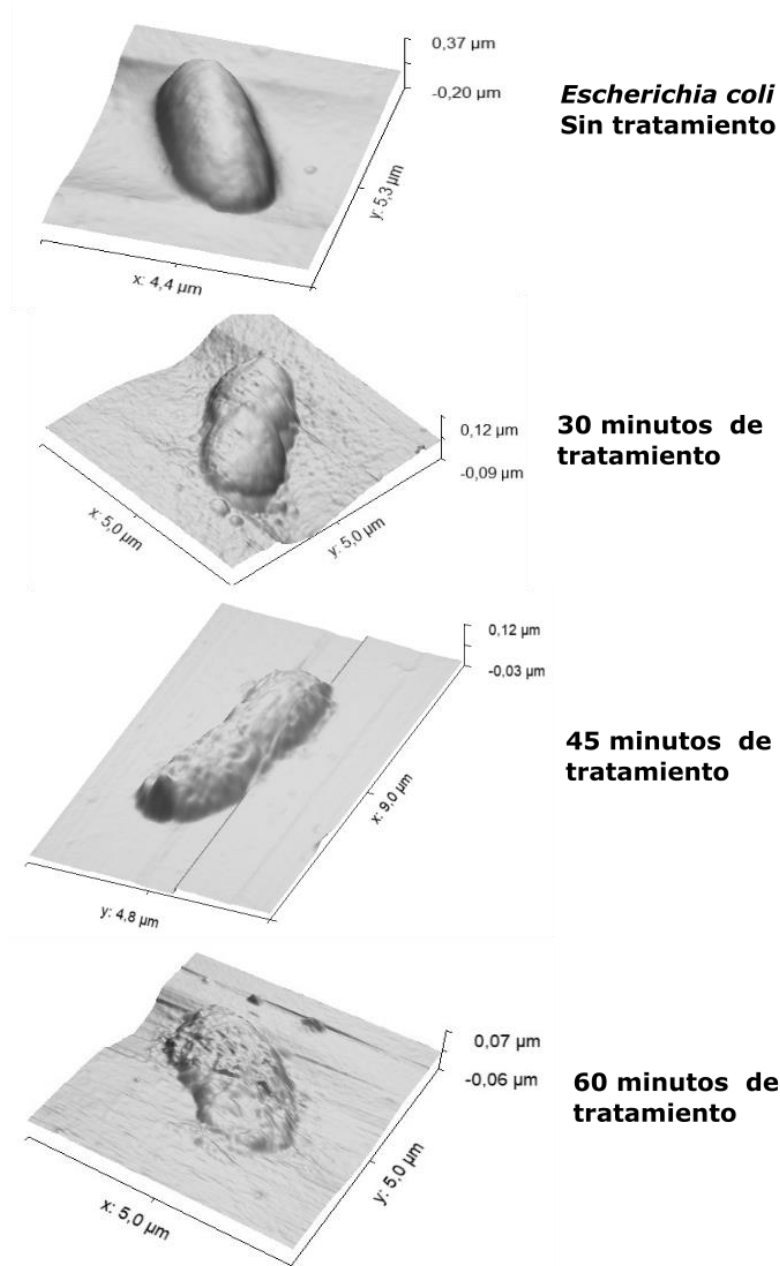
el cambio morfológico y superficial que tiene la célula con el tratamiento. La corrugación de la membrana celular es evidente desde los primeros 30 minutos de contacto, y aunque ninguno de los componentes del CPE intervienen en rutas biosintéticas, el daño superficial es parecido al de los antibióticos betalactámicos mostrado por Laskowski et al., 2018 (358). El cambio morfológico mostrado confirma lo que se ha explicado para *E.coli* previamente en esta investigación, relacionado con la interacción electrostática del CPE con los componentes de la membrana celular y la posterior liberación del AB hacia el interior de la bacteria. La afectación de la *E. coli* que se va evidenciando en función del tiempo, también podría estar relacionada con el control en la liberación del activo, que contribuye a la pérdida de la rigidez y al ablandamiento de la membrana.

Figura 4-20 Imágenes obtenidas por AFM de una célula de *E.coli* sin tratamiento, secada a corriente de aire.



Los cambios de morfología mostrados en la Figura 4-21, sugieren que la alteración de la superficie de la membrana externa de la bacteria causa cambios en las propiedades mecánicas de la superficie, específicamente en la rugosidad. Los resultados de las imágenes planas obtenidas de AFM, fueron analizadas para calcular el R_a de la distribución de los picos en una línea recta (1 μ m) dentro de la célula bacteriana.

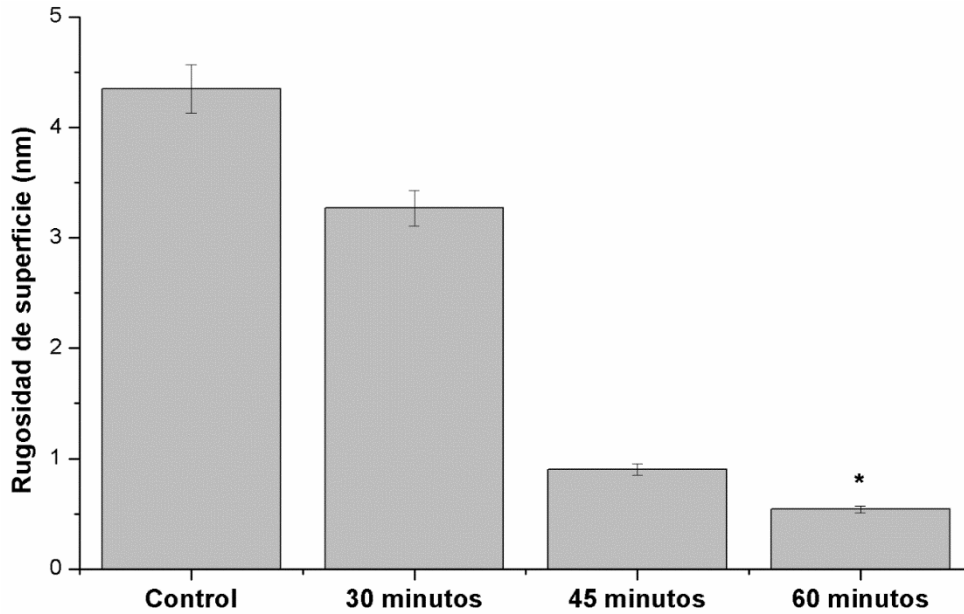
Figura 4-21 Imágenes AFM de *E. coli*, antes y después del tratamiento con $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$ a 37°C y pH 6,9.



En la Figura 4-22, se presentan los resultados de la R_a en los intervalos de tiempo evaluados, observándose una fuerte disminución en la rugosidad que fue progresiva en el tiempo. Algunos estudios han demostrado un comportamiento contrario al presentado en este estudio, es decir el aumento de la rugosidad cuando la *E. coli* ha sido expuesta a sustancias que alteran la morfología (356,359). Este último comportamiento ha sido característico de compuestos que intervienen en rutas biosintéticas de la membrana citoplasmática modificando la estructura de los lipopolisacáridos (bacterias gram negativa). Esta modificación altera el tránsito normal de nutrientes y otras moléculas, conduciendo a un ablandamiento y adhesividad de la membrana junto con un cambio evidente de la morfología, intensificando las fuerzas de adhesión de la membrana con la punta del AFM, resultando así un aumento de la rugosidad de la superficie (358).

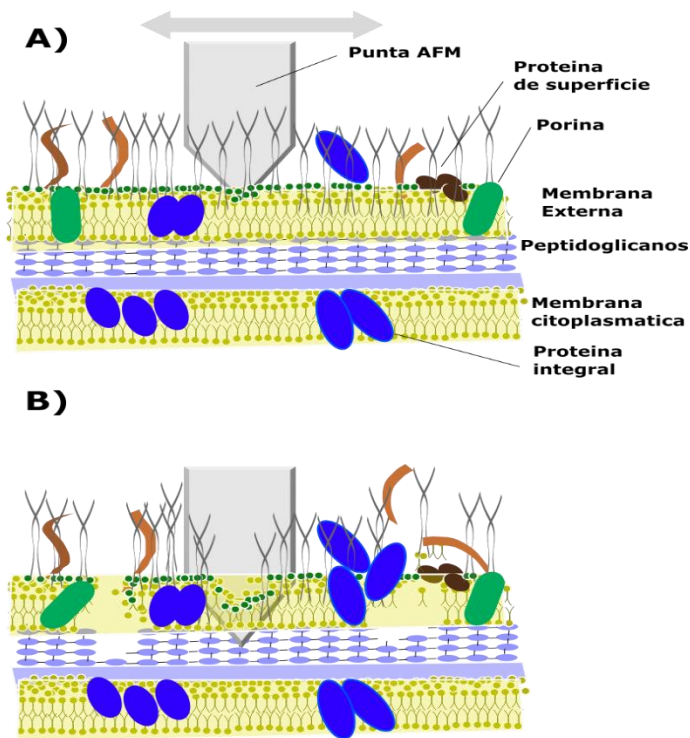
En el caso de esta investigación, la neutralización como fenómeno de interacción electrostática, fue evidenciado con el cambio de potencial ζ cuando la *E.coli* estuvo en contacto con el CPE (ver sección 4.5.4). Esta neutralización de las cargas de superficie en la bacteria por parte del CPE causan que la red de la membrana celular pierda su fuerza, lo que sumado a la metodología de preparación de las bacterias (secado en flujo de aire), hace que la membrana se haga más blanda. Paralelamente la fuerza de adhesión entre la punta del sonda del AFM con la bacteria disminuye, posiblemente debido a la interacción del CPE con los lipopolisacáridos de la membrana y no con la punta de la sonda; un comportamiento similar fue descrito por Soon et al., 2011 (360). Como resultado, la punta de la sonda del microscopio de fuerza atómica penetra más fácil la superficie de la bacteria, y no encuentra picos de distorsión topográfica ni fuerzas de adhesión que aumenten la R_a . Esto se representa en la Figura 4-23.

Figura 4-22 Análisis de la rugosidad promedio (R_a) de las células de *E.coli* tratadas y no tratadas con el CPE $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$ a pH 6,9.



* El cambio en R_a de la superficie a los 60 min, fue estadísticamente significativo con respecto al control.

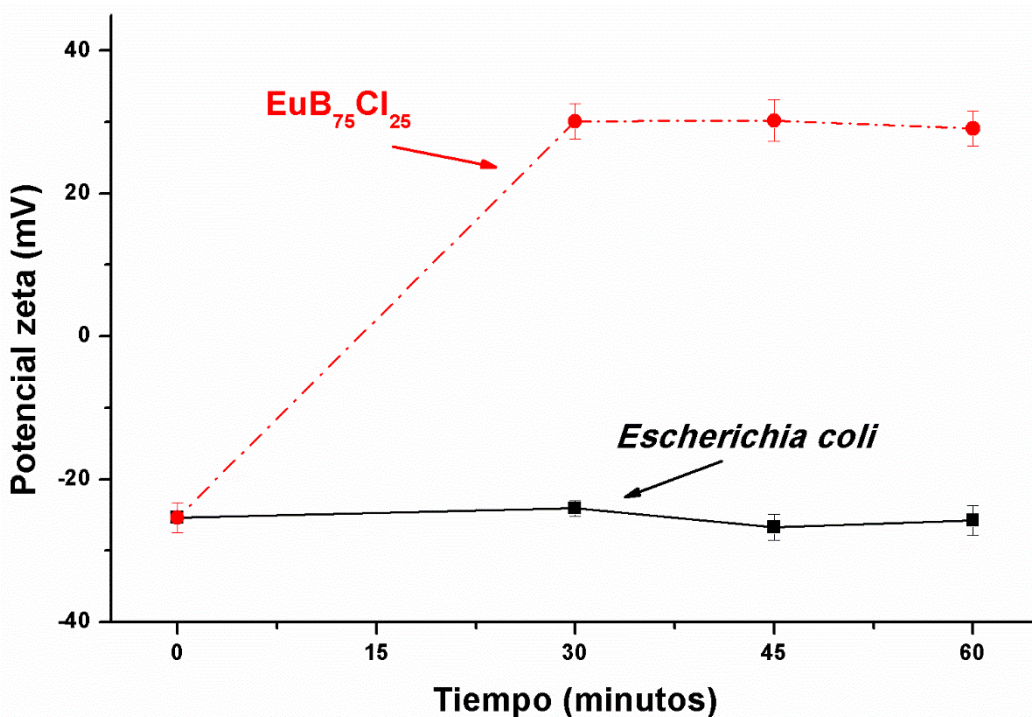
Figura 4-23 Representación esquemática de la interacción de una punta de AFM con una célula bacteriana sin tratamiento A) y después del tratamiento B). (Adaptado de Laskowski, et al., 2018)(358).



4.7.6 Evaluación del potencial ζ de las dispersiones de *E.coli*

De manera similar a lo explicado para los estudios realizados por AFM, se seleccionó al CPE $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$ obtenido por HME, teniendo en cuenta su mejor desempeño en comparación de los demás complejos. La evaluación del potencial ζ de las dispersiones de bacterias de *E. coli* en presencia y ausencia del CPE, se muestran en la Figura 4-24. Se evidencia el potencial ζ negativo para las bacterias de *E.coli* en función del tiempo, como era de esperarse. El cambio de la carga superficial de las bacterias, en presencia del CPE en función del tiempo, estaría confirmando la interacción electrostática que se está dando entre el CPE y la superficie de la bacteria, lo que se refleja en una inversión del potencial ζ en sus dispersiones (361). Es importante destacar que esta inversión del potencial ζ se ve aún más favorecida si se considera que el pseudo potencial ζ que mostró la dispersión de este CPE a pH 7,0 (Capítulo 3), fue positivo y el mayor de todos.

Figura 4-24 Efecto del CPE $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$ sobre el potencial ζ de las dispersiones de *Escherichia coli*, en solución tampón de fosfato de potasio 0,5 mM a pH 6,9.



Las dispersiones de *E. coli*, en ausencia de los CPE, presentaron un potencial ζ negativo que estuvo en un rango de -25,4 a -29,4 mV durante los 60 minutos de ensayo, lo que coincide con los estudios realizados por Alves et al., 2010 sobre la perturbación en la superficie de esta bacteria (356). La inversión del potencial ζ de las dispersiones de *E. coli*

en presencia del CPE, es debida a la interacción electrostática de los grupos amino protonados presentes en el complejo con los lipopolisacáridos, fosfolípidos y proteínas de la membrana de *E. coli*, lo que facilita la entrada del AB a la bacteria. De acuerdo con estos resultados, se podría decir que la modificación en la carga y magnitud del potencial ζ de la superficie de la bacteria es el resultado de tal interacción, convirtiéndose este fenómeno en un indicativo de la actividad del CPE como agente antimicrobiano (362).

Los CPEs obtenidos por SD y HME tuvieron actividad antimicrobiana, demostrando que las metodologías de obtención no influyeron en forma cualitativa sobre dicha propiedad. Sin embargo, los resultados encontrados mostraron una mejora considerable en la acción antimicrobiana, en especial para los CPEs obtenidos por HME, posiblemente debido a los cambios en el rearrreglo químico que experimentan los materiales al ser extruidos para formar los CPEs. Desde esta óptica, la metodología de obtención impactó en el comportamiento de algunas propiedades finales de los CPE (solubilidad, $F\text{-}\zeta$, liberación, protonación de grupos) (234,363), que a su vez incidieron en la magnitud de la actividad evidenciada. Finalmente, la mayor proporción de Eu y la generación de un alto $F\text{-}\zeta$ en dispersión, hicieron que el $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$ fuese el CPE de menor CMI entre los sistemas evaluados en los pH 6,0 y 6,9. De este manera, este CPE es el mejor sistema preservante con un mejor espectro de acción que el ácido benzoico, demostrándose por primera vez una acción bactericida de la que carece como molécula sin complejar y una actividad a valores de pH en los que normalmente este ácido no actúa.

4.8 Conclusiones

- Las dispersiones acuosas de todos los CPEs presentaron actividad antimicrobiana frente a *C.albicans*, *E.coli* y *S.aureus* a las concentraciones de 0,6; 0,3; 0,15; 0,075; 0,038 y 0,019% equivalentes en ácido.
- La actividad de los CPEs frente a bacterias Gram negativas como *E. coli* fue mayor en comparación con el comportamiento encontrado frente a bacterias Gram positivas, lo que se atribuye a la variación en la composición de las membranas celulares entre estos grupos de bacterias.
- La actividad antimicrobiana fue dependiente del pH del medio, siendo mayor la actividad a pH 6,0, sin embargo la actividad fungicida y bactericida se mantuvo incluso a pH 6,9.
- La metodología de obtención de los CPEs afectó la actividad antimicrobiana; aquellos complejos obtenidos por HME tuvieron menor CMI y mayor reducción de colonias que los obtenidos por SD, lo que está asociado a las diferencias de cada uno de los materiales al estado sólido que impactaron su comportamiento en dispersión, como lo es su velocidad de liberación.
- El CPE EuB₇₅Cl₂₅ tuvo el mejor desempeño frente a *E.coli*, *S.aureus* y *C.albicans* entre los CPEs evaluados, debido en gran medida al mayor porcentaje de Eu dentro de su composición, lo que favorece la interacción con las macromoléculas de la superficie de la membrana celular.
- La influencia de la composición de los CPEs obtenidos por las dos metodologías, sobre la reducción de colonias bacterianas y de levaduras mostró el siguiente comportamiento de mayor a menor con respecto al tipo de CPE: EuB₇₅Cl₂₅ > EuHB₇₅Cl₂₅ > EuB₁₀₀ > EuHB₁₀₀ > EuAS₇₅Cl₂₅ > EuCl₁₀₀.

- El ionómero EuCl_{100} presentó la menor actividad frente a *C.albicans*, *E.coli* y *S.aureus*, mostrando frente a las bacterias una disminución en el recuento de colonias con la concentración, en contraste con lo ocurrido con la cepa de *C.albicans* en la que la reducción fue independiente de este factor.

- La variación en la morfología de la bacteria *E.coli* en presencia del CPE $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$, confirma el daño generado a la membrana bacteriana en los primeros 60 minutos de contacto cuando se emplea una concentración correspondiente a la CMI a un pH de 6,9, evidenciado por una deformación topográfica de la bacteria cuantificada a través del parámetro mecánico de rugosidad, el cual fue disminuyendo de manera progresiva en función del tiempo.

- La evaluación del potencial ζ de las dispersiones de *E.coli*, cuando estuvieron en contacto con el $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$ a la CMI y a pH 6,9, confirman el principal mecanismo de acción de este tipo de sistemas frente a bacterias Gram negativas, dado por la interacción entre el CPE y la superficie de la bacteria que conlleva a la inversión en la carga y por consiguiente al daño en la membrana bacteriana.

5. Correlación entre las propiedades fisicoquímicas y la actividad antimicrobiana

En el campo de la investigación con compuestos que presentan actividad antimicrobiana, es importante entender la influencia que tienen las propiedades fisicoquímicas sobre dicha actividad y de esta manera, comprender mejor los posibles mecanismos involucrados al ejercer su acción y cómo la variación de estas propiedades repercuten en el desarrollo de nuevos compuestos con este desempeño. En este estudio no se está haciendo referencia a un activo aislado sino a un sistema que incluye un compuesto con esta actividad, por lo cual podría realizarse un análisis similar al planteado.

En este tipo de investigaciones las propiedades fisicoquímicas pueden o no tener alguna relación con la actividad antimicrobiana; por ejemplo, en el estudio de Ebejer et al., 2016 relacionaron las propiedades fisicoquímicas de compuestos con actividad antibacteriana comparándolos con compuestos empleados para otras patologías, mediante un análisis químico-informático (utilizando la base de datos ChEMBL). Concluyeron que para compuestos con actividad antibacteriana sus propiedades fisicoquímicas están alejadas de aquellas relacionadas con otras patologías, sin embargo, tenerlas no significa garantizar la actividad antibacteriana, ya que pueden existir compuestos que actúan por medio de otros mecanismos no ligados a estas propiedades fisicoquímicas. Por tal razón se necesita suficiente información para comprender a gran escala las relaciones entre estas propiedades y la actividad (364). Así mismo, también es posible hacer relaciones un poco más específicas con el mecanismo de acción, para compuestos o sistemas con actividad. En la investigación de Mugumbate y Overington (2015), se evidencian las relaciones entre propiedades como peso molecular, lipofilicidad y polaridad, con los objetivos moleculares de compuestos antibacterianos, permitiendo discriminarlos en categorías de acuerdo con el ligando al que se unen, lo que da un valor agregado al futuro descubrimiento y optimización de un antibacteriano (365).

De esta manera, las posibles relaciones entre las propiedades fisicoquímicas y la actividad antimicrobiana brindan una información primordial para el diseño, desarrollo y producción de compuestos o sistemas con capacidad mejorada. En la Tabla 5-1, a modo de ejemplo, se muestran algunos otros estudios donde se relacionaron las propiedades fisicoquímicas con esta actividad.

Tabla 5-1 Investigaciones en las que se relacionan las propiedades fisicoquímicas con la actividad antimicrobiana.

Compuesto o sistema evaluado	Característica fisicoquímica	Variable de actividad microbiológica	Relación planteada	Referencia
Sulfonamidas	pKa.	CMI	Gráfica Log 1/CMI versus pKa.	Mengellers et al., (1997) (366).
Isotiazolonas fenilsustituidas	Lipofilidad.	CMI	Correlación de Spearman entre CMI y LogP.	Rezaee et al., (2009) (367).
Derivados de la tiazol-1,3,5-triazina	Peso molecular. MiLogP.	CMI	Relación estructura actividad (SAR por sus siglas en inglés).	Singh et al., (2012) (368).
Partículas de óxido de zinc	Tamaño de poro, tamaño de cristal, área de superficie, distribución de tamaño de partícula.	CMI	Gráfica de actividad versus propiedades fisicoquímicas.	Pasquet et al., (2014) (369).
Complejo de poliiones con Polimixina B	Peso molecular del poliion.	UFC/ml	Gráfica de UFC/ml versus tipo de complejo de poliiones (diferentes relaciones).	Insua et al., (2017) (370).
Derivados cuaternarios de la leucina y la metionina	Concentración micelar crítica (CMC por sus siglas en inglés).	CMI	Correlación de Pearson entre CMI y CMC.	Perinelli et al., (2019) (371).

CMI: Concentración mínima inhibitoria

Como se presentó en la Tabla 5-1, las variables cuantitativas asociadas con la actividad antimicrobiana pueden ser la CMI y las UFC, que se relacionan frente a cualquier propiedad fisicoquímica, calculada teóricamente o determinada en el laboratorio. Para establecer las posibles correlaciones entre las variables mencionadas, frecuentemente se hace uso de herramientas estadísticas, además de las relaciones simples, la tabulación en tablas y los gráficos de actividad versus propiedad fisicoquímica.

En cuanto a los métodos estadísticos empleados están: las correlaciones de Pearson, Spearman, de rango de Kendall, bicor, de la distancia, porcentual de curvatura, policórica, entre otras (372). El correcto uso del coeficiente de correlación depende del tipo de variable estudiada, para las relaciones entre actividad y propiedades fisicoquímicas puede emplearse el método de correlación de Pearson. Este es uno de los más utilizados, y se calcula a través de la Ecuación 5-1, en donde SD_x y SD_y corresponden a la desviación estándar de las variables X y Y, respectivamente, y $cov(x,y)$ a la covarianza normalizada entre X y Y (373).

$$\text{Coeficiente de correlación de Pearson } (r_{xy}) = \frac{cov(x,y)}{(SD_x) * (SD_y)} \quad (5-1)$$

Una de las características más importantes del r_{xy} es que puede tomar valores desde -1 a +1, indicando la fuerza de relación entre las dos variables aleatorias X y Y. Si r_{xy} es cero, se dice que las variables no están correlacionadas o la correlación no es lineal (puede ser cuadrática, exponencial, etc.); también se podría decir que son independientes. Cuanto más cercano es el valor de r_{xy} a 1, más fuerte es la correlación entre las dos variables. El signo positivo del r_{xy} indica una relación directa ya que a un mayor valor de la variable X corresponderá un mayor valor de la variable Y. Cuando el signo es negativo denota una relación inversa, en este caso a un menor valor de la variable X corresponderá un mayor valor de la variable Y (374). Cuando se evalúan dos variables que están correlacionadas, esta correlación puede deberse a diversas razones como son (375):

- a) que la variable X inflencie o cause Y,
- b) que la variable Y inflencie o cause X,
- c) que las variables X e Y estén influenciadas por terceras variables que las modifiquen a ambas a la vez.

Por consiguiente, la interpretación de los resultados debe ser lo más estricta posible para evitar caer en inferencias erróneas.

5.1 Metodología

Para establecer las correlaciones entre las propiedades fisicoquímicas y la actividad antimicrobiana de los CPEs, obtenidos por extrusión por fusión y secado por aspersión, se realizó una selección previa de las variables evaluadas en los Capítulos 3 y 4. Esta selección se enfocó principalmente en la inspección de los resultados de las variables antimicrobianas y de las variables fisicoquímicas, considerando las condiciones en las que se obtuvo cada uno de los resultados.

Una vez seleccionadas las variables, se procedió a realizar las correlaciones construyendo las gráficas de la actividad antimicrobiana versus la propiedad fisicoquímica, a las que se les calculó la regresión lineal y el coeficiente de correlación de Pearson (r_{xy}). A este último, se le categorizó la fuerza de la relación entre las variables y se le realizó el análisis estadístico para establecer su significancia. Para las gráficas en las que se relacionó la propiedad fisicoquímica frente a las UFC, cuya correlación de Pearson fue alta y con significancia estadística, se incluyeron en el documento.

5.2 Presentación y discusión de los resultados

5.2.1 Selección de las variables de la actividad antimicrobiana

Se eligieron como variables las dos evaluadas: la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la reducción logarítmica de unidades formadoras de colonias (UFC). Los resultados empleados corresponden a los presentados en el Capítulo 4, en las Tablas 4-11, 4-13, 4-14, 4-2, 4-3, 4-5, 4-6, 4-7 y 4-8, evaluados a los valores de pH 6,0 y 6,9 y empleando las dos metodologías de obtención (secado por aspersion y extrusión por fusión).

5.2.2 Selección de las variables fisicoquímicas

De las variables fisicoquímicas presentadas en el Capítulo 3, se eligieron aquellas de magnitud cuantitativa, la cuales fueron:

- Temperatura de transición vítrea (T_g) para DSC (Figura 3-8).
- Porcentaje de protonación de los CPEs (Tabla 3-6).
- Cantidad máxima de ácido aceptada en agua (en porcentaje de ácido) (S_o) (Tabla 3-12).
- Pseudo potencial zeta ($F-\zeta$) de las dispersiones de los CPEs (Tomados de las Figuras 3-24 a 3-28).
- Porcentaje de ácido liberado por los CPEs en el punto final (Tablas 3-22 y 3-25).
- Constante de liberación de Higuchi (K_H) (Tablas 3-22 y 3-25).

Determinación de las correlaciones

Los resultados de las correlaciones se dividieron en dos partes que corresponden a las relaciones con la CMI y con el factor UFC.

Parte 1

En esta parte se presentan las relaciones entre la CMI y las variables fisicoquímicas de los CPEs obtenidos por SD y HME. En las Tablas 5-2 y 5-3, se ilustran las ecuaciones y el r^2 de la regresión lineal entre las variables mencionadas, en las que se evidencia una baja

relación directa, solo para seis casos se tuvo un $r^2 > 0,7$ (valores señalados en negrilla en las Tablas 5-2 y 5-3).

Tabla 5-2 Ecuaciones y el r^2 de la regresión lineal entre la CMI para cada uno de los microorganismos evaluados y las variables fisicoquímicas, de los CPEs obtenidos por SD.

	pH 6,0			pH 6,9	
	Variable FQ	Ecuación	r^2	Ecuación	r^2
<i>E.coli</i>	Tg	$y=0,024x-0,0015$	0,2540	$y=-0,0019x+0,3089$	0,1449
	So	$y=0,013x-0,1574$	0,2086	$y=0,0019x-0,2409$	0,4380
	% Protonación	$y=0,019x+0,0760$	0,0158	$y=-0,0082x+0,4455$	0,2780
	$F-\zeta$	$y=0,0137x-0,0394$	0,3501	$y=-0,017x+0,3341$	0,2614
	% Liberación	$y=-0,0016x +0,2565$	0,0530	$y=0,0082x-0,4578$	0,2417
	K_H	$y=-0,0302x+0,9960$	0,5276	$y=-0,0138x+0,5497$	0,0628
<i>S.aureus</i>	Tg	$y=0,0015x-0,0103$	0,6004	$y=-0,0039x+0,3864$	0,7492
	So	$y=0,0007x-0,0529$	0,3447	$y=-0,0001x+0,1782$	0,0022
	% Protonación	$y=0,047x-0,0415$	0,5526	$y=-0,0122x+0,5307$	0,7467
	$F-\zeta$	$y=0,0036x+0,0591$	0,1372	$y=0,0086x+0,0794$	0,0807
	% Liberación	$y=0,0001x+0,0973$	0,0120	$y=0,0108x-0,7113$	0,5049
	K_H	$y=-0,0034x+0,2024$	0,0383	$y=-0,0168x+0,5835$	0,1125
<i>C.albicans</i>	Tg	$y=8e-19x+0,038$	NA	$y=0,001x+0,0017$	0,9422
	So	$y=-0,0005x+0,1727$	0,2977	$y=-3e-5x+0,0641$	0,0027
	% Protonación	$y=-4e-18x+0,038$	NA	$y=0,0013x+0,0211$	0,1615
	$F-\zeta$	$y=0,038$	NA	$y=-0,0013x+0,0839$	0,2446
	% Liberación	$y=0,038$	NA	$y=-0,0028x+0,286$	0,7131
	K_H	$y=0,038$	NA	$y=-0,0039x+0,1612$	0,1254

NA: no aplica; So: cantidad máxima aceptada en agua; FQ: fisicoquímica; K_H : constante de Higuchi; % protonación: del N1s en el CPE; % Liberación : del ácido desde el CPE; Tg: Temperatura de transición vítrea. Nota: las unidades de la ecuación no fueron incluidas para efectos prácticos.

Tabla 5-3 Ecuaciones y el r^2 de la regresión lineal entre la CMI para cada uno de los microorganismos evaluados y las variables fisicoquímicas, de los CPEs obtenidos por HME.

	pH 6,0			pH 6,9	
	Variable FQ	Ecuación	r^2	Ecuación	r^2
Tg	$y=0,0033x-0,0987$	0,5633	$y=0,0027x-0,0601$	0,4541	
So	$y=-0,0006x+0,2025$	0,1823	$y=-0,0006x+0,199$	0,1995	

<i>E.coli</i>	% Protonación	$y=0,0044x-0,0394$	0,3099	$y=0,0033x-0,0065$	0,2144
	$F-\zeta$	$y=-0,0052x+0,1625$	0,5293	$y=-0,0033x+0,1158$	0,2267
	% Liberación	$y=-0,0039x+0,3668$	0,7945	$y=-0,003x +0,3272$	0,6566
	K_H	$y=-0,0183x+0,5995$	0,6224	$y=-0,0059x+0,2504$	0,1796
	Tg	$y=0,0014x+0,0807$	0,0377	$y=0,0005x+0,1393$	0,0064
<i>S.aureus</i>	So	$y=-0,0009x+0,3578$	0,1578	$y=-0,0012x+0,4301$	0,3210
	% Protonación	$y=-0,0006x +0,1651$	0,0024	$y=-0,0019x +0,2109$	0,0278
	$F-\zeta$	$y=-0,0076x+0,2935$	0,4354	$y=-0,0012x+0,181$	0,0191
	% Liberación	$y=-0,0038x+0,4421$	0,2806	$y=-0,0014x+0,2836$	0,0526
	K_H	$y=-0,01x+0,44370$	0,0707	$y=0,0044x+0,0321$	0,3690
<i>C.albicans</i>	Tg	$y=0,0014x+0,0087$	0,1258	$y=0,0014x+0,0807$	0,0377
	So	$y=-0,0009x+0,2655$	0,5172	$y=-0,0009x+0,3578$	0,1578
	% Protonación	$y=0,0006x+0,0456$	0,0078	$y=-0,0006x +0,1651$	0,0024
	$F-\zeta$	$y=0,0002x+0,0581$	0,0002	$y=0,008x+0,0479$	0,1372
	% Liberación	$y=-0,003x+0,2900$	0,5830	$y=-0,0025x+0,3613$	0,1337
	K_H	$y=-0,0075x+0,2798$	0,1328	$y=-0,0012x+0,1854$	0,0021

NA: no aplica; So: cantidad máxima aceptada en agua; FQ: fisicoquímica; K_H : constante de Higuchi; % protonación: del N1s en el CPE; % Liberación : del ácido desde el CPE; Tg: Temperatura de transición vítrea. Nota: las unidades de la ecuación no fueron incluidas para efectos prácticos.

Al analizar el porcentaje de liberación del ácido frente a la CMI, para *E.coli* y *C.albicans*, se encontraron relaciones negativas (pendiente negativa) cuando los CPEs se obtuvieron por HME (frente a *E.coli*) y por SD (frente a *C.albicans*). En el primer caso a pH 6,0, el r^2 fue de 0,7945, el cual disminuyó cuando el pH fue de 6,9 (r^2 : 0,6566); para los CPEs obtenidos por SD a pH 6,9 el r^2 fue de 0,7131. Los resultados frente a *E. coli* concuerdan con lo discutido en el Capítulo 4, en donde los CPEs obtenidos por HME mostraron un mejor desempeño sobre la inhibición de las bacterias.

Cuando se relacionó la CMI de la *C.albicans* y *S.aureus* (pH 6,9) frente a la Tg de los CPEs obtenidos por SD, los r^2 de las correlaciones lineales fueron mayores de 0,7 (r^2 :0,9422 y r^2 :0,7492, respectivamente). Frente a la *C.albicans* la relación fue alta porque la CMI fluctuó solo entre dos valores extremos (0,038 y 0,075), que formaron dos grupos, para los cuales una línea recta se ajustó fácilmente; a pesar de la buena correlación, no se considera confiable para indicar una relación directa entre las variables. Algo similar se presentó para la relación de la CMI del *S.aureus* frente al porcentaje de protonación de los CPEs obtenidos por SD, a pH 6,9, en la que los resultados de la CMI también varían entre dos grupos de valores (0,015 y 0,075). Adicionalmente, para algunas de las relaciones se evidenció poca variabilidad de la CMI, lo que hace que el r^2 de la correlación lineal no se pueda calcular (no

hay una relación entre las dos variables); un ejemplo de esto fue lo encontrado para las relaciones de la CMI de los CPEs obtenidos por SD y las correspondientes variables fisicoquímicas a pH 6,0.

Cabe resaltar, que la regresión lineal entre dos variables depende de sus unidades, pudiendo esto influir en la conclusión dada sobre la relación investigada, por lo tanto, el grado de linealidad encontrado debe ser complementado con otro estadístico que no dependa de estas unidades, como es el coeficiente de Pearson. Estos coeficientes son categorizados según la fuerza con la que estén relacionadas las variables, y se pueden interpretar de acuerdo con lo propuesto por Chan et al., 2003 (376,377), de la siguiente manera (Tabla 5-4):

Tabla 5-4 Interpretación del coeficiente de correlación de Pearson.

Coeficiente de correlación de Pearson r_{xy}		Fuerza
+ 1,0	- 1,0	Perfecta
+ 0,9	-0,9	Muy fuerte
+ 0,8	-0,8	Muy fuerte
+ 0,7	-0,7	Moderada
+ 0,6	-0,6	Moderada
+ 0,5	-0,5	Regular
+ 0,4	-0,4	Regular
+ 0,3	-0,3	Regular
+ 0,2	-0,2	Pobre
+ 0,1	-0,1	Pobre
0,0	0,0	Ninguna

En la Tabla 5-5, se muestran los coeficientes de correlación de Pearson para cada una de las relaciones de la CMI y las variables fisicoquímicas de los CPEs obtenidos por SD y HME. De acuerdo con lo planteado en la Tabla 5-4, los resultados indican relaciones muy fuertes (señaladas en negrilla en la Tabla 5-5), para el porcentaje de liberación de ácido frente a la CMI de *E.coli*, cuando los CPEs se obtuvieron por HME, a los dos pHs. Por otra parte, la Tg también tuvo una relación muy fuerte frente a la CMI de *S.aureus* y *C.albicans*, a pH 6,9, cuando los CPEs fueron obtenidos por SD. Las dos correlaciones mencionadas evidencian que los resultados también están influenciados por la metodología empleada en la obtención de los CPEs. El comportamiento de estas relaciones cambia cuando los coeficientes se determinan a varios pHs y con diferentes cepas, lo que posiblemente está relacionado con la poca variabilidad de la CMI para cada uno de los CPEs, cuando se considera una misma variable fisicoquímica.

Tabla 5-5 Coeficientes de correlación de Pearson entre la CMI y las variables fisicoquímicas de los CPEs obtenidos por SD y HME, para los microorganismos en estudio a los pH 6,0 y 6,9.

		pH 6,0			pH 6,9		
		<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>C.albicans</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>C.albicans</i>
SD	Tg	0,504	0,775	NA	-0,381	-0,866	0,971*
	So	0,457	0,587	NA	0,662	-0,047	-0,052
	% Protonación	0,126	0,743	NA	-0,527	-0,864	0,402
	<i>F-ζ</i>	0,592	0,370	NA	-0,511	0,284	-0,495
	% Liberación	-0,230	0,035	NA	0,492	0,711	-0,844
	K_H	-0,726	-0,196	NA	-0,251	-0,335	-0,354
	<hr/>						
HME	Tg	0,751	0,194	0,355	0,674	0,080	0,194
	So	-0,427	-0,397	-0,719	-0,447	-0,567	-0,397
	% Protonación	0,557	-0,049	0,088	0,463	-0,167	-0,049
	<i>F-ζ</i>	-0,728	-0,660	0,015	-0,476	-0,105	0,370
	% Liberación	-0,891*	-0,530	-0,764	-0,810	-0,229	-0,366
	K_H	-0,789	-0,266	-0,364	-0,424	0,192	-0,046

NA: no aplica; So: cantidad máxima aceptada en agua; FQ: fisicoquímica; K_H : constante de Higuchi; % protonación: del N1s en el CPE; % Liberación : del ácido desde el CPE; Tg: Temperatura de transición vítrea; *: correlaciones con significancia estadística ($p < 0,05$).

Para los CPEs obtenidos por HME, específicamente con las variables fisicoquímicas pseudo potencial zeta, porcentaje de liberación y la constante de liberación de Higuchi, frente a la bacteria *E.coli*, un aumento de estas propiedades disminuye la CMI a pH 6,0 y 6,9, lo que concuerda con lo discutido en el Capítulo 4, relacionado con la interacción electrostática con la membrana celular.

De todas las correlaciones mostradas en la Tabla 5-5 solo dos tuvieron significancia estadística ($p < 0,05$): el porcentaje de liberación de ácido desde los CPEs obtenidos por HME a pH 6,0 frente a la CMI de la *E.coli* ($r_{xy} = -0,891$), y la temperatura de transición vítrea de los CPEs obtenidos por SD a pH 6,9 frente a la CMI de la *C.albicans* ($r_{xy} = 0,971$).

En cuanto al porcentaje de liberación del ácido desde el CPE, esta relación se sustenta en que habrá mayor cantidad de ácido disponible lo que favorece la inhibición del crecimiento de los microorganismos. La alta correlación de la Tg y la CMI para los CPEs obtenidos por SD frente a *C.albicans* a pH 6,9, como ya se mencionó, posiblemente es debida a la variación de la CMI en dos valores extremos posibilitando la correlación entre los grupos de datos.

Al observar los resultados de manera global, se evidencia una tendencia a la linealidad para muchas de las correlaciones, sin embargo, no todas tienen significancia estadística. Se sugiere que las correlaciones que fueron muy fuertes, pero no presentaron significancia estadística, podrían tenerla en la medida en la que se cuente con una mayor cantidad de datos para hacer la correlación.

Parte 2

Como se indicó en la metodología, en esta sección se relacionaron la reducción de las unidades formadoras de colonias con las variables fisicoquímicas seleccionadas. En las Tablas 5-6 y 5-7, se muestran las ecuaciones de las regresiones lineales dadas entre las variables mencionadas, discriminando por pH y por metodología de obtención. Los resultados evidencian que hubo diferencias importantes entre ellos, encontrando valores de coeficientes de correlación lineal (r^2), en su mayoría menores de 0,7 (en las Tablas 5-6 y 5-7 se resaltan en negrilla los valores mayores a 0,7) y se destacan dos propiedades que tuvieron un coeficiente de correlación mayor a este valor, correspondientes a la constante de liberación de Higuchi (K_H) y al pseudo potencial zeta, para algunas condiciones específicas de pH, microorganismo y metodología.

Tabla 5-6 Ecuaciones y el r^2 de la regresión lineal entre la reducción UFC para cada uno de los microorganismos evaluados y las variables fisicoquímicas, de los CPEs obtenidos por SD.

	pH 6,0			pH 6,9	
	Variable FQ	Ecuación	r^2	Ecuación	r^2
<i>E.coli</i>	Tg	$y=-0,0695x +8,759$	0,6258	$y=-0,015x +4,605$	0,0280
	So	$y=0,0034x +5,549$	0,0145	$y=0,005x +2,566$	0,0301
	% Protonación	$y=-0,104x +7,797$	0,4376	$y=0,007x +3,727$	0,0018
	$F-\zeta$	$y=0,097x +3,483$	0,4783	$y=0,104x +0,249$	0,4621
	% Liberación	$y=0,067x +0,165$	0,5879	$y=0,029x +1,436$	0,1243
	K_H	$y=0,401x -6,426$	0,7616	$y=0,054x +2,236$	0,0315
<i>S.aureus</i>	Tg	$y=-0,039x +4,179$	0,3655	$y=-0,009x +1,546$	0,0798
	So	$y=0,010x +0,113$	0,1200	$y=-0,0015x +1,451$	0,0222
	% Protonación	$y=-0,051x +3,427$	0,1862	$y=-0,008x +1,323$	0,0238
	$F-\zeta$	$y=0,098x +0,379$	0,8827	$y=0,042x +0,558$	0,6359
	% Liberación	$y=0,054x -1,900$	0,6843	$y=0,0,1x +0,271$	0,1262

	K_H	$y=0,275x -5,813$	0,6481	$y=0,049x -0,386$	0,2202
	Tg	$y=0,061x +3,501$	0,1120	$y=0,058x + 5,907$	0,0982
	So	$y=0,018x +2,566$	0,0900	$y=-0,012x +5,664$	0,0384
C.albicans	% Protonación	$y=0,089x +4,383$	0,0752	$y=-0,071x +4,713$	0,0455
	F- ζ	$y=-0,220x +10,638$	0,5763	$y=0,300x -1,004$	0,8368
	% Liberación	$y=0,052x +10,498$	0,0836	$y=0,008x -3,590$	0,1971
	K_H	$y=-0,592x +23,829$	0,3916	$y=0,342x -7,415$	0,2742

So: cantidad máxima aceptada en agua; FQ: fisicoquímica; K_H : constante de Higuchi; % protonación: del N1s en el CPE; % Liberación : del ácido desde el CPE; Tg: Temperatura de transición vítrea. Nota: las unidades de la ecuación no fueron incluidas para efectos prácticos.

Tabla 5-7 Ecuaciones y el r^2 de la regresión lineal entre la reducción logarítmica de las UFC para cada uno de los microorganismos evaluados y las variables fisicoquímicas, de los CPEs obtenidos por HME.

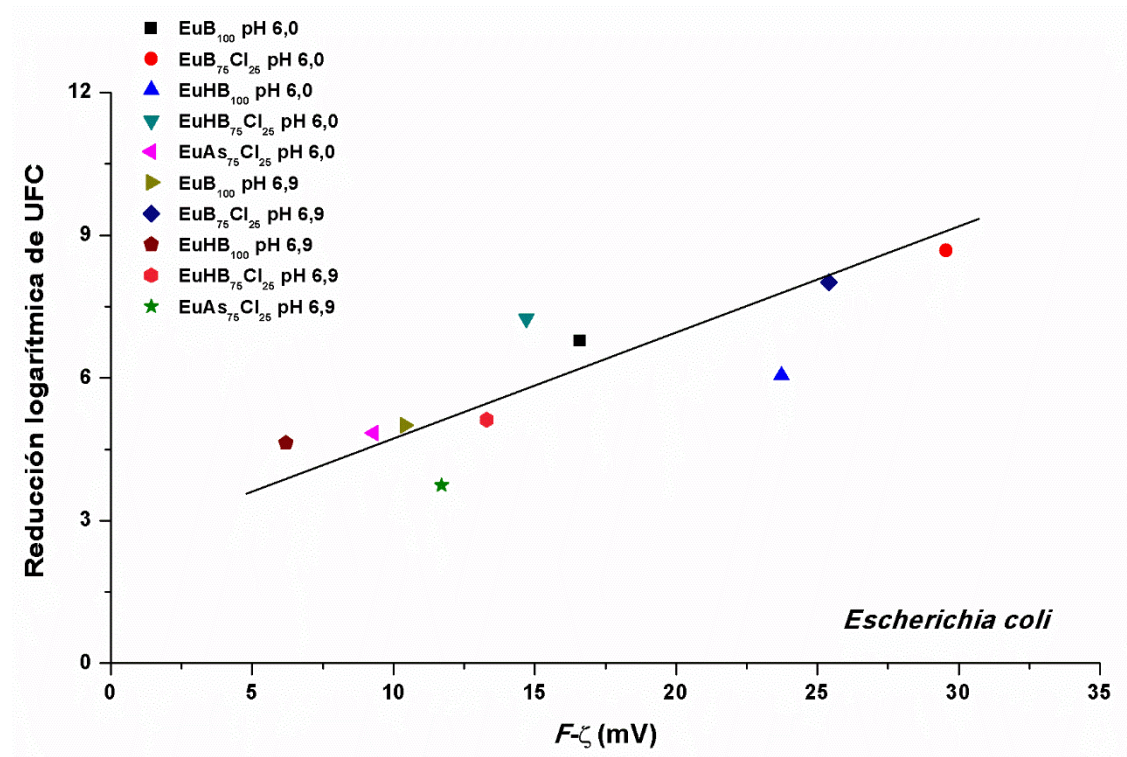
		pH 6,0		pH 6,9	
Variable FQ		Ecuación	r^2	Ecuación	r^2
E.coli	Tg	$y=-0,046x +8,792$	0,1660	$y=-0,053x +7,902$	0,1732
	So	$y=0,003x +6,103$	0,0076	$y=-0,032x +6,005$	0,0059
	% Protonación	$y=-0,046x +3,09$	0,0517	$y=-0,064x +6,827$	0,0803
	F- ζ	$y=0,133x +4,230$	0,5457	$y=0,197x +2,664$	0,7803
	% Liberación	$y=0,060x +2,110$	0,2611	$y=0,065x -0,244$	0,3011
	K_H	$y=0,320x -2,650$	0,2995	$y=0,242x -2,086$	0,2984
S.aureus	Tg	$y=-0,013x +3,937$	0,0379	$y=-0,010x +2,011$	0,0783
	So	$y=0,011x +0,831$	0,2417	$y=0,00x +0,647$	0,1165
	% Protonación	$y=0,008x +3,089$	0,0041	$y=-0,003x + 1,597$	0,0003
	F- ζ	$y=0,084x +1,705$	0,5774	$y=0,031x +1,110$	0,2420
	% Liberación	$y=0,040x +0,183$	0,3482	$y= 0,014x +0,298$	0,1867
	K_H	$y=0,108x +0,103$	0,0913	$y=0,0197x +0,923$	0,0249
C.albicans	Tg	$y=-0,054x +9,344$	0,1258	$y=-0,021x +3,315$	0,1080
	So	$y=0,036x -1,306$	0,5172	$y=0,003x +2,194$	0,0002
	% Protonación	$y=-0,024x +7,235$	0,0078	$y= -0,002x +2,15$	0,0266
	F- ζ	$y=0,164x +3,586$	0,4457	$y= 0,094x +1,001$	0,6874
	% Liberación	$y= 0,117x -2,257$	0,5830	$y= 0,029x -0,240$	0,2357
	K_H	$y= 0,291x -1,862$	0,1328	$y= 0,094x -0,617$	0,1741

So: cantidad máxima aceptada en agua; FQ: fisicoquímica; K_H : constante de Higuchi; % protonación: del N1s en el CPE; % Liberación : del ácido desde el CPE; Tg: Temperatura de transición vítrea. Nota: las unidades de la ecuación no fueron incluidas para efectos prácticos.

Para las dos propiedades mencionadas, cuando el r^2 fue mayor de 0,7, el aumento en la magnitud de estas conllevó al aumento de la reducción logarítmica de las UFC. Esto

sugiere, que a mayor densidad de carga positiva en el CPE y mayor ácido libre en el medio se produce una disminución importante del crecimiento microbiano. Esta tendencia se mantuvo cuando se relacionó el $F-\zeta$ con la reducción logarítmica de UFC para *E.coli*, en las dos condiciones de pH empleadas para todos CPEs obtenidos por HME, ($r^2 = 0,7$) (Figura 5-1). Como se ha explicado anteriormente la interacción electrostática entre las cargas positivas del amonio cuaternario, y la membrana celular de la bacteria tiene un efecto sobre la actividad antimicrobiana (378), que se evidencia principalmente frente a la *E.coli* debido a su superficie cargada negativamente. En la medida en que el CPE exhibe mayor cantidad de cargas la correlación con la reducción de UFC es positiva.

Figura 5-1 Influencia del pseudo potencial zeta ($F-\zeta$) de las dispersiones de los CPEs obtenidos por HME en la reducción logarítmica de las UFC de *E.coli* a pH 6,0 y 6,9.



En la Tabla 5-8, se presentan los resultados de los coeficientes de correlación de Pearson para las relaciones entre la reducción logarítmica de UFC de los microorganismos empleados y las variables fisicoquímicas evaluadas a los CPEs, obtenidos por HME y SD (en esta Tabla se resaltaron en negrilla las relaciones fuertes). Las variables Tg, So y porcentaje de protonación, presentaron correlaciones desde moderadas hasta ninguna correlación, para las dos metodologías de obtención. Esto podría estar relacionado con que la Tg y el

porcentaje de protonación, al ser propiedades que miden un cambio en el estado sólido y no en dispersión, no ejercen impacto directo sobre la actividad antimicrobiana. El efecto de la variable So no se observó en la reducción de colonias, dado que todos los CPEs evaluados fueron solubles en agua a los pHs evaluados.

Para las variables $F-\zeta$, porcentaje de liberación y K_H la correlación fue positiva, (con excepción de *C.albicans* a pH 6,0 en SD, donde fue negativa para las tres variables). Las dos variables asociadas a la liberación de ácido al medio (porcentaje de liberación y K_H), mostraron una fuerza de relación desde pobre a muy fuerte. Se mantuvo la tendencia de que, a mayor velocidad de liberación del ácido mejor es el efecto antimicrobiano, relacionado con la disponibilidad del agente preservante libre en solución que facilita su ingreso a la célula. En el caso específico de la variable $F-\zeta$, los resultados de correlación variaron desde regulares hasta muy fuertes, siendo esta la variable fisicoquímica con mejor ajuste entre las evaluadas. Como se ha venido mencionando a lo largo de esta investigación, la interacción por cargas es el principal mecanismo involucrado que favorece el paso del preservante a través de la membrana del microorganismo, especialmente cuando hay cargas negativas en su superficie. De esta manera, se presenta una relación directa entre $F-\zeta$ y la actividad antimicrobiana, por lo que las cargas positivas del CPE son facilitadoras de la entrada de los compuestos ácidos con esta actividad, mediante la disrupción de los procesos metabólicos de la membrana celular (292,379,380).

Tabla 5-8 Coeficientes de correlación de Pearson entre la reducción logarítmica de las UFC y las variables fisicoquímicas de los CPEs obtenidos por SD y HME, para los microorganismos de estudio a los pH 6,0 y 6,9.

		pH 6,0			pH 6,9		
		<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>C.albicans</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>C.albicans</i>
SD	Tg	-0,791	-0,605	0,335	-0,167	-0,282	-0,313
	So	-0,661	-0,431	0,274	0,043	-0,154	-0,213
	% Protonación	0,120	0,447	0,300	0,173	-0,149	-0,196
	$F-\zeta$	0,692	0,940*	-0,759	0,680	0,797	0,915*
	% Liberación	0,767	0,827	-0,289	0,353	0,355	0,444
	K_H	0,873	0,805	-0,626	0,177	0,469	0,524
HME	Tg	-0,407	-0,195	-0,355	-0,416	-0,280	-0,329
	So	-0,227	0,064	-0,088	-0,283	-0,050	-0,163
	% Protonación	0,087	0,492	0,719	-0,077	0,341	0,015
	$F-\zeta$	0,739	0,760	0,668	0,883*	0,492	0,829
	% Liberación	0,540	0,590	0,764	0,549	0,432	0,485
	K_H	0,547	0,302	0,364	0,546	0,158	0,471

So: cantidad máxima aceptada en agua; FQ: fisicoquímica; K_H : constante de Higuchi; % protonación: del N1s en el CPE; % Liberación : del ácido desde el CPE; Tg: Temperatura de transición vítrea. *: Significancia estadística ($p < 0,05$).

De todos los coeficientes mostrados en la Tabla 5-8, solo tres tuvieron una correlación estadísticamente significativa con un $p < 0,05$. Estos coeficientes fueron 0,940, 0,915 y 0,883, que corresponden a las relaciones de $F-\zeta$ con la reducción de UFC de *S.aureus*, *C.albicans* y *E.coli* para SD a pH 6,0, SD a pH 6,9 y HME a pH 6,9, respectivamente (Figuras 5-2, 5-3 y 5-4). Estos resultados confirman la causalidad de la correlación para la variable $F-\zeta$ con la reducción logarítmica de UFC, e incluso la significancia de la correlación es independiente del pH empleado, con excepción de la *C.albicans* para los CPEs obtenidos por SD (Tabla 5-9).

Tabla 5-9 Coeficientes de correlación entre el pseudo potencial zeta ($F-\zeta$) y la reducción logarítmica de UFC sin tener en cuenta el pH del medio.

		<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>C.albicans</i>
SD	$F-\zeta$	0,733	0,640	0,271*
		0,836	0,651	0,639

* $p > 0.05$

Los resultados de la Tabla 5-9, ilustran la fuerza de correlación, entre moderada y muy fuerte, del $F-\zeta$ frente a la reducción logarítmica de UFC, alcanzando coeficientes mayores cuando la metodología de obtención fue HME.

Figura 5-2 Influencia del pseudo potencial zeta ($F-\zeta$) de las dispersiones de los CPEs obtenidos por HME en la reducción logarítmica de las UFC de *E.coli* a pH 6,9.

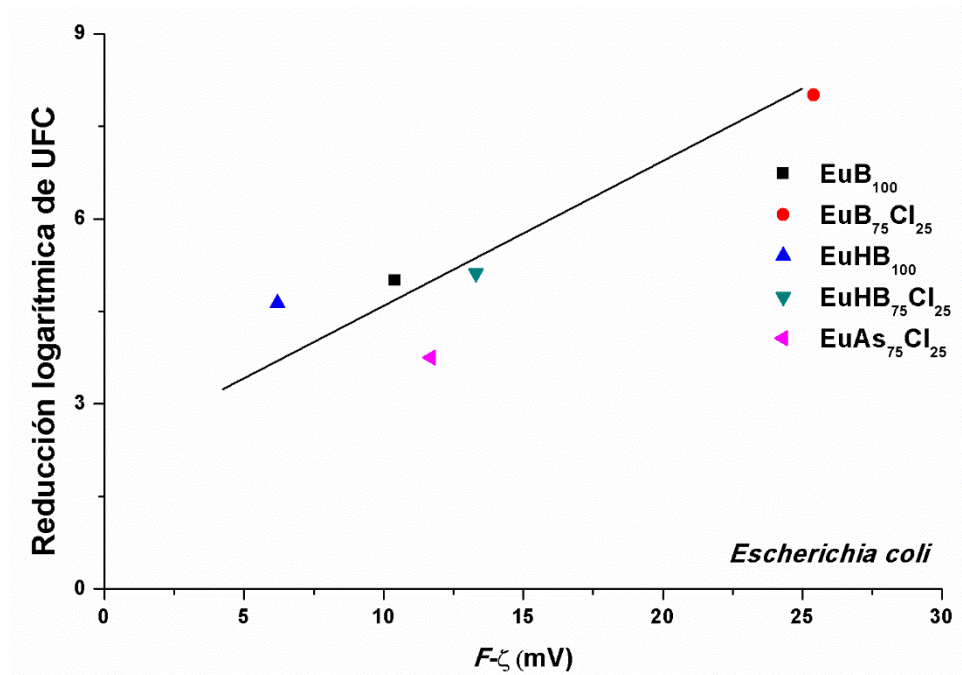


Figura 5-3 Influencia del pseudo potencial zeta ($F-\zeta$) de las dispersiones de los CPEs obtenidos por SD en la reducción logarítmica de las UFC de *S.aureus* a pH 6,0.

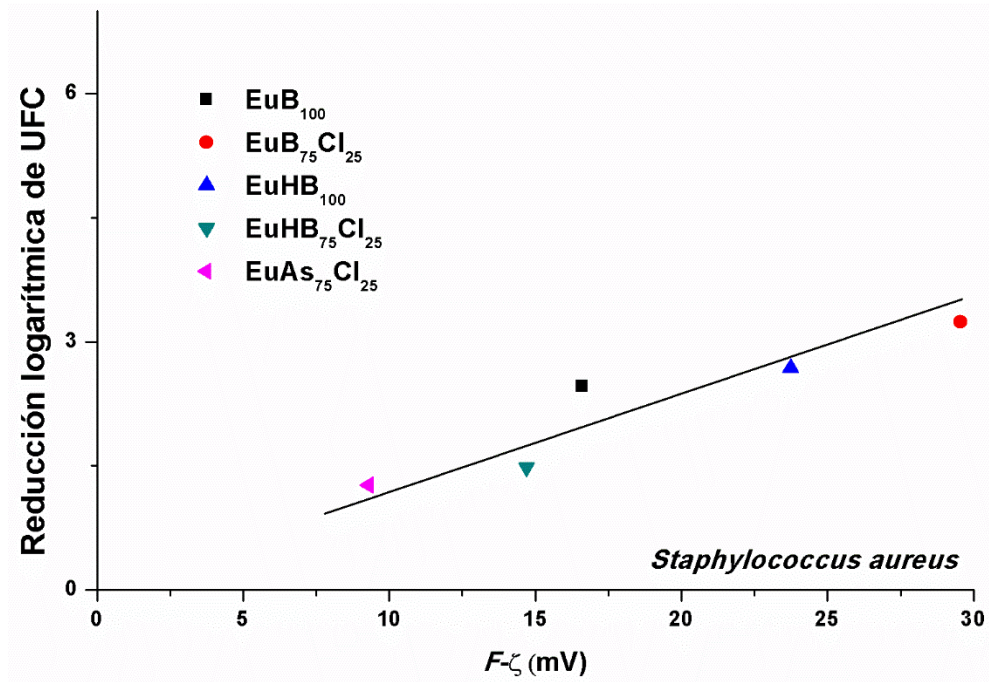
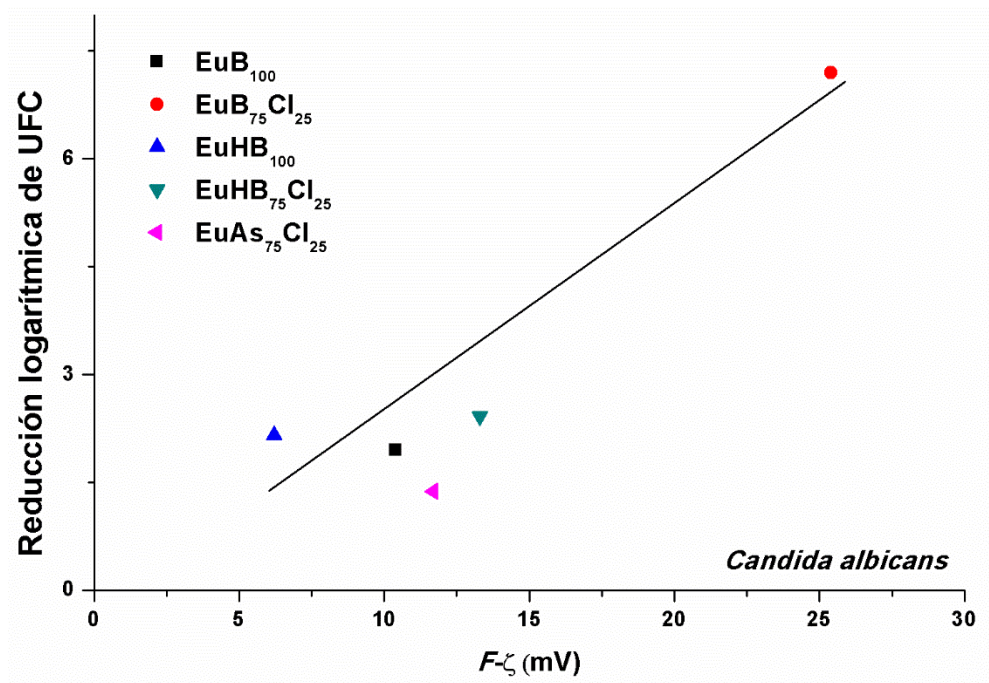


Figura 5-4 Influencia del pseudo potencial zeta ($F-\zeta$) de las dispersiones de los CPEs obtenidos por SD en la reducción logarítmica de las UFC de *C.albicans* a pH 6,9.



Para hacer un análisis final de aquellas variables fisicoquímicas evaluadas en dispersión, que presentaron algún tipo de influencia sobre la actividad antimicrobiana, se construyeron

las Figuras 5-5 y 5-6. Se seleccionaron las variables $F\text{-}\zeta$, K_H y porcentaje de ácido liberado, de los CPEs obtenidos por la metodología de HME. La relación del $F\text{-}\zeta$ con las variables asociadas a la liberación de ácido muestra zonas en donde una alta velocidad de liberación ($34 < K_H > 31$) coincide con un alto $F\text{-}\zeta$ y una alta reducción logarítmica de las UFC (Figura 5-5). No sucede lo mismo, cuando se trata del porcentaje de liberación (Figura 5-6); cuando este porcentaje es alto no coincide con altos valores de $F\text{-}\zeta$ y reducción de UFC, lo que sugiere que la velocidad con que se libere el ácido incide de manera más marcada sobre el crecimiento que la cantidad liberada del activo a partir de este tipo de sistemas.

Figura 5-5 Influencia de las variables $F\text{-}\zeta$ y K_H en la reducción logarítmica de las UFC de *E.coli*, de los CPEs obtenidos por HME.

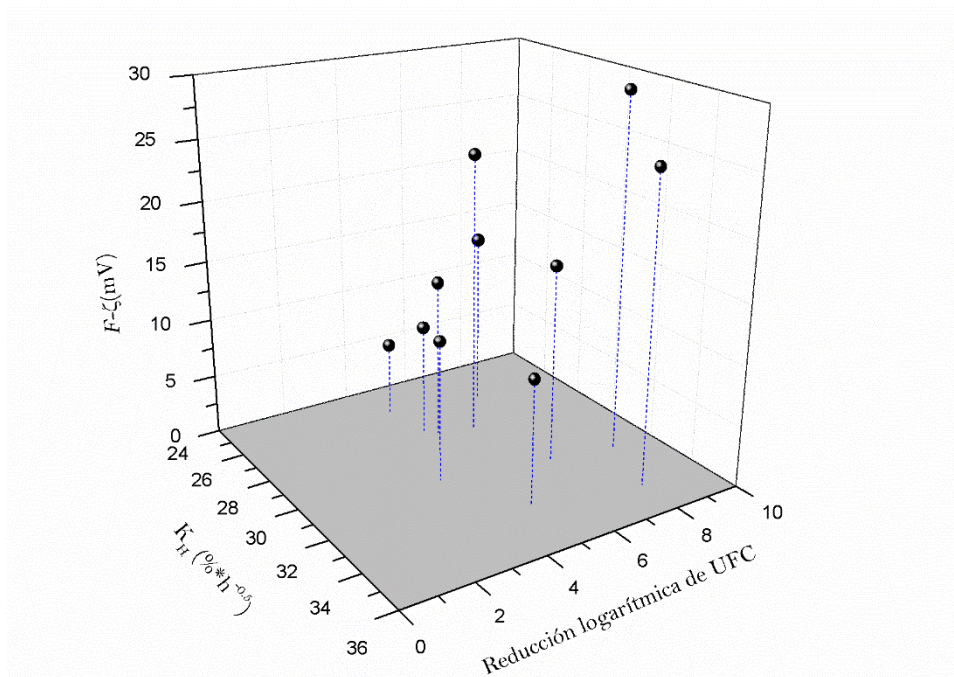
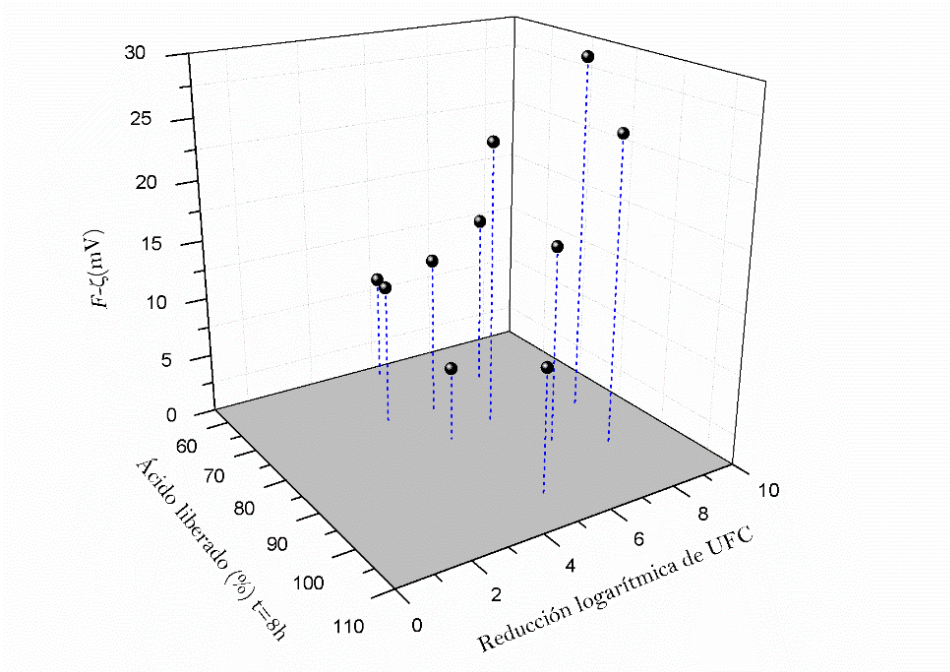


Figura 5-6 Influencia de las variables $F-\zeta$ y el porcentaje de liberación de ácido en la reducción logarítmica de las UFC de *E.coli*, de los CPEs obtenidos por HME.



5.3 Conclusiones

- La correlación lineal entre las variables fisicoquímicas y la CMI obtenida es limitada, en cuanto al efecto de las variables sobre la actividad microbológica, debido principalmente a la escasa variación de la CMI.
- La reducida variabilidad de la CMI dificulta las correlaciones de Pearson entre las variables fisicoquímicas evaluadas para los CPEs, solo siendo significativa la correlación del porcentaje de liberación sobre la CMI *E.coli* a pH 6,0, cuando los CPEs fueron obtenidos por HME.
- Para las variables fisicoquímicas analizadas, T_g , cantidad máxima aceptada en agua, porcentaje de ácido liberado en el punto final, constante de liberación de Higuchi y $F-\zeta$, solo esta última presentó una relación directa y significativa con la reducción logarítmica de las UFC; el origen de esta correlación está dada por la

interacción entre las cargas positivas de los CPEs con las moléculas con carga negativa que están presentes en la membrana celular de *E.coli*, *S.aureus* y *C.albicans*.

- El $F\text{-}\zeta$ de las dispersiones de los CPEs obtenidos por HME y SD afecta de manera positiva la reducción de la UFC de *E.coli*, *S.aureus* y *C.albicans*, indiferentemente si el pH es 6,0 o 6,9.
- Las variables K_H y $F\text{-}\zeta$ fueron las únicas que presentaron una correlación lineal positiva sobre la reducción logarítmica de las UFC, para los CPEs obtenidos por HME.

Conclusiones generales y recomendaciones

Conclusiones

- Se obtuvieron CPEs entre el polielectrolito Eudragit E100 y los ácidos benzoico, salicílico y 4-hidroxibenzoico, mediante dos metodologías escalables, secado por aspersión y extrusión por fusión, cuya formación se evidenció por medio de FTIR. El carácter amorfo de los CPEs se estableció por medio de XPRD y DSC, indicando que también se pueden catalogar como dispersiones sólidas amorfas.
- Mediante la aplicación de diseños de experimentos y diagramas de fases se establecieron las condiciones más favorables para la elaboración de los CPEs, en función del rendimiento del proceso y el porcentaje de ácido retenido por el CPE.
- Las propiedades fisicoquímicas evaluadas en el estado sólido (SEM, DSC, XPS y XPRD) y en dispersión (solubilidad cualitativa, $F-\zeta$ y liberación), demostraron ser dependientes de la composición de los CPEs y de la metodología de obtención. Los CPEs de mejor desempeño fueron los producidos por HME y específicamente los que tuvieron valores más altos de $F-\zeta$.
- La proporción de Eudragit E100 en los CPEs, gobierna la velocidad de liberación de los ácidos cuando el pH del medio es de 6,0, y es independiente de la metodología de obtención de los complejos.
- Los CPEs obtenidos por las dos metodologías tuvieron actividad antimicrobiana superior, a pHs mayores de 6,0, en comparación con los ácidos de partida; el de mejor desempeño fue el CPE EuB₇₅Cl₂₅ en la reducción logarítmica de las UFC de los microorganismos evaluados.
- El CPE EuB₇₅Cl₂₅ modificó la morfología de la bacteria *E.coli* cuando estuvo en contacto a un pH 6,9, cambiando también la topografía y el potencial ζ de las dispersiones de la bacteria.
- Se evidenció una correlación positiva entre los valores de $F-\zeta$ de las dispersiones de los CPEs obtenidos por HME y SD, y la reducción logarítmica de las UFC de

E.coli, *S.aureus* y *C.albicans*, siendo estadísticamente significativa a pH 6,0 y 6,9. Esta correlación es causada principalmente por las interacciones entre las cargas positivas de los CPEs con las estructuras cargadas negativamente de la superficie de la membrana de los microorganismos empleados en este estudio, lo que constituye el mecanismo principal mediante el cual actúan estos sistemas.

- El mayor espectro de acción y su mayor actividad en un rango más amplio de pH, hace que estos complejos puedan ser considerados como una nueva alternativa frente a los preservantes existentes, con aplicación en el campo farmacéutico y cosmético.

Recomendaciones

- Con el propósito de dilucidar el mecanismo de actividad antibacteriana de los CPEs y sobre todo el de mejor desempeño, se recomienda hacer estudios con ácido marcado radioactivamente y confirmar el paso y las concentraciones de los ácidos fuera y dentro de la bacteria.
- Evaluar la compatibilidad fisicoquímica de los CPEs en formulaciones prototipo de productos cosméticos o farmacéuticas y la prueba de desafío microbiológica, en aquellos en los que se haya demostrado la compatibilidad.
- Realizar estudios de estabilidad a escala piloto, de productos cosméticos o farmacéuticos prototipo, que incluyan a los CPEs más promisorios, y así evidenciar su potencial para ser empleados como preservantes que, a futuro, puedan ser comercializados.

A. Anexo: Espectros IR de los demás complejos

Figura A 1 Espectro de IR de los complejos EuHB_{100} ; $\text{EuHB}_{75}\text{Cl}_{25}$; Eu; AHB y mezcla física de Eu y AHB, obtenidos por SD.

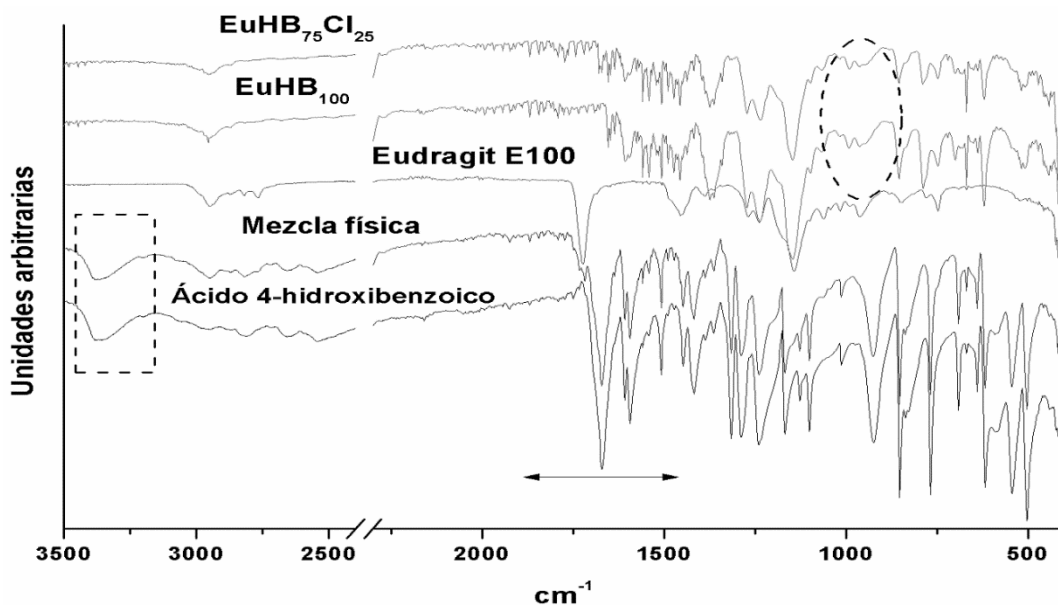


Figura A 2 Espectro de IR de los complejos EuAs_{100} ; $\text{EuHB}_{75}\text{Cl}_{25}$; Eu; As y mezcla física de Eu y As, obtenidos por SD.

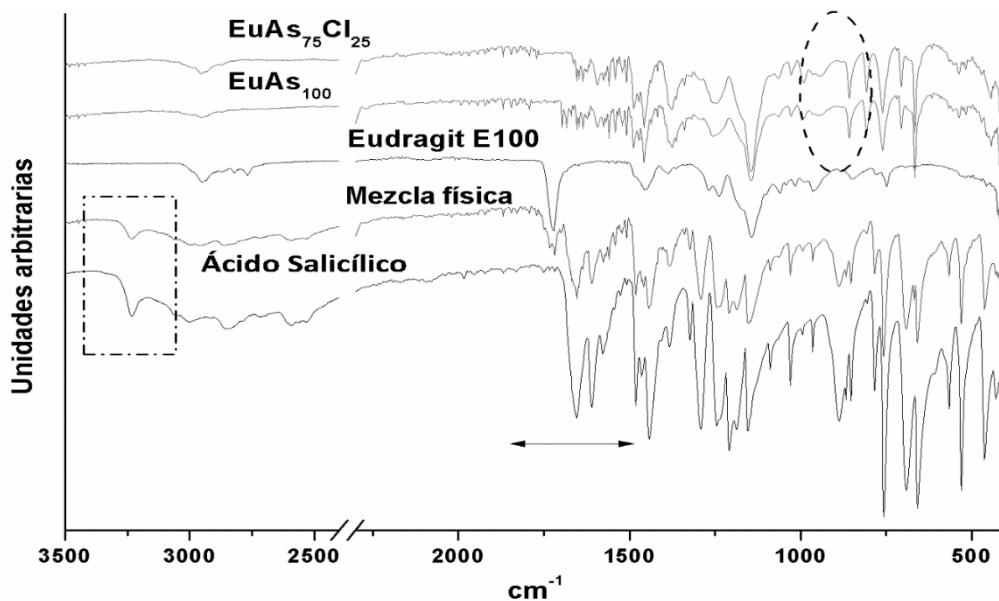


Figura A 3 Espectro de IR de los complejos EuB_{100} ; $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$; Eu; AB y mezcla física de Eu y AB, obtenidos por HME.

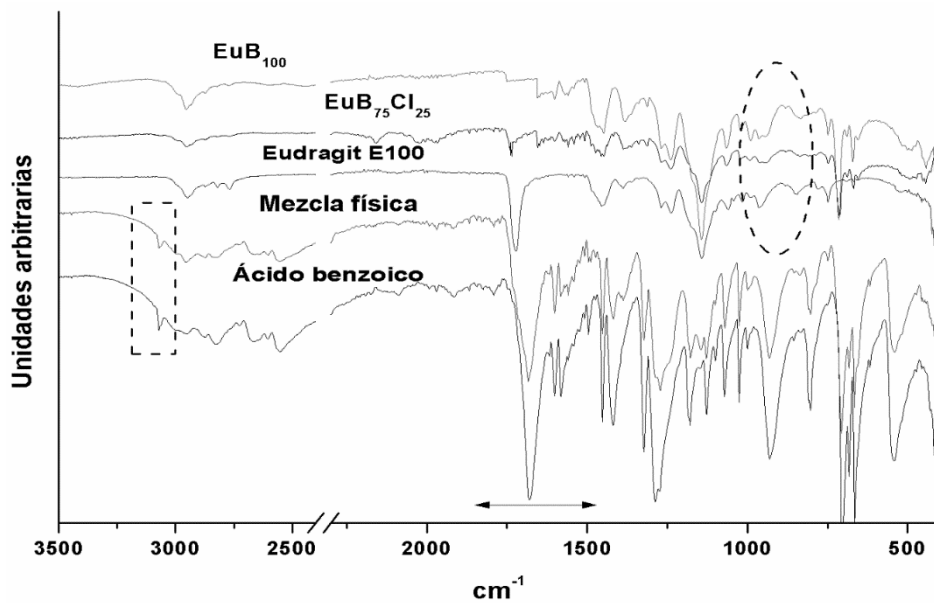
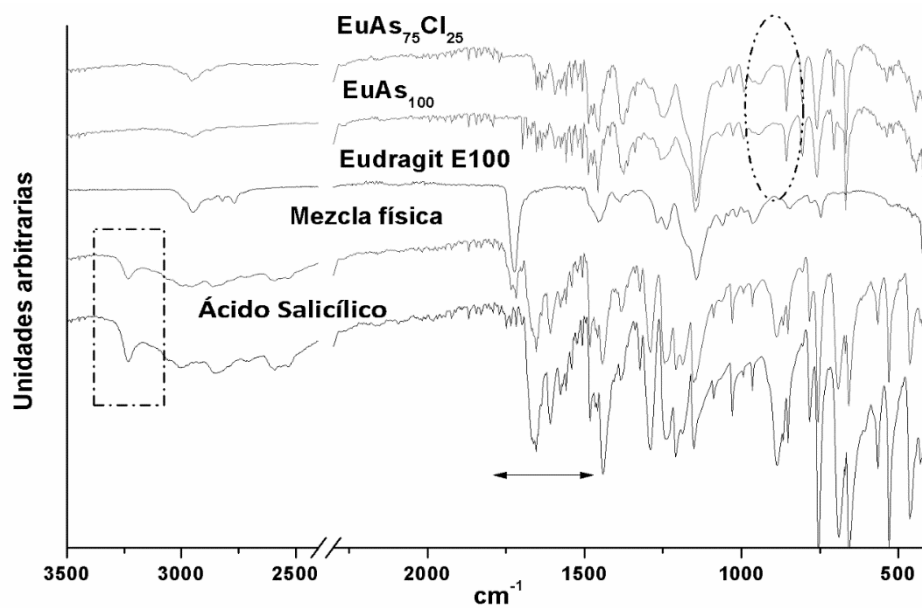


Figura A 4 Espectro de IR de los complejos EuAs_{100} ; $\text{EuAs}_{75}\text{Cl}_{25}$; Eu; As y mezcla física de Eu y As, obtenidos por HME.



B. Anexo: Miscibilidad de los ácidos en Eu y EuCl_{25}

Figura B 1 Termograma de miscibilidad de AB en EuCl_{25} , a diferentes fracciones de mezcla.

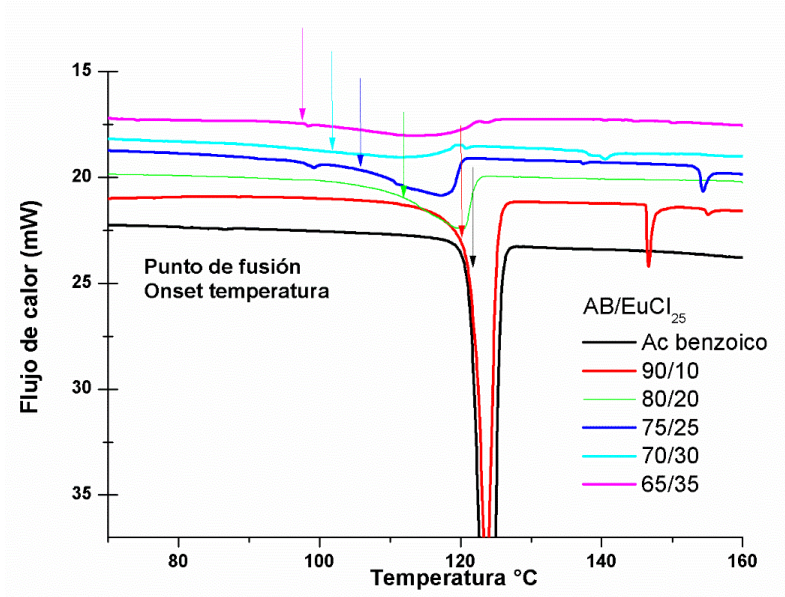


Figura B 2 Termograma de miscibilidad de AHB en Eu, a diferentes fracciones de mezcla.

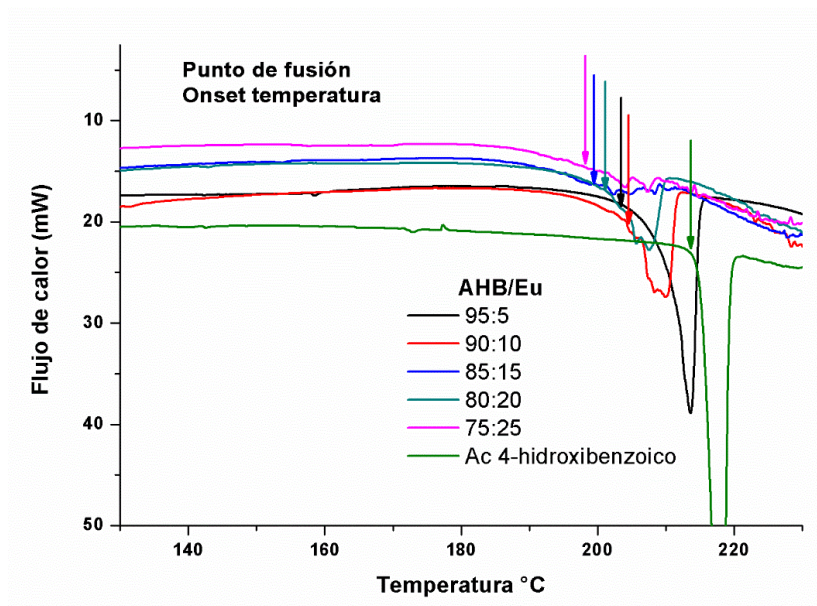


Figura B 3 Termograma de miscibilidad de AHB en EuCl_{25} , a diferentes fracciones de mezcla.

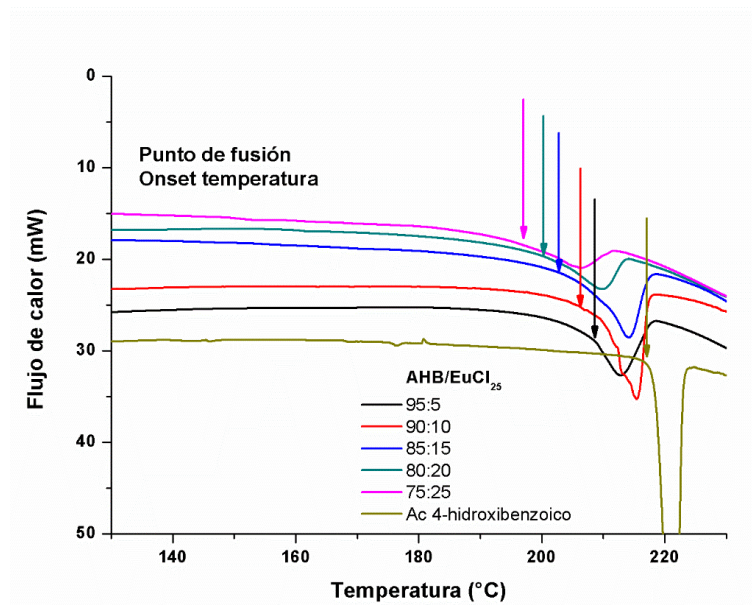


Figura B 4 Termograma de miscibilidad de AS en Eu, a diferentes fracciones de mezcla.

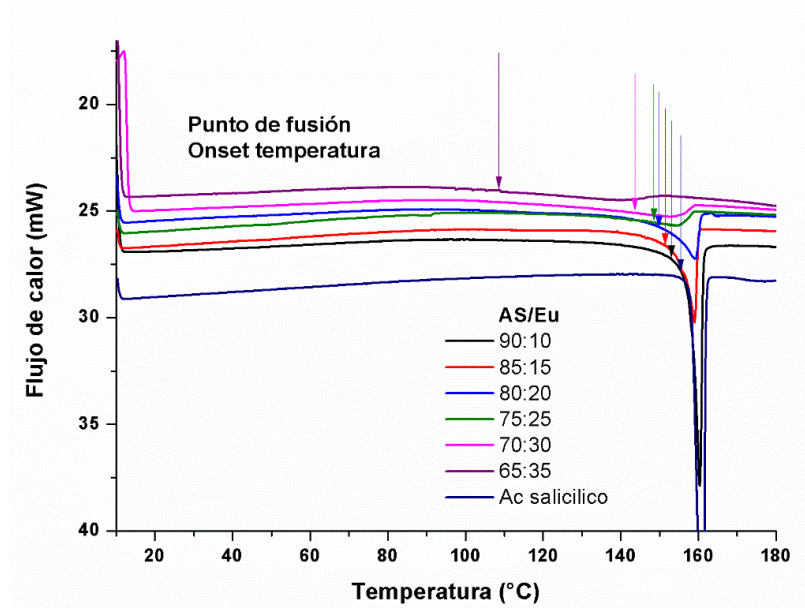
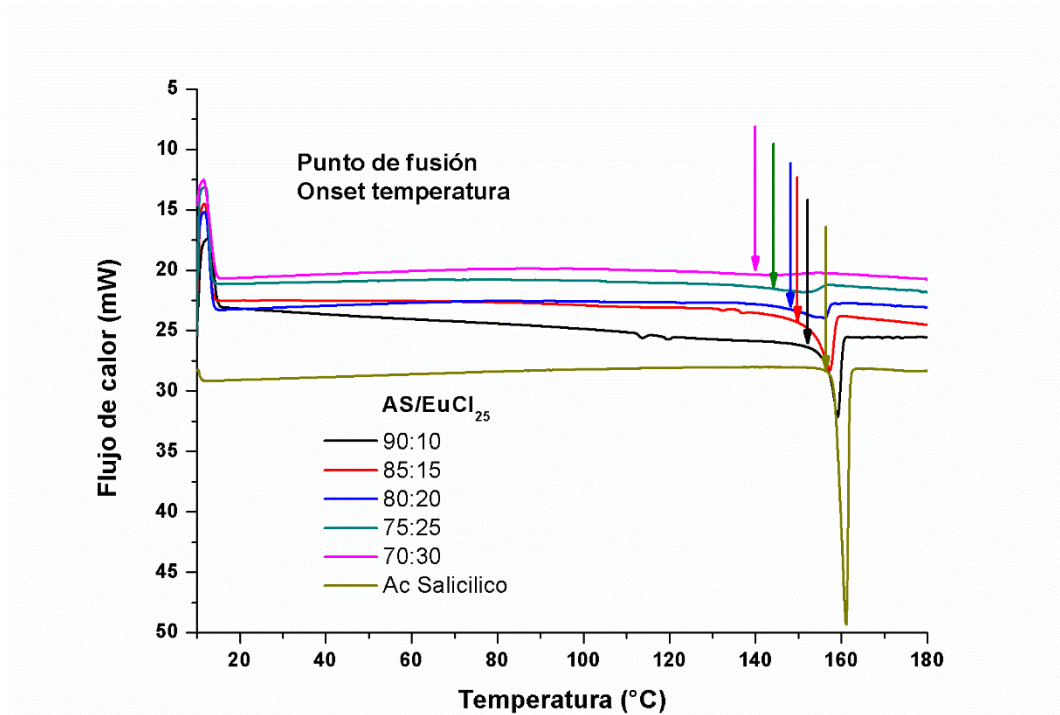


Figura B 5 Termograma de miscibilidad de AS en EuCl_{25} , a diferentes fracciones de mezcla.



C. Anexo: Gráficos para determinación del parámetro de interacción

Figura C1 Gráfico derivado de la Ecuación 2-2 reordenada, empleada para determinar el parámetro de interacción, χ , en el sistema Eu:AHB. El valor de χ se estima a partir de la pendiente.

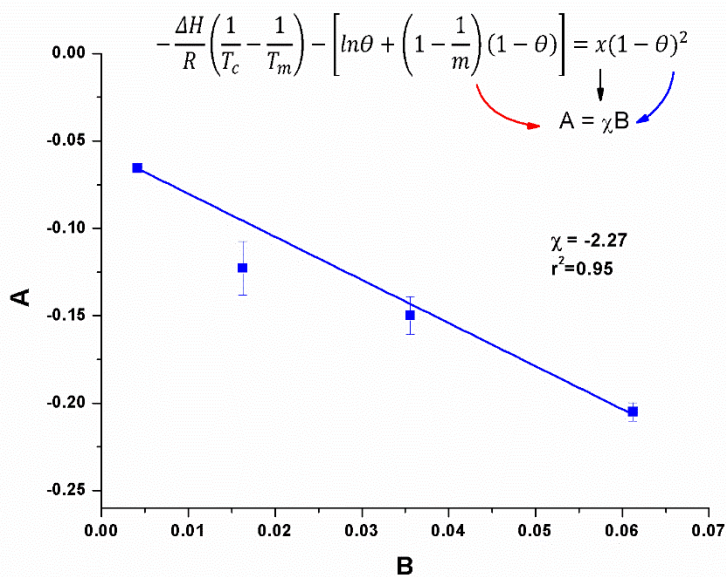


Figura C2 Gráfico derivado de la Ecuación 2-2 reordenada, empleada para determinar el parámetro de interacción, χ , en el sistema Eu:AS. El valor de χ se estima a partir de la pendiente.

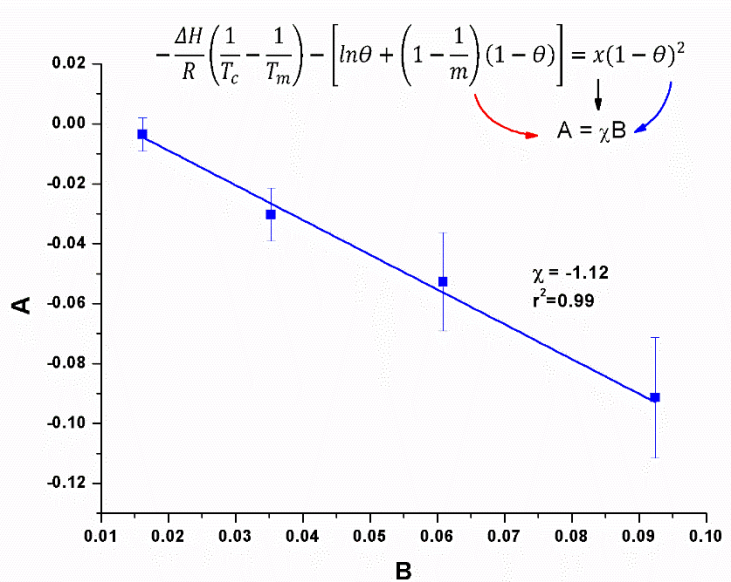


Figura C3 Gráfico derivado de la Ecuación 2-2 reordenada, empleada para determinar el parámetro de interacción, χ , en el sistema EuCl₂₅:AB. El valor de χ se estima a partir de la pendiente.

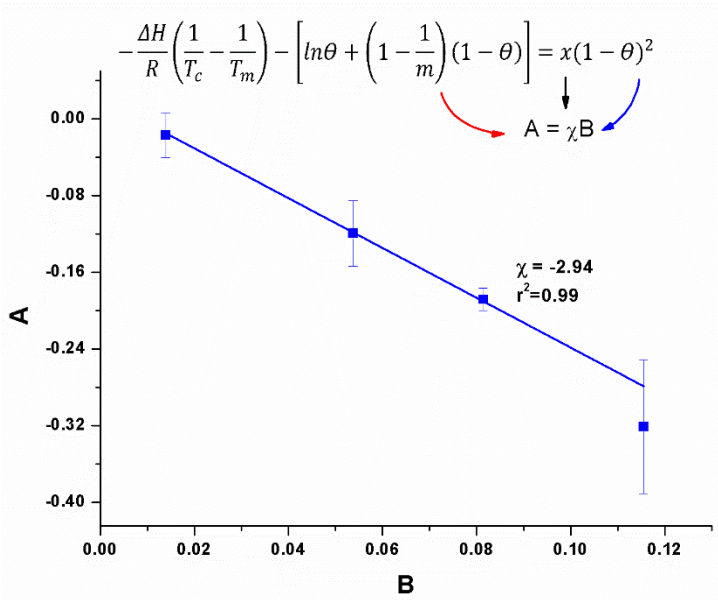


Figura C4 Gráfico derivado de la Ecuación 2-2 reordenada, empleada para determinar el parámetro de interacción, χ , en el sistema EuCl₂₅:AHB. El valor de χ se estima a partir de la pendiente.

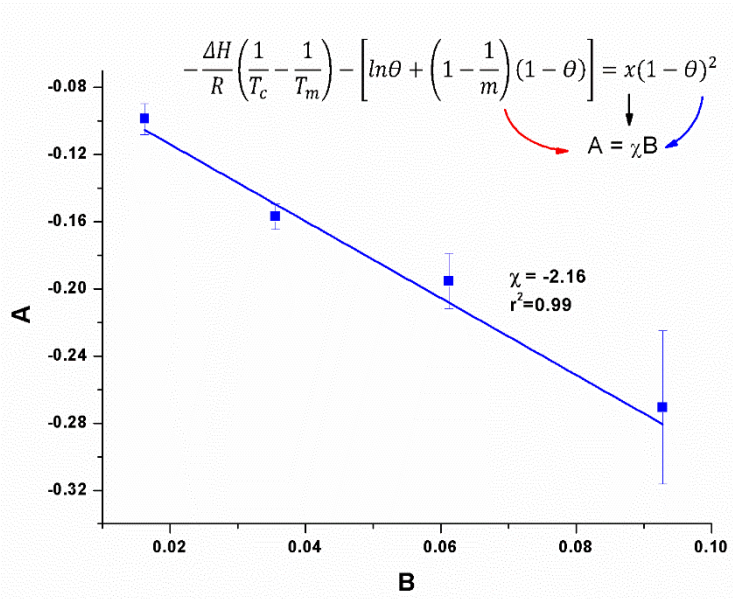
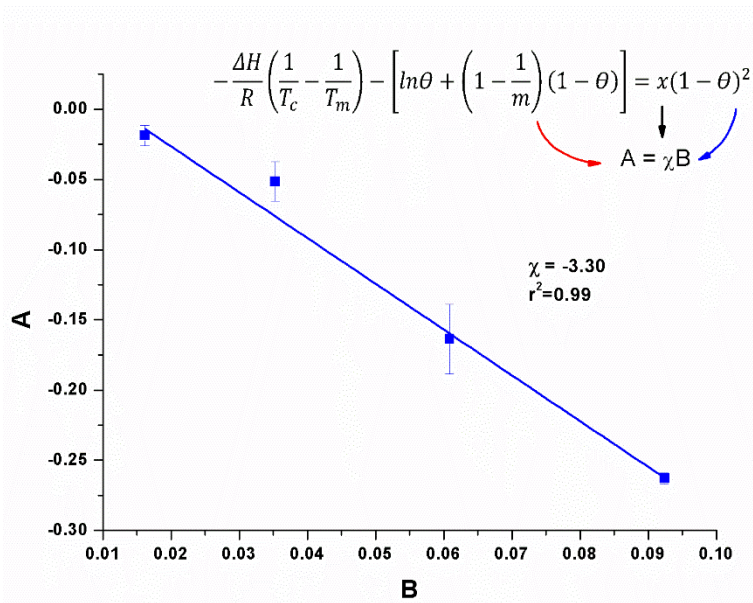


Figura C5 Gráfico derivado de la Ecuación 2-2 reordenada, empleada para determinar el parámetro de interacción, χ , en el sistema EuCl₂₅:AS. El valor de χ se estima a partir de la pendiente.



D. Anexo: Diagramas de fases para los sistemas AB:EuCl₂₅, AHB:Eu, AHB:EuCl₂₅, AS:Eu, AS:EuCl₂₅

Figura D 1 Diagrama de fases de composición para las mezclas AB:EuCl₂₅, que muestra las temperaturas experimentales, calculadas y la temperatura crítica para el sistema.

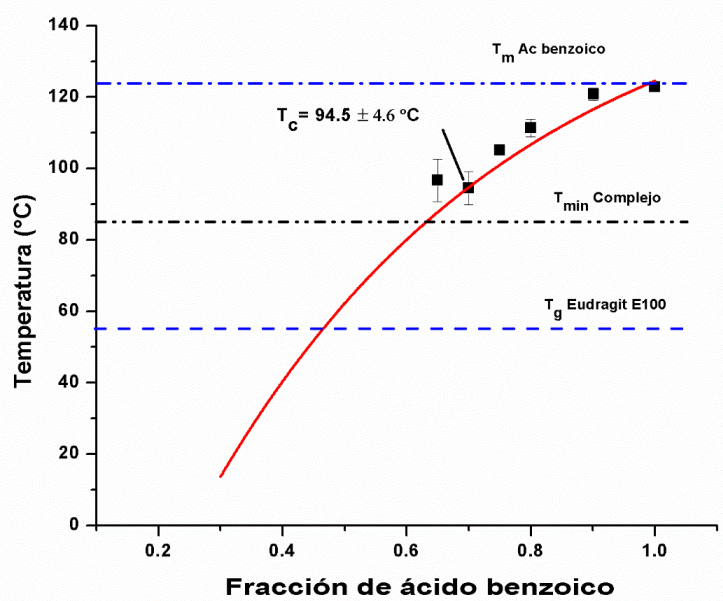


Figura D 2 Diagrama de fases de composición para las mezclas AHB:Eu, que muestra las temperaturas experimentales, calculadas y la temperatura crítica para el sistema.

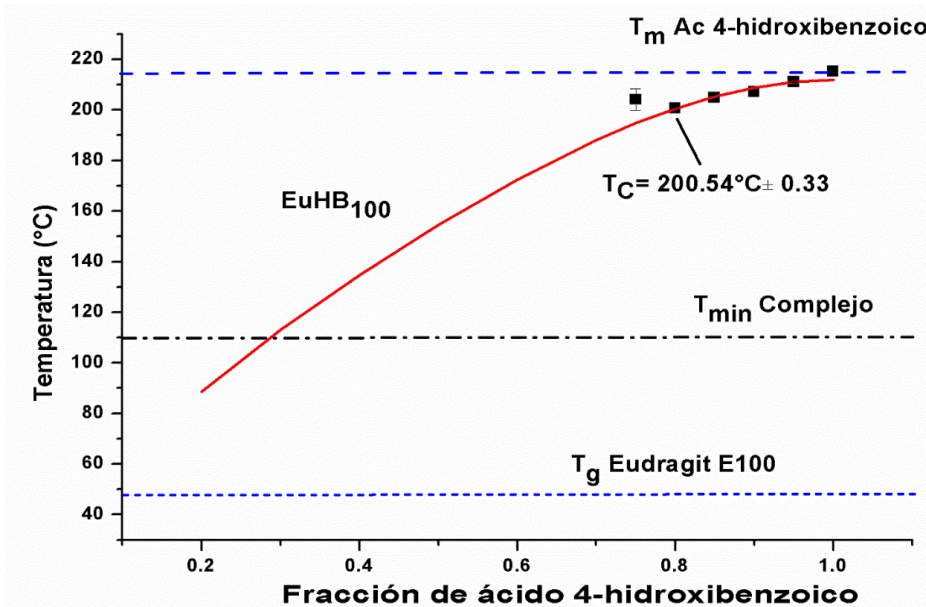


Figura D 3 Diagrama de fases de composición para las mezclas AHB:EuCl₂₅, que muestra las temperaturas experimentales, calculadas y la temperatura crítica para el sistema.

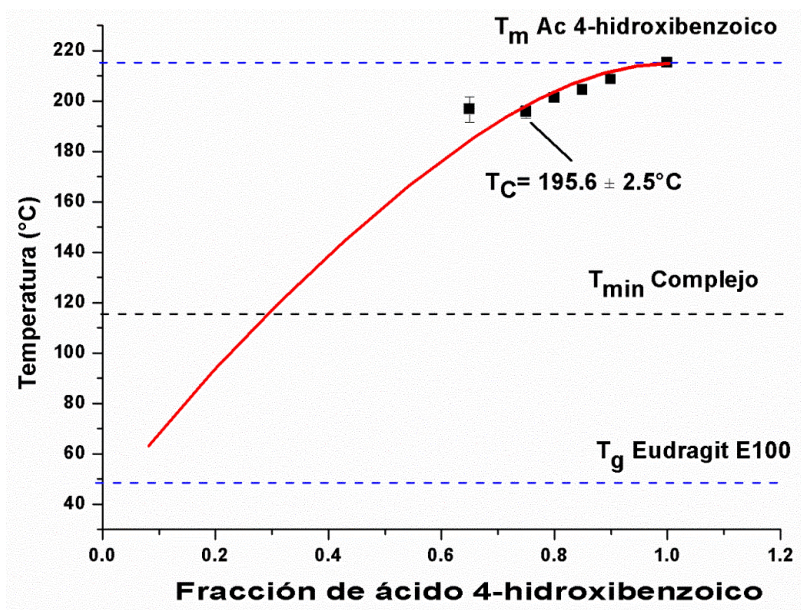


Figura D 4 Diagrama de fases de composición para las mezclas AS:Eu, que muestra las temperaturas experimentales, calculadas y la temperatura crítica para el sistema.

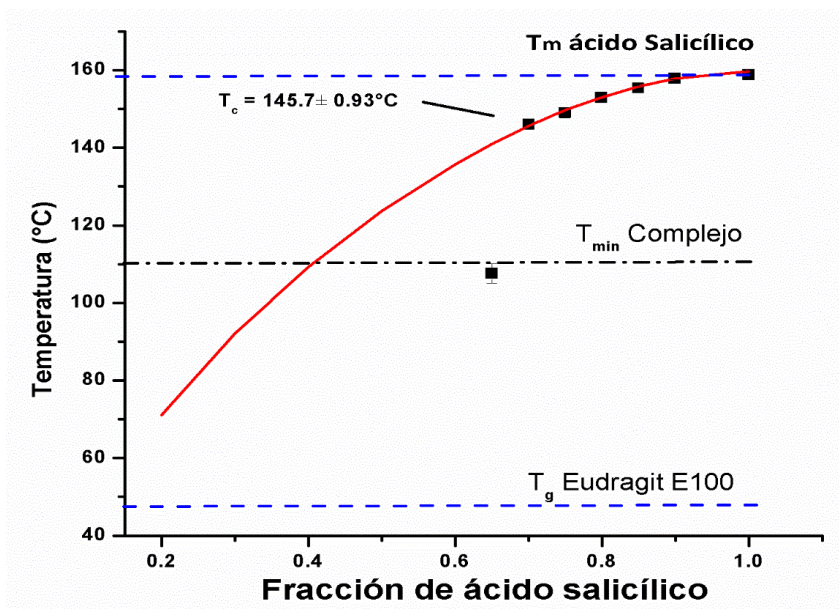
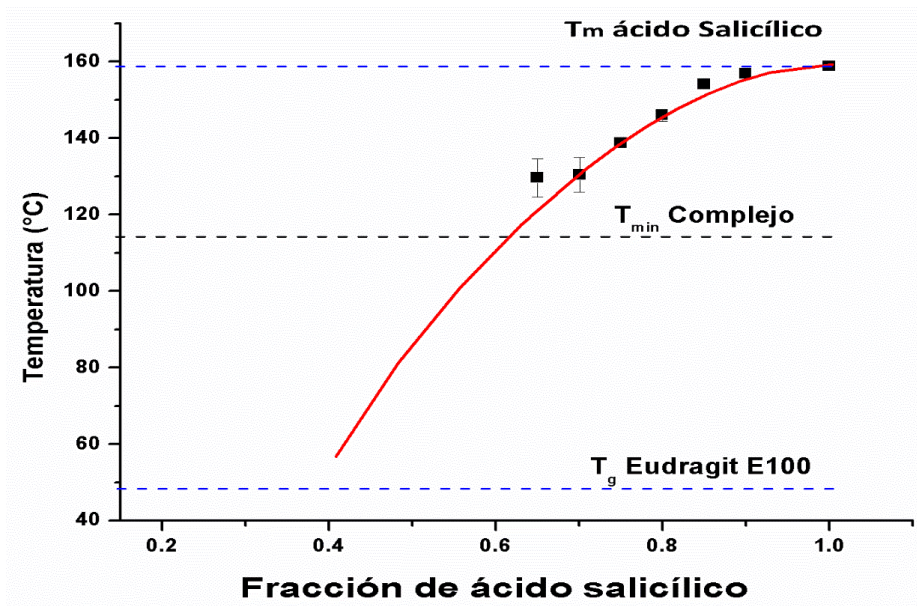


Figura D 5 Diagrama de fases de composición para las mezclas AS:EuCl₂₅, que muestra las temperaturas experimentales, calculadas y la temperatura crítica para el sistema.



E. Anexo: Espectros de XPS para los CPEs obtenidos por SD y HME

Figura E 1 Espectro de XPS y de resolución para el O1s y N1s del CPE EuB₁₀₀ obtenido por SD.

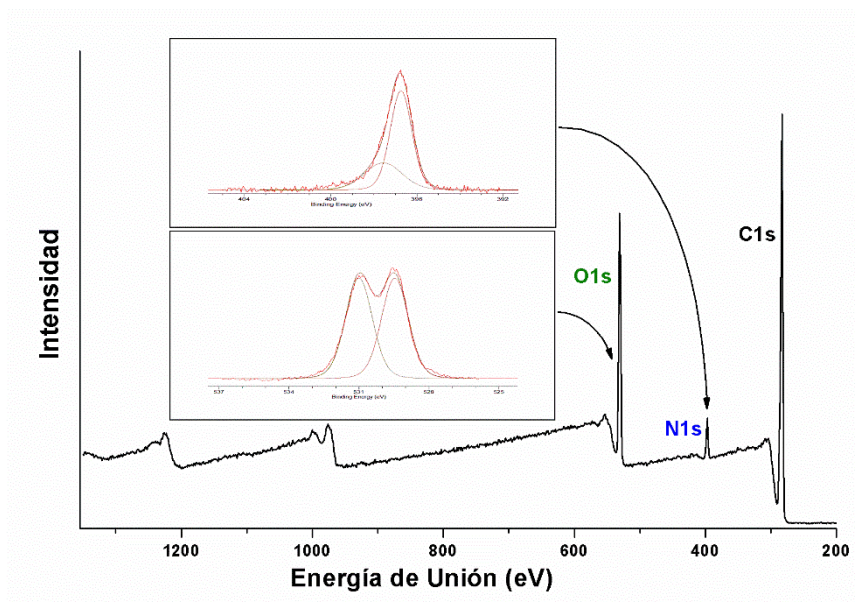


Figura E 2 Espectro de XPS y de resolución para el O1s y N1s del CPE EuB₇₅Cl₂₅ obtenido por SD.

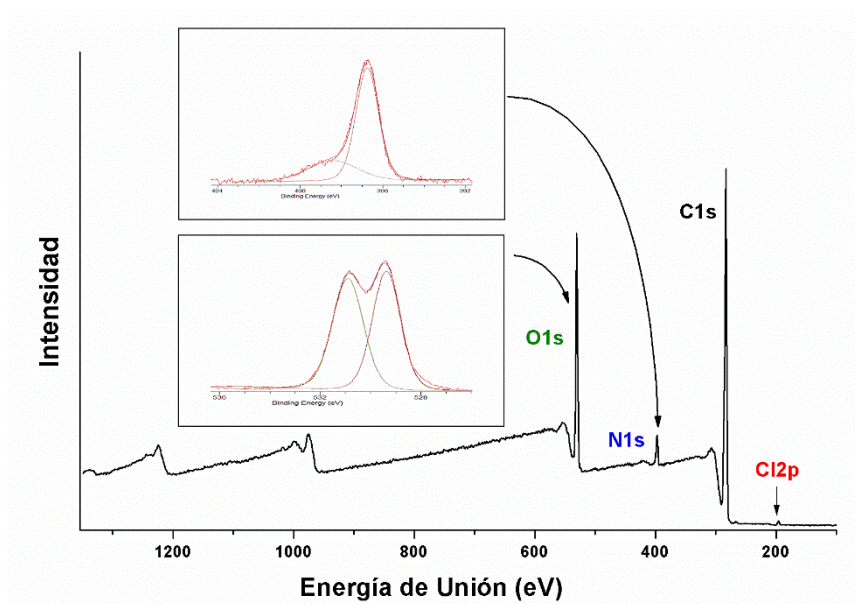


Figura E 3 Espectro de XPS y de resolución para el O1s y N1s del CPE EuHB₁₀₀ obtenido por SD.

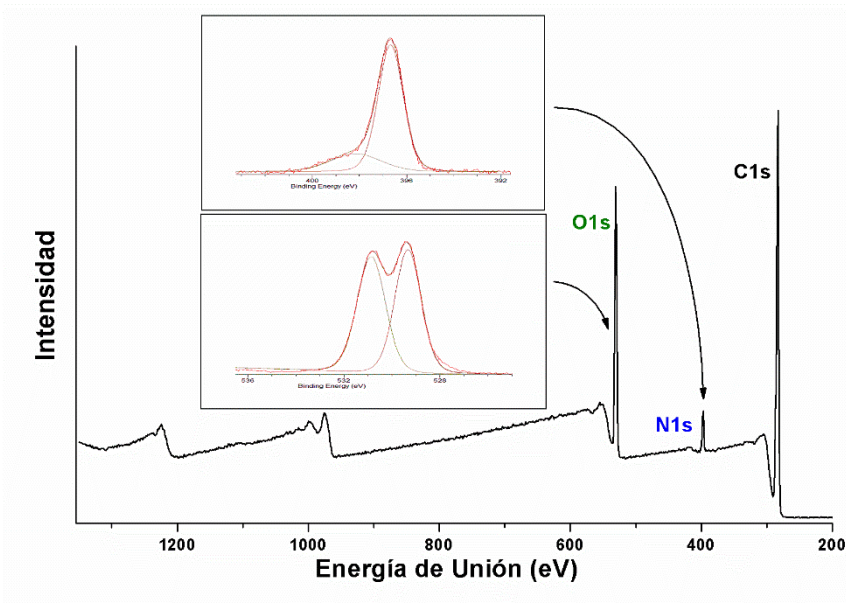


Figura E 4 Espectro de XPS y de resolución para el O1s y N1s del CPE EuHB₇₅Cl₂₅ obtenido por SD.

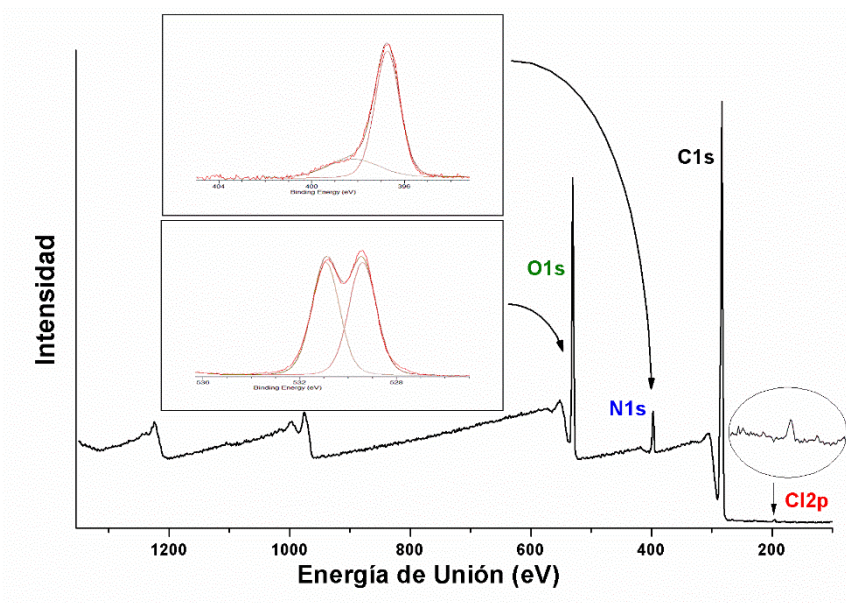


Figura E 5 Espectro de XPS y de resolución para el O1s y N1s del CPE EuAS₁₀₀ obtenido por SD.

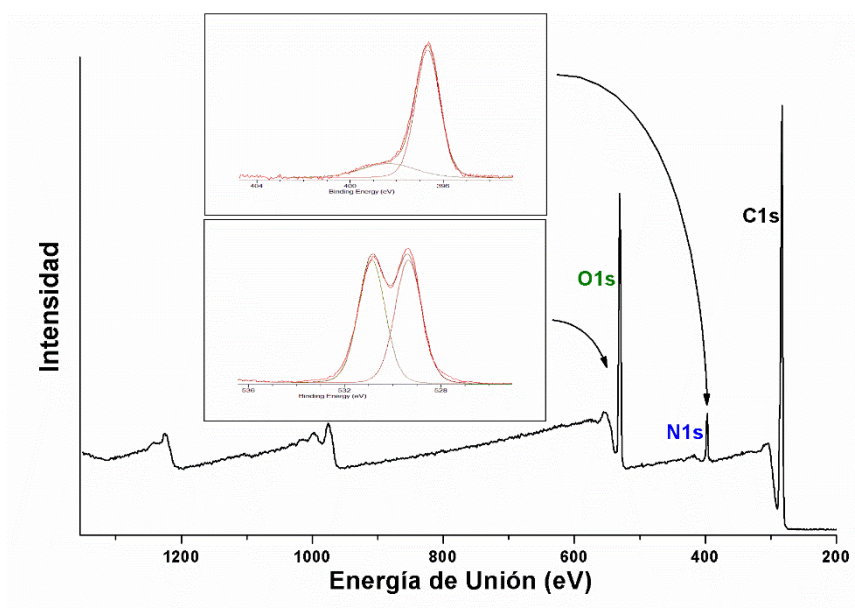


Figura E 6 Espectro de XPS y de resolución para el O1s y N1s del CPE EuAS₇₅Cl₂₅ obtenido por SD.

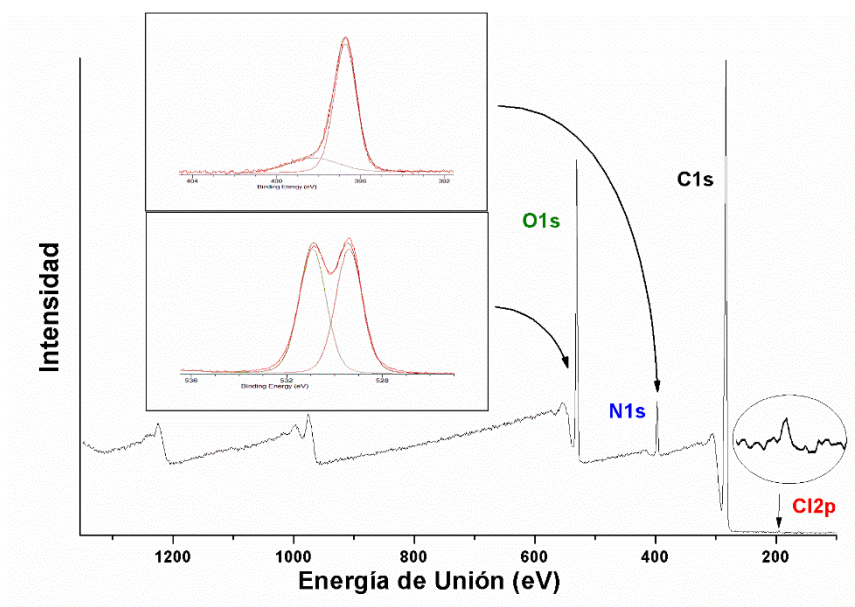


Figura E 7 Espectro de XPS y de resolución para el O1s y N1s del CPE EuB₁₀₀ obtenido por HME.

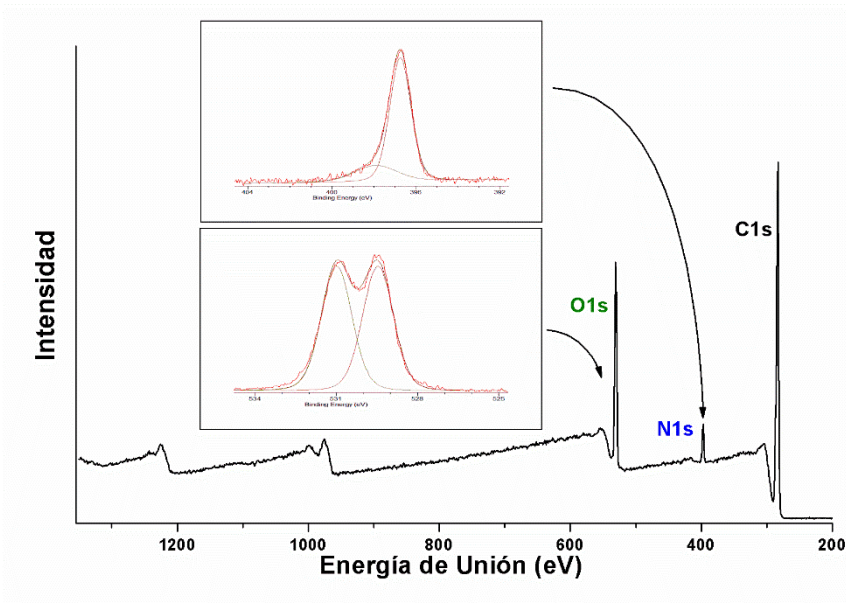


Figura E 8 Espectro de XPS y de resolución para el O1s y N1s del CPE EuB₇₅Cl₂₅ obtenido por HME.

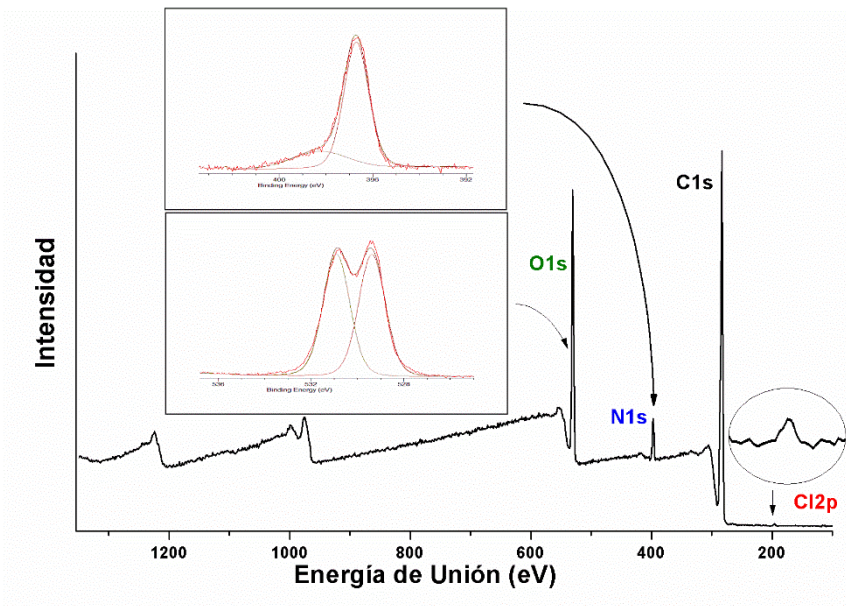


Figura E 9 Espectro de XPS y de resolución para el O1s y N1s del CPE EuHB₁₀₀ obtenido por HME.

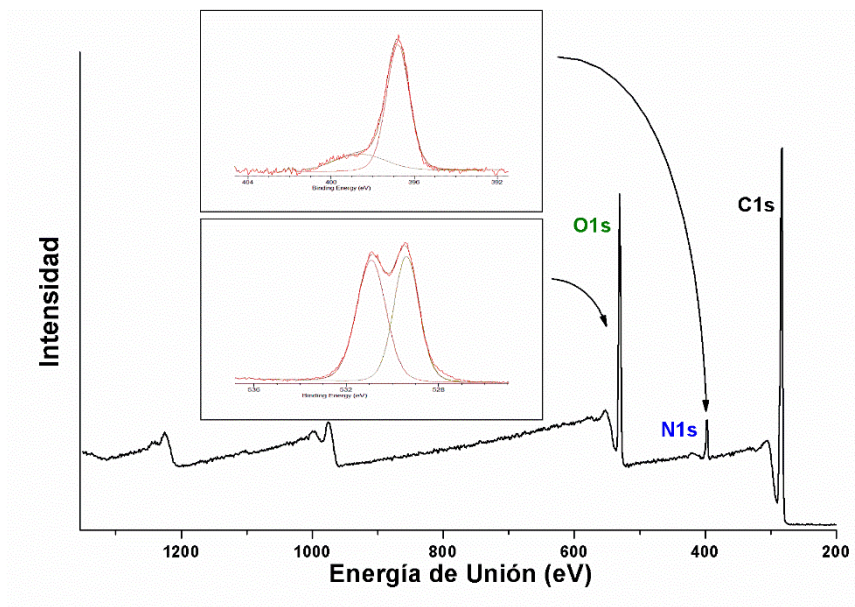


Figura E 10 Espectro de XPS y de resolución para el O1s y N1s del CPE EuHB₇₅Cl₂₅ obtenido por HME.

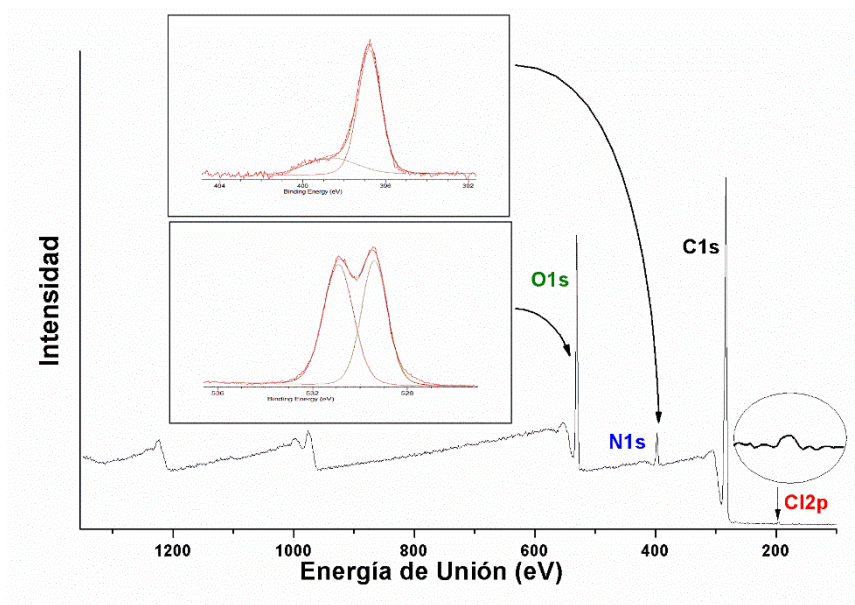


Figura E 11 Espectro de XPS y de resolución para el O1s y N1s del CPE EuAS₁₀₀ obtenido por HME.

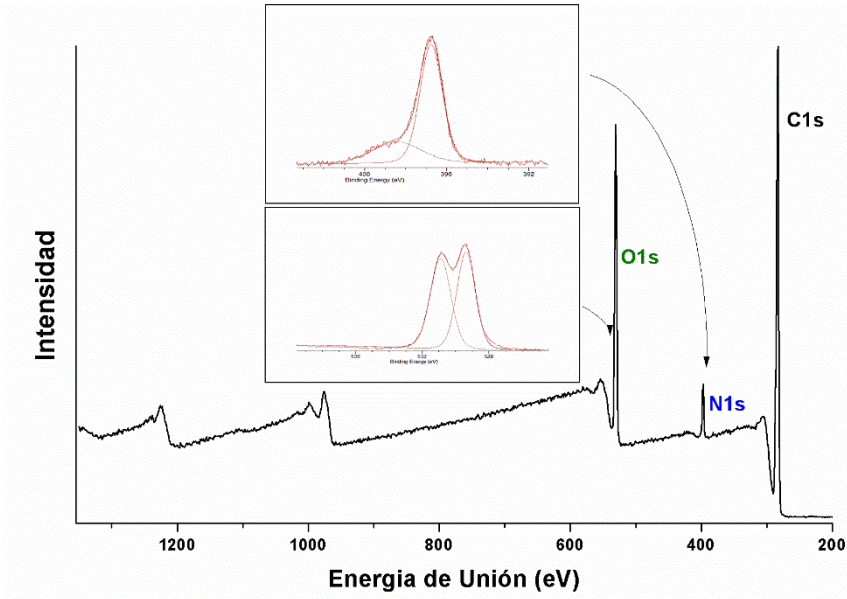
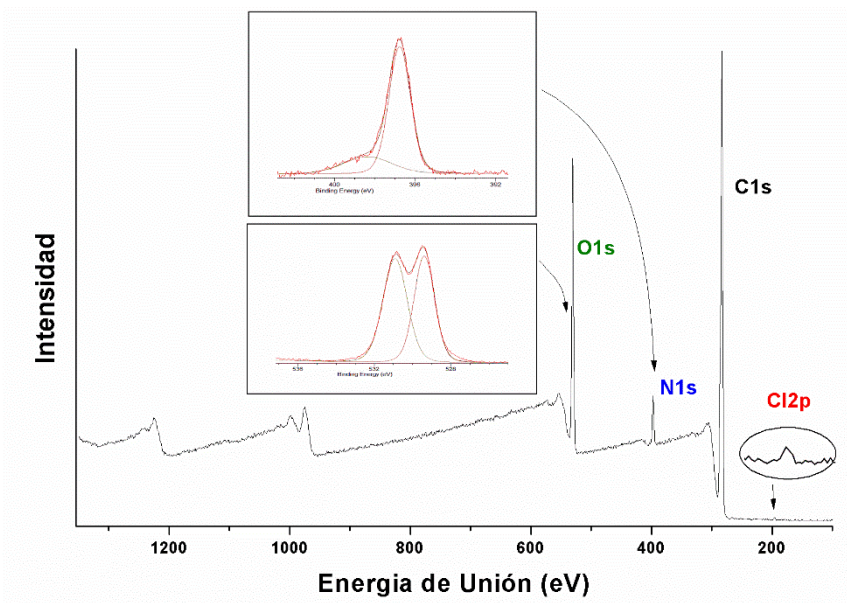


Figura E 12 Espectro de XPS y de resolución para el O1s y N1s del CPE EuAS₇₅Cl₂₅ obtenido por HME.



F. Anexo: Activación de las cepas y preparación de inóculos

1. CEPARIOS PARA LAS BACTERIAS

Para conservar las cepas certificadas adquiridas y garantizar una cantidad suficiente de microorganismos a evaluar se procedió a la elaboración de un cepario de las siguientes especies que fueron empleadas en los ensayos de actividad antimicrobiana:

Escherichia coli (ATCCN8 8739)

Staphylococcus aureus (ATCCN8 6538)

Tabla F 1 Activación de la cepa

Paso	Proceso
1	Se preparó una suspensión de medio Müeller-Hinton agar equivalente a 37g de medio de cultivo en 1L de agua destilada. Se calentó con agitación frecuente y se dejó hervir durante un minuto. La esterilización se realizó por el método de calor húmedo a 121°C durante 15 minutos. Posteriormente, se enfrió a 45°C-50°C y se sirvió en cajas de Petri hasta un nivel de 4mm en superficie horizontal.
2	De cada cepa certificada se tomó un inóculo con asa bacteriológica estéril y se sembró en la caja de Petri con el medio de cultivo por el método de agotamiento.
3	Se incubó por 48h a 37°C.
4	Del cultivo obtenido, se tomó una colonia diferenciada y se sembró en una nueva caja de Petri con el medio de cultivo por el método de agotamiento.
5	Se incubó por 48h a 37°C.
6	Del cultivo resultante, se tomó una colonia diferenciada y se sembró en una nueva caja de Petri con el medio de cultivo por el método de agotamiento.
7	Se incubó por 24h a 37°C.

Tabla F 2 Elaboración del Cepario

Paso	Proceso
1	De un cultivo de una cepa ya activada, se tomó con un asa bacteriológica estéril una colonia independiente y se llevó a suspensión en agua destilada con agente anticongelante (glicerina), en proporción 50:50 en un tubo de Eppendorf.
2	Se identificaron los tubos con las cepas sembradas, el origen y la fecha de inoculación.
3	Se almacenaron a -8°C.

2. ACTIVACIÓN PARA LA LEVADURA

Para la activación de la cepa empleada *C. albicans* 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) que se incubaron durante 24 horas a 35°C. 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 en agua peptonada, a la que se le adicionó como agente crio-protector 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.

Preparación del 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 un hemocitómetro (cámara de Neubauer), previa adición de azul de metileno para la tinción de las células.

G. Anexo: Densidad óptica

Tabla G 1 Densidad óptica de la cada una de las dispersiones de los CPEs después de la incubación con *Escherichia coli* a pH 6,0 y 6,9

		Densidad óptica <i>Escherichia coli</i>							
		HME				SD			
		pH 6,0		pH 6,9		pH 6,0		pH 6,9	
Complejos	Conc. % de ácido	Muestra	Control	Muestra	Control	Muestra	Control	Muestra	Control
EuB ₁₀₀	0,300	0,3430	0,3470	0,4880	0,4935	0,0917	0,0945	0,3993	0,4130
	0,150	0,3813	0,3895	0,4197	0,4210	0,0590	0,0605	0,4387	0,4315
	0,075	0,5827	0,5841	0,0960	0,1095	0,5010	0,5085	0,8187	0,8215
	0,038	0,0463	0,0520	0,0503	0,0545	0,5507	0,5445	0,0470	0,0490
	0,019	0,0473	0,0485	0,0437	0,0485	0,0554	0,0535	0,0440	0,0475
	0,090	0,0524	0,0490	0,0650	0,0640	0,0637	0,0525	0,0510	0,0525
EuB ₇₅ Cl ₂₅	0,300	0,3340	0,3405	0,2523	0,2585	0,0487	0,0493	0,8177	0,9730
	0,150	0,7817	0,8425	0,1983	0,2070	0,1033	0,1045	1,0440	1,0660
	0,075	0,6030	0,6060	0,2290	0,2340	0,4907	0,4910	1,2410	1,2305
	0,038	0,1500	0,1535	0,0517	0,0540	0,7807	0,7590	0,0660	0,0590
	0,019	0,0510	0,0560	0,0473	0,0495	0,0470	0,0430	0,0480	0,0440
	0,090	0,0643	0,0625	0,0537	0,0505	0,0490	0,0425	0,0541	0,0535
EuHB ₁₀₀	0,300	0,4470	0,4675	0,1530	0,1745	0,1143	0,1200	0,2943	0,5135
	0,150	0,4923	0,4931	0,3027	0,3295	0,9280	0,6715	0,9653	0,9490
	0,075	0,5327	0,5370	0,1117	0,1230	0,7693	0,7260	0,5353	0,5200
	0,038	0,0520	0,0486	0,2107	0,0580	0,0950	0,0950	0,0544	0,0505
	0,019	0,0527	0,0510	0,2763	0,0610	0,0530	0,0505	0,0636	0,0610
	0,090	0,0533	0,0500	0,2637	0,0605	0,0507	0,0490	0,0554	0,0525
EuHB ₇₅ Cl ₂₅	0,300	0,4400	0,4665	0,4730	0,5650	0,0517	0,0545	1,0297	1,0385
	0,150	0,4834	0,4895	0,5363	0,6035	0,0600	0,0640	1,3990	1,5385
	0,075	0,5383	0,5390	0,2140	0,2175	0,6200	0,6250	0,8800	0,9135
	0,038	0,1413	0,1385	0,1983	0,1110	0,7423	0,7355	0,0627	0,0615
	0,019	0,0497	0,0495	0,2473	0,1415	0,0503	0,0500	0,0513	0,0485
	0,090	0,0637	0,0625	0,2670	0,0840	0,0488	0,0485	0,0537	0,0530
EuAS ₇₅ Cl ₂₅	0,300	0,2750	0,2810	0,5100	0,5115	0,0673	0,0985	0,8177	0,9730
	0,150	0,2820	0,2830	0,5363	0,5420	0,5540	0,5920	1,0983	1,0660
	0,075	0,3193	0,3080	0,2430	0,2170	0,7597	0,7390	1,2410	1,1505
	0,038	0,0470	0,0470	0,3440	0,3270	0,0667	0,0635	0,0660	0,0590
	0,019	0,0477	0,0471	0,3455	0,3275	0,0530	0,0525	0,0548	0,0500
	0,090	0,0527	0,0480	0,3600	0,3540	0,0568	0,0470	0,0580	0,0535

Muestra : CPE disperso en caldo MHB con inóculo después de la incubación. Promedio de lectura de 3 pozos.

Control : CPE disperso en caldo MHB sin inóculo después de la incubación. Promedio de lectura de 2 pozos.

Tabla G 2 Densidad óptica de la cada una de las dispersiones de los CPEs después de la incubación con *Staphylococcus aureus* a pH 6,0 y 6,9

		Densidad óptica <i>Staphylococcus aureus</i>							
		HME				SD			
		pH 6,0		pH 6,9		pH 6,0		pH 6,9	
Complejos	Conc. % de ácido	Muestra	Control	Muestra	Control	Muestra	Control	Muestra	Control
EuB ₁₀₀	0,300	0,3660	0,3745	0,2455	0,2500	0,0470	0,0480	0,0583	0,0630
	0,150	0,3940	0,3965	0,2515	0,2820	0,5390	0,5444	0,2577	0,2505
	0,075	0,5380	0,2910	0,0555	0,0535	0,7383	0,7515	0,0807	0,0455
	0,038	0,1370	0,0495	0,1675	0,0505	0,1477	0,0535	0,1353	0,0480
	0,019	0,1755	0,0510	0,2180	0,0485	0,1903	0,0495	0,2127	0,0500
	0,090	0,1710	0,0460	0,2295	0,0775	0,1690	0,0485	0,2360	0,0485
EuB ₇₅ Cl ₂₅	0,300	0,4135	0,4200	0,3465	0,3490	0,0530	0,0560	0,1810	0,4525
	0,150	0,7995	0,8710	0,4515	0,4755	0,2457	0,2815	0,1817	0,1960
	0,075	0,5630	0,5710	0,2650	0,2640	0,7730	0,7875	0,1950	0,1890
	0,038	0,2310	0,1080	0,1495	0,0510	0,2590	0,1100	0,1287	0,0480
	0,019	0,2095	0,0540	0,2185	0,0475	0,1907	0,0585	0,2003	0,0495
	0,090	0,2270	0,0735	0,2260	0,0490	0,1747	0,0505	0,2197	0,0480
EuHB ₁₀₀	0,300	0,5435	0,5510	0,3865	0,3955	0,0717	0,0765	0,0863	0,3020
	0,150	0,4815	0,4905	0,3635	0,3665	0,7660	0,7815	0,2567	0,3115
	0,075	0,5920	0,5305	0,0665	0,0565	0,6997	0,6930	0,0483	0,0545
	0,038	0,1435	0,0480	0,2030	0,0485	0,1450	0,0510	0,1807	0,0485
	0,019	0,1555	0,0485	0,2390	0,0480	0,1530	0,0490	0,2143	0,0495
	0,090	0,1765	0,0455	0,2300	0,0550	0,1663	0,0475	0,2463	0,0485
EuHB ₇₅ Cl ₂₅	0,300	0,4765	0,4780	0,1800	0,1965	0,0493	0,0520	0,1507	0,1765
	0,150	0,5275	0,5320	0,1980	0,2130	0,8677	0,8770	0,5500	0,6960
	0,075	0,5025	0,5810	0,0640	0,0645	0,7870	0,7690	0,1860	0,2005
	0,038	0,2000	0,0690	0,1210	0,0500	0,1703	0,0545	0,2077	0,0535
	0,019	0,1840	0,0490	0,2375	0,0495	0,1760	0,0515	0,2007	0,0495
	0,090	0,2365	0,0735	0,2355	0,0480	0,1833	0,0500	0,2250	0,0495
EuAs ₇₅ Cl ₂₅	0,300	0,3240	0,3310	0,3420	0,3570	0,3530	0,3860	0,3943	0,4400
	0,150	0,3495	0,3465	0,3935	0,3940	0,4590	0,4605	0,4013	0,4630
	0,075	0,2950	0,2940	0,1125	0,1075	0,4143	0,4240	0,0520	0,0515
	0,038	0,0760	0,0530	0,0985	0,0520	0,0887	0,0490	0,1023	0,0535
	0,019	0,0925	0,0500	0,1825	0,0515	0,1387	0,0470	0,1567	0,0495
	0,090	0,1130	0,0480	0,2165	0,0550	0,1427	0,0455	0,2217	0,0490

Muestra : CPE disperso en caldo MHB con inóculo después de la incubación. Promedio de lectura de 3 pozos.
 Control : CPE disperso en caldo MHB sin inóculo después de la incubación. Promedio de lectura de 2 pozos.

H. Anexo: Productos académicos

Artículos publicados:

“Nanoparticles based on a PEGylated methacrylate copolymer as vehicles for hydrophilic antimicrobial additives: a study on chemical interactions with a benzoic acid probe molecule”. Juan J. Carrascal, James M. Villegas, Claudia M. Baena-Aristizábal, Yolima Baena, Leon D. Perez. *Colloid and Polymer Science*. 297 (6): 809-820 (2019).

“Benzoic acid complexes with Eudragit E100®: New alternative antimicrobial”. Juan J. Carrascal, Rodolfo Pinal, Teresa Carvajal, Leon Darío Perez, Yolima Baena. *International Journal of Pharmaceutics*. 607: 120-137 (2021).

Presentaciones en eventos académicos:

Complejos polielectrolíticos una alternativa como preservantes (por extrusión), Carrascal JJ, Baena Y, Pinal R, XXI Congreso de la federación farmacéutica sudamericana y del XII Congreso nacional farmacéutico, Ciudad del este, Paraguay, noviembre 2019. Modalidad poster (Mención honorífica a mejor investigación).

Polyelectrolytic complexes as alternative preservative systems (Spray Dry), Carrascal JJ, Baena Y, Pinal R, Excipient World 2019 at the National Harbor, Maryland, United States, May 2019. Modalidad poster.

Original Contribution | [Published: 22 April 2019](#)

Nanoparticles based on a PEGylated methacrylate copolymer as vehicles for hydrophilic antimicrobial additives: a study on chemical interactions with a benzoic acid probe molecule

[Juan J. Carrascal](#), [James M. Villegas](#), [Claudia M. Baena-Aristizábal](#), [Yolima Baena](#)  & [Leon D. Perez](#) 

Colloid and Polymer Science **297**, 809–820 (2019) | [Cite this article](#)

274 Accesses | 2 Citations | [Metrics](#)



International Journal of Pharmaceutics

Volume 607, 25 September 2021, 120991



Benzoic acid complexes with Eudragit E100®: New alternative antimicrobial preservatives

[Juan José Carrascal](#)^a, [Rodolfo Pinal](#)^b, [Teresa Carvajal](#)^c, [León Darío Pérez](#)^d, [Yolima Baena](#)^a  

- ^a Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá – Facultad de Ciencias –Departamento de Farmacia – Grupo de investigación Sistemas para liberación controlada de moléculas biológicamente activas, Carrera 30 # 45-03, Bogotá D.C, 111321, Colombia
- ^b Department of Industrial and Physical Pharmacy, College of Pharmacy, Purdue University, 575 Stadium Mall Drive, West Lafayette, IN 47907-2051, USA
- ^c Department of Agricultural & Biological Engineering, Purdue University, 225 South University Street, West Lafayette, IN 47907-2093, USA
- ^d Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá – Facultad de Ciencias –Departamento de Química – Grupo de investigación en Macromoléculas, Carrera 30 # 45-03, Bogotá D.C 111321, Colombia

Bibliografía

1. Alvarez-Rivera G, Llompart M, Lores M, Garcia-Jares C. Preservatives in Cosmetics. In: Analysis of Cosmetic Products [Internet]. Elsevier; 2018 [cited 2019 Apr 1]. p. 175–224. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444635082000096>
2. Polati S, Gosetti F, Gennaro MC. Preservatives in cosmetics. Regulatory aspects and analytical methods. In: Salvador A, Chisvert A, editors. Analysis of Cosmetic Products. 1st Ed. Elsevier B.V.; 2007. p. 211–41.
3. Singhal RS, Kuljarni PR. Preservatives. Permitted preservatives – Hydroxybenzoic acid. In: Batt CA, Tortorello M-L, editors. Encyclopedia of Food Microbiology. 2nd Ed. London: Academic Press; 1999. p. 1757–1762.
4. Kerdudo A, Burger P, Merck F, Dingas A, Rolland Y, Michel T, et al. Development of a natural ingredient – Natural preservative: A case study. Comptes Rendus Chim [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2019 Apr 1];19(9):1077–89. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S163107481630162X>
5. European Commission. EC issues new rules to regulate use of parabens in cosmetics. Focus Surfactants [Internet]. 2015 [cited 2017 May 5];2015(10):1. Available from: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/S135142101502644>
6. Nowak K, Ratajczak-Wrona W, Górska M, Jabłońska E. Parabens and their effects on the endocrine system. Mol Cell Endocrinol [Internet]. 2018 Oct 15 [cited 2019 Apr 2];474:238–51. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720718301060>
7. Maccioni AM, Anchisi C, Sannat A, Sardu C, Dessì S. Preservative systems containing essential oils in cosmetic products. Int J Cosmet Sci. 2002;24(1):53–9.
8. Amaral LFB, Camilo NS, Pereda MDC V., Levy CE, Moriel P, Mazzola PG. Evaluation of antimicrobial effectiveness of C-8 xylitol monoester as an alternative preservative for cosmetic products. Int J Cosmet Sci. 2011;33(5):391–7.
9. Kokura S, Handa O, Takagi T, Ishikawa T, Naito Y, Yoshikawa T. Silver nanoparticles as a safe preservative for use in cosmetics. Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med [Internet]. 2010 [cited 2017 May 8];6(4):570–4. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S154996341000002X>
10. Kerdudo A, Fontaine-Vive F, Dingas A, Faure C, Fernandez X. Optimization of cosmetic preservation: water activity reduction. Int J Cosmet Sci. 2015;37(1):31–40.
11. Lintner K, Genet V. A physical method for preservation of cosmetic products. Int J Cosmet Sci. 1998;20(2):103–15.
12. Brannan DK, Dille JC. Type of closure prevents microbial contamination of cosmetics during consumer use. Appl Environ Microbiol. 1990;56(5):1476–9.
13. Chang Y, McLandsborough L, McClements DJ. Antimicrobial delivery systems based on electrostatic complexes of cationic ϵ -polylysine and anionic gum arabic. Food Hydrocoll [Internet]. 2014;35:137–43. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X13001409>
14. Izumrudov VA, Paraschuk VV, Sybachin AV. Controlled phase separations in solutions of polyelectrolyte complexes Potential for gene delivery. J Drug Deliv Sci Technol. 2006;16(4):267–74.

15. Jimenez-Kairuz AF, Llabot JM, Allemandi DA, Manzo RH. Swellable drug-polyelectrolyte matrices (SDPM). Characterization and delivery properties. *Int J Pharm* [Internet]. 2005 Jan 6 [cited 2016 Sep 4];288(1):87–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15607261>
16. Niece KL, Vaughan AD, Devore DI. Graft copolymer polyelectrolyte complexes for delivery of cationic antimicrobial peptides. *J Biomed Mater Res Part A* [Internet]. 2013 Sep;101A(9):2548–58. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.34555>
17. Petrov AI, Antipov AA, Sukhorukov GB. Base-acid equilibria in polyelectrolyte systems: From weak polyelectrolytes to interpolyelectrolyte complexes and multilayered polyelectrolyte shells. *Macromolecules*. 2003 Dec;36(26):10079–86.
18. Ramírez-Rigo M V., Olivera ME, Rubio M, Manzo RH. Enhanced intestinal permeability and oral bioavailability of enalapril maleate upon complexation with the cationic polymethacrylate Eudragit E100. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2014 May 13 [cited 2019 Aug 20];55(1):1–11. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098714000050>
19. Wang C, Wu C, Wu Y, Gu J, Xu T. Polyelectrolyte complex/PVA membranes for diffusion dialysis. *J Hazard Mater*. 2013;261:114–22.
20. Yang Z, Fang Y, Ji H. Controlled release and enhanced antibacterial activity of salicylic acid by hydrogen bonding with chitosan. *Chinese J Chem Eng* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2019 Aug 19];24(3):421–6. Available from: <https://www.sciencedirect-com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/S1004954115002840>
21. Dallos LJ. Estudio de las propiedades fisicoquímicas y antimicóticas de complejos entre un polielectrolito y el ácido benzoico como molécula modelo (Doctoral dissertation). [Internet]. Universidad Nacional de Colombia, Bogota D.C.; 2019. Available from: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/76037>
22. Dallos LJ, Manzo RH, Baena Y. FTIR and DSC analysis of polyelectrolyte complexes between Eudragit® E100 and benzoic acid as evidence of hydrolysis of the polymer ester groups. *Rev Colomb Ciencias Químico-Farmacéuticas* [Internet]. 2019 Sep 1;48(3):700–21. Available from: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/article/view/84987>
23. Dakhara S, Anajwala C. Polyelectrolyte complex: A pharmaceutical review. *Syst Rev Pharm*. 2010;1(2):121.
24. Lankalapalli S, Kolapalli VRM. Polyelectrolyte Complexes: A Review of their Applicability in Drug Delivery Technology. *Indian J Pharm Sci* [Internet]. 2009 Sep [cited 2016 Sep 4];71(5):481–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20502564>
25. Bourganis V, Karamanidou T, Kammona O, Kiparissides C. Polyelectrolyte complexes as prospective carriers for the oral delivery of protein therapeutics. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2017;111:44–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.11.005>
26. Petzold G, Schwarz S. Polyelectrolyte complexes in flocculation applications. In: Müller M, editor. *Polyelectrolyte complexes in the dispersed and solid state II: Application aspects*. Berlin: Springer Berlin Heidelberg; 2013. p. 29–60.
27. Philipp B, Dautzenberg H, Linow K-J, Kötz J, Dawydoff W. Polyelectrolyte complexes — recent developments and open problems. *Prog Polym Sci*. 1989;14(1):91–172.
28. Meka VS, Sing MKG, Pichika MR, Nali SR, Kolapalli VRM, Kesharwani P. A comprehensive review on polyelectrolyte complexes. *Drug Discov Today* [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2018 Apr 29];22(11):1697–706. Available from: <https://www.sciencedirect-com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/S1359644617301265>
29. Siyawamwaya M, Choonara YE, Bijukumar D, Kumar P, Du Toit LC, Pillay V. A Review: Overview of Novel Polyelectrolyte Complexes as Prospective Drug

- Bioavailability Enhancers. *Int J Polym Mater Polym Biomater* [Internet]. 2015 Dec 22;64(18):955–68. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00914037.2015.1038816>
30. Siyawamwaya M, Choonara YE, Bijukumar D, Kumar P, Du Toit LC, Pillay V. A review: Overview of novel polyelectrolyte complexes as prospective drug bioavailability enhancers. *Int J Polym Mater Polym Biomater* [Internet]. 2015 Dec 22 [cited 2016 Sep 4];64(18):955–68. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00914037.2015.1038816>
 31. Antunes JC, Pereira CL, Molinos M, Ferreira-da-Silva F, Dessi M, Gloria A, et al. Layer-by-layer self-assembly of chitosan and poly(γ -glutamic acid) into polyelectrolyte complexes. *Biomacromolecules* [Internet]. 2011;12:4183–95. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22032302
 32. Le Cerf D, Pepin AS, Niang PM, Cristea M, Karakasyan-Dia C, Picton L. Formation of polyelectrolyte complexes with diethylaminoethyl dextran: Charge ratio and molar mass effect. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2014;113:217–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.07.015>
 33. Kabanov V. *Fundamentals of Polyelectrolyte Complexes in Solution and the Bulk*. In: *Multilayer Thin Films* [Internet]. Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2003. p. 47–86. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/3527600574.ch2>
 34. Ankerfors C. *Polyelectrolyte Complexes: Preparation, Characterization, and Use for Control of Wet and Dry Adhesion between Surfaces*. 2012.
 35. Frueh J, Gai M, Halstead S, He Q. Structure and thermodynamics of polyelectrolyte complexes. In: P.M. V, Bayraktar O, Picó GA, editors. *Polyelectrolytes Thermodynamics and Rheology*. New York: Elsevier; 2014. p. 19–86.
 36. Dautzenberg H. Polyelectrolyte complex formation in highly aggregating systems: Methodical aspects and general tendencies. In: Radeva T, editor. *Physical chemistry of polyelectrolytes*. Marcel Dek, New York: Surfactant sciences; 2001. p. 743–50.
 37. Tsuchida E. Formation of Polyelectrolyte Complexes and Their Structures. *J Macromol Sci Part A Pure Appl Chem*. 1994 Jan;31(1):1–15.
 38. Müller M, Keßler B, Fröhlich J, Poeschla S, Torger B. Polyelectrolyte complex nanoparticles of poly(ethyleneimine) and poly(acrylic acid): Preparation and applications. *Polymers (Basel)*. 2011;3(2):762–78.
 39. P.M V. Polyelectrolytes: Thermodynamics and rheology. In: P.M V, Bayraktar O, Picó GA, editors. *Polyelectrolytes: Thermodynamics and Rheology*. New York: Springer; 2014. p. 1–17.
 40. Kindermann C, Matthée K, Strohmeyer J, Sievert F, Breitzkreutz J. Tailor-made release triggering from hot-melt extruded complexes of basic polyelectrolyte and poorly water-soluble drugs. *Eur J Pharm Biopharm*. 2011;79:372–81.
 41. Jimenez-Kairuz A, Allemandi D, Manzo RH. Mechanism of lidocaine release from carbomer-lidocaine hydrogels. *J Pharm Sci* [Internet]. 2002 Jan 1 [cited 2021 Jan 22];91(1):267–72. Available from: <http://jpharmsci.org/article/S0022354916308942/fulltext>
 42. Hamman JH. Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems. *Mar Drugs* [Internet]. 2010 Apr 19 [cited 2016 Sep 4];8(4):1305–22. Available from: <http://www.mdpi.com/1660-3397/8/4/1305/>
 43. Dinu IA, Mihai M, Dragan ES. Comparative study on the formation and flocculation properties of polyelectrolyte complex dispersions based on synthetic and natural

- polycations. *Chem Eng J* [Internet]. 2010 May 15 [cited 2016 Sep 4];160(1):115–21. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1385894710002378>
44. Gärdlund L, Wågberg L, Norgren M. New insights into the structure of polyelectrolyte complexes. *J Colloid Interface Sci.* 2007;312(2):237–46.
 45. Esteban SL, Manzo RH, Alovero FL. Azithromycin loaded on hydrogels of carbomer: Chemical stability and delivery properties. *Int J Pharm.* 2009;366(1–2):53–7.
 46. Quinteros DA, Rigo VR, Kairuz AFJ, Olivera ME, Manzo RH, Allemandi DA. Interaction between a cationic polymethacrylate (Eudragit E100) and anionic drugs. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2008 Jan [cited 2016 Sep 4];33(1):72–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18060747>
 47. Pawar HA, Shenoy A V, Narawade PD, Soni PY, Shanbhag PP. Preservatives from nature : A review. *Int J Pharm Phytopharm Res.* 2011;1(2):78–88.
 48. Brayfield A. Martindale: The complete drug reference, Volume 1 [Internet]. Alison B, editor. Massachusetts: Pharmaceutical Press; 2014. 4596 p. (Complete Drug Reference). Available from: <https://books.google.com.co/books?id=kMQsngEACAAJ>
 49. United States Pharmacopeial Convention. Volumen 1. Capítulos Generales. In: *United States Pharmacopeia (USP 36) and National Formulary (NF 31)*. 2007. p. 1464.
 50. Zaragoza-Ninet V, Blasco Encinas R, Vilata-Corell JJ, Pérez-Ferriols A, Sierra-Talamantes C, Esteve-Martínez A, et al. Dermatitis alérgica de contacto a cosméticos, estudio clínico-epidemiológico en un hospital terciario. *Actas Dermosifiliogr* [Internet]. 2016;107(4):329–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ad.2015.12.007>
 51. Weiss J, Gaysinsky S, Davidson M, McClements J. Nanostructured encapsulation systems: Food antimicrobials. In: *Global Issues in Food Science and Technology*. New York: Academic Press; 2009. p. 425–79.
 52. Baena Y, Dallos LJ, Manzo RH, Ponce D'león LF. Standardization of Franz cells to evaluate drugs release from drug- polyelectrolyte complexes. *Rev Colomb Cienc Quím Farm* [Internet]. 2011;40(2):174–88. Available from: www.farmacia.unal.edu.co
 53. Baena Aristizábal Y. Estudio fisicoquímico de la liberación del diclofenac a partir de complejos polielectrolito-fármaco [Internet]. Universidad Nacional de Colombia; 2011 [cited 2016 Sep 23]. Available from: <http://www.bdigital.unal.edu.co/4363/>
 54. Baena A. Y, Manzo RH, Ponce D'Leon Q. LF. Preparation and physicochemical characterization of some polyelectrolyte-diclofenac complexes. *Vitae.* 2011;18(3):305–11.
 55. Guzmán ML, Manzo RH, Olivera ME. Eudragit E100 as a Drug Carrier: The Remarkable Affinity of Phosphate Ester for Dimethylamine. *Mol Pharm* [Internet]. 2012 Sep 4 [cited 2020 Aug 6];9(9):2424–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22808998/>
 56. Romero VL, Pons P, Bocco JL, Manzo RH, Alovero FL. Eudragit E100® potentiates the bactericidal action of ofloxacin against fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 2012 Sep;334(2):102–10. Available from: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2012.02626.x>
 57. Deb TK, Ramireddy B, Moin A, Shivakumar HG. In vitro-in vivo evaluation of xanthan gum and eudragit inter polyelectrolyte complex based sustained release tablets. *Int J Pharm Investig* [Internet]. 2015;5(1):65–72. Available from: <http://www.jpionline.org/text.asp?2015/5/1/65/147236%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25599035%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4286837>
 58. Jafari E. Preparation, characterization and dissolution of solid dispersion of diclofenac

- sodium using eudragit E-100. *J Appl Pharm Sci* [Internet]. 2013 [cited 2020 Aug 4];3(8):167–70. Available from: <http://www.japsonline.com>
59. Moustafine RI, Salachova AR, Frolova ES, Kemenova VA, Van Den Mooter G. 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*. 2009;35(12):1439–51.
 60. Moustafine RI, Kabanova TV, Kemenova VA, Van den Mooter G. Characteristics of interpolyelectrolyte complexes of Eudragit E100 with Eudragit L100. *J Control Release* [Internet]. 2005 Mar 2 [cited 2019 Aug 20];103(1):191–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016836590400598X>
 61. Evonik Industries. EUDRAGIT® E 100, EUDRAGIT® E PO and EUDRAGIT® E 12,5 Specification and Test Methods Solution of EUDRAGIT® E 100 with 12.5 % (w/w) dry substance in a mixture of. 2015.
 62. Nikam V. Eudragit a versatile polymer : A review *Pharmacologyonline* 1 : 152-164 (2011) EUDRAGIT A VERSATILE POLYMER : A REVIEW. *Pharmacol online*. 2011;1(January 2011):152–64.
 63. Satish Singh Kadian*, Harikumar SL. Eudragit and its Pharmaceutical Significance. Eudragit its Pharm Significance [Internet]. 2009 [cited 2017 Feb 17];247667(OCTOBER 2009):17. Available from: http://www.farmavita.net/component/option,com_remository/Itemid,88/func,fileinfo/id,108/
 64. Lin S-Y, Chen K-S, Run-Chu L. Organic esters of plasticizers affecting the water absorption, adhesive property, glass transition temperature and plasticizer permanence of Eudragit acrylic films. *J Control Release*. 2000;68(3):343–50.
 65. Patra CN, Priya R, Swain S, Kumar Jena G, Panigrahi KC, Ghose D. Pharmaceutical significance of Eudragit: A review. *Futur J Pharm Sci* [Internet]. 2017 Mar [cited 2017 Mar 15];1(1):1–52. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2314724516301273>
 66. Evonik Industries. Ficha de datos de seguridad. 2014. p. 9.
 67. Quinn M. Acid benzoic. In: Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME, editors. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 6th ed. Washington: The Pharmaceutical Press; 2009. p. 61.
 68. Al-Adham I, Haddadin R, Collier P. Types of Microbicidal and Microbistatic Agents. In: Fraise AP, Maillard J-Y, Sattar S, editors. *Russell, Hugo & Ayliffe's* [Internet]. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2012. p. 5–70. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118425831.ch2>
 69. Freese E, Sheu CW, Galliers E. Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. *Nature* [Internet]. 1973 Feb 2 [cited 2021 Jul 19];241(5388):321–5. Available from: <https://www.nature.com/articles/241321a0>
 70. Dong Y, Huang C, Park J, Wang G. Growth Inhibitory Levels of Salicylic Acid Decrease *Pseudomonas aeruginosa* fliC Flagellin Gene Expression. *J Exp Microbiol Immunol*. 2012;16(April):73–8.
 71. PubChem. 4-Hydroxybenzoic acid | C7H6O3 - PubChem [Internet]. U.S. National Library of Medicine. 2020 [cited 2020 Aug 21]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4-Hydroxybenzoic-acid>
 72. García-García R, Searle SS. Preservatives: Food Use. *Encycl Food Heal*. 2016 Jan 1;505–9.
 73. Drugbank. Benzoic acid: Uses, Interactions, Mechanism of Action | DrugBank Online [Internet]. [cited 2021 Jul 19]. Available from:

- <https://go.drugbank.com/drugs/DB03793>
74. Drugbank. 4-hydroxybenzoic acid: Uses, Interactions, Mechanism of Action | DrugBank Online [Internet]. [cited 2021 Jul 19]. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB04242>
 75. Hayat Q, Hayat S, Irfan M, Ahmad A. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environ Exp Bot* [Internet]. 2010 Mar 1 [cited 2021 Jul 19];68(1):14–25. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098847209001579>
 76. Drugbank. Salicylic acid: Uses, Interactions, Mechanism of Action | DrugBank Online [Internet]. [cited 2021 Jul 19]. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00936>
 77. Mastromatteo M, Mastromatteo M, Conte A, Del Nobile MA. Advances in controlled release devices for food packaging applications. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2010;21(12):591–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2010.07.010>
 78. Guillard V, Issouпов V, Redl A, Gontard N. Food preservative content reduction by controlling sorbic acid release from a superficial coating. *Innov Food Sci Emerg Technol* [Internet]. 2009;10(1):108–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2008.07.001>
 79. Qian L, Guan Y, He B, Xiao H. Synergy of wet strength and antimicrobial activity of cellulose paper induced by a novel polymer complex. *Mater Lett*. 2008;62(21–22):3610–2.
 80. Ignatova MG, Manolova NE, Rashkov IB, Markova ND, Toshkova RA, Georgieva AK, et al. Poly(3-hydroxybutyrate)/caffeic acid electrospun fibrous materials coated with polyelectrolyte complex and their antibacterial activity and in vitro antitumor effect against HeLa cells. *Mater Sci Eng C*. 2016;65:379–92.
 81. Qian L, Dong C, Liang X, He B, Xiao H. Polyelectrolyte complex containing antimicrobial guanidine-based polymer and its adsorption on cellulose fibers. *Holzforschung*. 2014;68(1):103–11.
 82. Amara C Ben, Eghbal N, Degraeve P, Gharsallaoui A. Using complex coacervation for lysozyme encapsulation by spray-drying. *J Food Eng*. 2016;50–7.
 83. Bajpai SK, Jyotishi P, Bajpai M. Synthesis of nanosilver loaded chitosan/poly(acrylamide-co-itaconic acid) based inter-polyelectrolyte complex films for antimicrobial applications. *Carbohydr Polym*. 2016;154:223–30.
 84. Yu H, Liu L, Li X, Zhou R, Yan S, Li C, et al. Fabrication of polylysine based antibacterial coating for catheters by facile electrostatic interaction. *Chem Eng J* [Internet]. 2019 Mar 15 [cited 2019 Apr 5];360:1030–41. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138589471832120X#s0140>
 85. Dubashynskaya N V, Raik S V, Dubrovskii YA, Shcherbakova ES, Demyanova E V, Shasherina AY, et al. Hyaluronan/colistin polyelectrolyte complexes: Promising anti-infective drug delivery systems. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2021 [cited 2021 Nov 7];187:157–65. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.114>
 86. Ensandoost R, Izadi-Vasafi H, Adelnia H. Anti-Bacterial Activity of Chitosan-Alginate-Poly (Vinyl Alcohol) Hydrogel Containing Entrapped Peppermint Essential Oil. *J Macromol Sci Part B* [Internet]. 2021 Nov 2 [cited 2021 Nov 7];1–13. Available from: <https://www-tandfonline-com.ezproxy.unal.edu.co/doi/abs/10.1080/00222348.2021.1999043>
 87. ROHM & HAAS. Antibacterial preservatives for aqueous polymer dispersions or emulsions [Internet]. US; 1142629, 1969. Available from: <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=GB135326010&recNum=6&maxRec=8&office=&prevFilter=&sortOption=Pub+Date+Desc&queryString=ALL%3A%281142629%29&tab=NationalBiblio>

88. Abe K, Tanaka M, Inaba S, Akimoto M. Use of a polyelectrolyte complex antibacterial agent and antibacterial material [Internet]. Japon; EP0528035, 1993. p. 52. Available from:
<https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=EP12381414&redirectedID=true>
89. Park J. Polymeric antimicrobials and their use in pharmaceutical compositions [Internet]. US; 5300287, 1994. p. 5. Available from: <http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO2&Sect2=HITOFF&p=1&u=%2Fnetahtml%2FPTO%2Fsearch-adv.htm&r=31&f=G&l=50&d=PALL&S1=5,300,287&OS=5,300,287&RS=5,300,287>
90. Abe K, Tanaka M, Inaba S, Akimoto M. Polyelectrolyte complex antibacterial agent in antibacterial material [Internet]. Japon; 5578598, 1996. p. 23. Available from: <http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect2=PTO1&Sect2=HITOFF&p=1&u=/netahtml/PTO/search-bool.html&r=1&f=G&l=50&d=PALL&RefSrch=yes&Query=PN/5578598>
91. Zhou B, Ochomog M. Antimicrobial cleaning composition [Internet]. US; 6017561, 2000. p. 1–8. Available from: <http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect2=PTO1&Sect2=HITOFF&p=1&u=%2Fnetahtml%2FPTO%2Fsearch-bool.html&r=1&f=G&l=50&d=PALL&RefSrch=yes&Query=PN%2F6017561>
92. Hodge DJ, Pears DA, Gerrard JJ, Mcgeechan PL. Composition comprising an acidic copolymer and an antimicrobial agent and use thereof [Internet]. UK; WO2004100664, 2004. p. 1–46. Available from: <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2004100664&recNum=2&office=&queryString=ALL%3A%28WO2004%2F100664+%29&prevFilter=&sortOption=Pub+Date+Desc&maxRec=2>
93. Nguyen-Kim S, Schuch H, Kaiser T, Wood C. Ampholytic copolymer and use thereof [Internet]. US; 20060183822, 2006. p. 1–26. Available from: <http://appft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PG01&p=1&u=%2Fnetahtml%2FPTO%2Fsrchnum.html&r=1&f=G&l=50&s1=%2220060183822%22.PG NR.&OS=DN/20060183822&RS=DN/20060183822>
94. Khaled M, Abu-Sharkh B. Antimicrobial thin film coating and method of forming the same [Internet]. US; 20070243237, 2007. p. 1–16. Available from: <http://appft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PG01&p=1&u=%2Fnetahtml%2FPTO%2Fsrchnum.html&r=1&f=G&l=50&s1=%2220070243237%22.PG NR.&OS=DN/20070243237&RS=DN/20070243237>
95. Toreki W, Liesenfeld B, Moore D, Schultz G, Olderman G, Staab G. Absorbent substrate with a non-leaching antimicrobial activity and a controlled-release bioactive agent. [Internet]. US; 20080206293, 2008. p. 1–32. Available from: <http://appft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PG01&p=1&u=%2Fnetahtml%2FPTO%2Fsrchnum.html&r=1&f=G&l=50&s1=%2220080206293%22.PG NR.&OS=DN/20080206293&RS=DN/20080206293>
96. Schlenoff JB. Biocompatible polyelectrolyte complexes and methods of use in wound healing. [Internet]. PCT Int. Appl. US; 9352068, 2016. p. 1–32. Available from: <http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO2&Sect2=HITOFF&u=%2Fnetahtml%2FPTO%2Fsearch-adv.htm&r=1&f=G&l=50&d=PALL&p=1&S1=9,352,068&OS=9,352,068&RS=9,352,068>
97. William T, Moore DN, Liesenfeld B, Mikhaylova A, Olderman GM. Polyelectrolyte

- complex for imparting antimicrobial properties to a substrate [Internet]. US; 8545862, 2013. p. 1–18. Available from: <http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO2&Sect2=HITOFF&p=1&u=%2Fnetacgi%2FPTO%2Fsearch-adv.htm&r=1&f=G&l=50&d=PALL&S1=8,545,862&OS=8,545,862&RS=8,545,862>
98. Scheuing DR, Lestage DJ, Bennett CW, Knock MM, Scales CW, Smith WL, et al. Polyelectrolyte complexes [Internet]. US; 9,273,220, 2016. p. 1–32. Available from: <http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PALL&p=1&u=%252Fnetacgi%252FPTO%252Fsrchnum.htm&r=1&f=G&l=50&s1=9273220.PN.&OS=PN/9273220&RS=PN/9273220>
99. Cheow WS, Hadinoto K. Green Amorphous Nanoplex as a New Supersaturating Drug Delivery System. *Langmuir* [Internet]. 2012 Apr 17;28(15):6265–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22439687>
100. Grehan L, Killion JA, Devine DM, Kenny EK, Devery S, Higginbotham CL, et al. International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials The Development of Hot Melt Extruded Biocompatible Controlled Release Drug Delivery Devices. *Int J Polym Mater Polym Biomater* [Internet]. 2014;639(63):476–85. Available from: <http://www.tandfonline.com/loi/gpom20>
101. Li L, Baker OA, Li L. Characterization of Poly(Ethylene Oxide) as a Drug Carrier in Hot-Melt Extrusion Characterization of Poly(Ethylene Oxide). *Drug Dev Ind Pharm*. 2006;32(8):991–1002.
102. Maniruzzaman M, Boateng JS, Bonnefille M, Aranyos A, Mitchell JC, Douroumis D. Taste masking of paracetamol by hot-melt extrusion: An in vitro and in vivo evaluation. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2012;80(2):433–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.10.019>
103. Saladini B, Bigucci F, Cerchiara T, Gallucci MC, Luppi B. Microparticles based on chitosan/pectin polyelectrolyte complexes for nasal delivery of tacrine hydrochloride. *Drug Deliv Transl Res* [Internet]. 2013 Feb [cited 2018 May 7];3(1):33–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25787866>
104. Zhang F, McGinity JW. Properties of Sustained-Release Tablets Prepared by Hot-Melt Extrusion. *Pharm Dev Technol*. 1999;4(2):241–50.
105. Zhu Y, Shah NH, Waseem Malick A, Infeld MH, McGinity JW. Controlled Release of a Poorly Water-Soluble Drug from Hot-Melt Extrudates Containing Acrylic Polymers. *Drug Dev Ind Pharm* [Internet]. 2006 Jan 25;32(05):569–83. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03639040500528996>
106. Charvalos E, Tzatzarakis M, Tsatsakis A, Petrikkos G. Controlled release of water-soluble polymeric complexes of sorbic acid with antifungal activities. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2001;57(5–6):770–5.
107. Lv J-M, Meng Y-C, Shi Y-G, Li Y-H, Chen J, Sheng F. Properties of epsilon-polylysine-HCl/high-methoxyl pectin polyelectrolyte complexes and their commercial application. *J Food Process Preserv* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2021 Jul 20];44(2):e14320. Available from: <https://ifst-onlinelibrary-wiley-com.ezproxy.unal.edu.co/doi/full/10.1111/jfpp.14320>
108. Ismillayli N, Andayani IGAS, Honiar R, Mariana B, Sanjaya RK, Hermanto D. Polyelectrolyte Complex (PEC) film based on chitosan as potential edible films and their antibacterial activity test. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng* [Internet]. 2020 Oct 31 [cited 2021 Jul 20];959(1):012009. Available from: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1757-899X/959/1/012009>
109. Kulig D, Zimoch-Korzycka A, Król Ż, Oziębłowski M, Jarmoluk A. Effect of Film-Forming Alginate/Chitosan Polyelectrolyte Complex on the Storage Quality of Pork. *Mol* 2017, Vol 22, Page 98 [Internet]. 2017 Jan 6 [cited 2021 Jul 20];22(1):98.

- Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/22/1/98/htm>
110. Amin KM. Polyelectrolyte complex materials from chitosan and gellan gum [Internet]. University of Wollongong Thesis Collection 1954-2016. [Wollongong]: University of Wollongong; 2011 [cited 2021 Jul 20]. Available from: <https://ro.uow.edu.au/theses/3452>
 111. Ushimaru K, Hamano Y, Katano H. Antimicrobial Activity of ϵ -Poly-L-lysine after Forming a Water-Insoluble Complex with an Anionic Surfactant. *Biomacromolecules* [Internet]. 2017 Apr 10 [cited 2021 Jul 20];18(4):1387–92. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.biomac.7b00109>
 112. Wang H, Yang B, Sun H, Sun P. Pectin-Chitosan Polyelectrolyte H. Complex Nanoparticles for Encapsulation and Controlled Release of Nisin. *Am J Polym Sci Technol* [Internet]. 2017 [cited 2021 Jul 20];3(5):82–8. Available from: <http://www.sciencepublishinggroup.com/j/ajpst>
 113. Olivera ME, Manzo RH, Alovero F, Jimenez-Kairuz AF, Ramírez-Rigo M V. Polyelectrolyte-drug ionic complexes as nanostructured drug carriers to design solid and liquid oral delivery systems. In: *Nanostructures for Oral Medicine* [Internet]. Elsevier; 2017. p. 365–408. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-47720-8/00014-6>
 114. Ellenberger DJ, Miller DA, Kucera SU, Williams RO. Improved Vemurafenib Dissolution and Pharmacokinetics as an Amorphous Solid Dispersion Produced by KinetiSol® Processing. *AAPS PharmSciTech* 2018 195 [Internet]. 2018 Mar 14 [cited 2021 Jul 20];19(5):1957–70. Available from: <https://link-springer-com.ezproxy.unal.edu.co/article/10.1208/s12249-018-0988-1>
 115. Vasconcelos T, Sarmiento B, Costa P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug Discov Today* [Internet]. 2007 Dec [cited 2017 Apr 6];12(23–24):1068–75. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644607003753>
 116. Ellenberger DJ, Miller DA, Williams RO. Expanding the Application and Formulation Space of Amorphous Solid Dispersions with KinetiSol®: a Review. *AAPS PharmSciTech* 2018 195 [Internet]. 2018 May 30 [cited 2021 Jul 20];19(5):1933–56. Available from: <https://link-springer-com.ezproxy.unal.edu.co/article/10.1208/s12249-018-1007-2>
 117. Mendonsa N, Almutairy B, Kallakunta VR, Sarabu S, Thipsay P, Bandari S, et al. Manufacturing strategies to develop amorphous solid dispersions: An overview. *J Drug Deliv Sci Technol* [Internet]. 2020;55(June 2019):101459. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101459>
 118. Arduso MS, Manzo RH, Jimenez-Kairuz AF. Comparative study of three structurally related acid polyelectrolytes as carriers of basic drugs: Carbomer, Eudragit L-100 and S-100. *Supramol Chem* [Internet]. 2010 May;22(5):289–96. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10610270903469757>
 119. Quinteros DA, Tártara LI, Palma SD, Manzo RH, Allemandi DA. 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* [Internet]. 2014 Dec 1 [cited 2019 Aug 20];103(12):3859–68. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022354915302835>
 120. Moustafine RI, Sitenkov AY, Bukhovets A V., Nasibullin SF, Appeltans B, Kabanova T V., et al. Indomethacin-containing interpolyelectrolyte complexes based on Eudragit® E PO/S 100 copolymers as a novel drug delivery system. *Int J Pharm* [Internet]. 2017 [cited 2021 Feb 19];524(1–2):121–33. Available from:

- <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517317302296><http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.03.053>
121. Rattes ALR, Oliveira WP. Spray drying conditions and encapsulating composition effects on formation and properties of sodium diclofenac microparticles. *Powder Technol* [Internet]. 2007 Jan 12 [cited 2019 Apr 8];171(1):7–14. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003259100600372X?via%3Dihub>
 122. Singh A, Van den Mooter G. Spray drying formulation of amorphous solid dispersions. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2016 May [cited 2020 Aug 4];100:27–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2015.12.010>
 123. Ní Ógáin O, Tajber L, Corrigan OI, Healy AM. Spray drying from organic solvents to prepare nanoporous/nanoparticulate microparticles of protein: excipient composites designed for oral inhalation. *J Pharm Pharmacol* [Internet]. 2012 Aug 6 [cited 2019 Apr 9];64(9):1275–90. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.2042-7158.2012.01488.x>
 124. Sosnik A, Seremeta KP. Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. *Adv Colloid Interface Sci* [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2018 Mar 16];223:40–54. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/S0001868615000767>
 125. Paudel A, Worku ZA, Meeus J, Guns S, Van den Mooter G. Manufacturing of solid dispersions of poorly water soluble drugs by spray drying: Formulation and process considerations. *Int J Pharm* [Internet]. 2013 Aug 30 [cited 2017 Nov 25];453(1):253–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22820134>
 126. Stanković M, Frijlink HW, Hinrichs WLJ. Polymeric formulations for drug release prepared by hot melt extrusion: application and characterization. *Drug Discov Today* [Internet]. 2015 Jul [cited 2017 Mar 3];20(7):812–23. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644615000343>
 127. Ghebre-Sellassie I, Martin C. Pharmaceutical extrusion technology. *Pharmaceutical Extrusion Technology*. 2003. 1–401 p.
 128. M.Karl AGKK. Hot-Melt Extrusion with BASF Pharma Polymers Extrusion Compendion 2nd Revised and Enlarged Edition. BASF; 2012. 192 p.
 129. Repka MA, Bandari S, Kallakunta VR, Vo AQ, McFall H, Pimparade MB, et al. Melt extrusion with poorly soluble drugs – An integrated review. *Int J Pharm* [Internet]. 2018 Jan 15 [cited 2020 May 24];535(1–2):68–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.10.056>
 130. Thiry J, Krier F, Evrard B. A review of pharmaceutical extrusion: Critical process parameters and scaling-up. *Int J Pharm* [Internet]. 2015 Feb;479(1):227–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.036>
 131. Knopp MM, Tajber L, Tian Y, Olesen NE, Jones DS, Kozyra A, et al. Comparative Study of Different Methods for the Prediction of Drug-Polymer Solubility. *Mol Pharm* [Internet]. 2015 Sep 8 [cited 2019 Apr 12];12(9):3408–19. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00423>
 132. Moseson DE, Taylor LS. The application of temperature-composition phase diagrams for hot melt extrusion processing of amorphous solid dispersions to prevent residual crystallinity. *Int J Pharm* [Internet]. 2018 Dec 20 [cited 2019 Apr 9];553(1–2):454–66. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517318307968?via%3Dihub>
 133. Marsac PJ, Li T, Taylor LS. Estimation of Drug–Polymer Miscibility and Solubility in Amorphous Solid Dispersions Using Experimentally Determined Interaction Parameters. *Pharm Res* [Internet]. 2009 Jan 9 [cited 2019 Apr 13];26(1):139–51. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11095-008-9721-1>

134. Prudic A, Ji Y, Sadowski G. Thermodynamic Phase Behavior of API/Polymer Solid Dispersions. *Mol Pharm* [Internet]. 2014 Jul 7 [cited 2019 Aug 28];11(7):2294–304. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/mp400729x>
135. Tao J, Sun Y, Zhang GGZ, Yu L. Solubility of Small-Molecule Crystals in Polymers: d-Mannitol in PVP, Indomethacin in PVP/VA, and Nifedipine in PVP/VA. *Pharm Res* [Internet]. 2009 Apr 4 [cited 2019 Apr 11];26(4):855–64. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11095-008-9784-z>
136. Tian Y, Booth J, Meehan E, Jones DS, Li S, Andrews GP. Construction of Drug–Polymer Thermodynamic Phase Diagrams Using Flory–Huggins Interaction Theory: Identifying the Relevance of Temperature and Drug Weight Fraction to Phase Separation within Solid Dispersions. *Mol Pharm* [Internet]. 2013 Jan 7 [cited 2019 Aug 28];10(1):236–48. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/mp300386v>
137. Marsac PJ, Shamblin SL, Taylor LS. Theoretical and Practical Approaches for Prediction of Drug–Polymer Miscibility and Solubility. *Pharm Res* [Internet]. 2006 Oct 4 [cited 2019 Apr 13];23(10):2417–26. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11095-006-9063-9>
138. Commission EP. Potentiometric titration. In: *European Pharmacopoeia*. 6th ed. Strasbourg, France: Council of Europe: Strasbourg; 2018.
139. Littringer EM, Mescher A, Eckhard S, Schröttner H, Langes C, Fries M, et al. Spray Drying of Mannitol as a Drug Carrier—The Impact of Process Parameters on Product Properties. *Dry Technol* [Internet]. 2012 Jan [cited 2019 Aug 8];30(1):114–24. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07373937.2011.620726>
140. Murtomaa M, Savolainen M, Christiansen L, Rantanen J, Laine E, Yliruusi J. Static electrification of powders during spray drying. *J Electrostat* [Internet]. 2004 Sep 1 [cited 2019 Aug 8];62(1):63–72. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304388604001196>
141. Wang A, Lu Y, Zhu R, Li S, Ma X. Effect of process parameters on the performance of spray dried hydroxyapatite microspheres. *Powder Technol* [Internet]. 2009 Apr 4 [cited 2019 Aug 8];191(1–2):1–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032591008004695>
142. Bhise KS, Dhumal RS, Paradkar AR, Kadam SS. Effect of Drying Methods on Swelling, Erosion and Drug Release from Chitosan–Naproxen Sodium Complexes. *AAPS PharmSciTech* [Internet]. 2008 Mar 29 [cited 2021 Jul 24];9(1):1–12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC18446455/?tool=EBI>
143. Sahoo NG, Abbas A, Judeh Z, Li CM, Yuen KH. Pharmaceutical technology solubility enhancement of a poorly water-soluble anti-malarial drug: Experimental design and use of a modified multifluid nozzle pilot spray drier. *J Pharm Sci* [Internet]. 2009 Jan 1 [cited 2019 Aug 9];98(1):281–96. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022354916328490>
144. Ariga GG, Nandibewoor ST, Chimatadar SA. Oxidative degradation of antibacterial drug, methylparaben, by MnVII in perchloric acid medium: A kinetic and mechanistic approach. *J Indian Chem Soc*. 2015;92(11):1705–14.
145. Unal B, Durmus Z, Kavas H, Baykal A, Toprak MS. Synthesis, conductivity and dielectric characterization of salicylic acid–Fe₃O₄ nanocomposite. *Mater Chem Phys* [Internet]. 2010 Sep;123(1):184–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matchemphys.2010.03.080>
146. Juppo AM, Boissier C, Khoo C. Evaluation of solid dispersion particles prepared with SEDS. *Int J Pharm* [Internet]. 2003 Jan 16 [cited 2019 Aug 19];250(2):385–401. Available from: <https://www.sciencedirect.com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/S037851730200577X>

147. Sri SR. Formulation and Evaluation of Nizatidine Microspheres. *Res J Sci Technol* [Internet]. 2019;11(1):14. Available from: <http://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:rjst&volume=11&issue=1&article=003>
148. Guzman ML, Soria EA, Laino C, Manzo RH, Olivera ME. 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* [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2019 Aug 20];107:263–72. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641116302946>
149. Moustafine RI, Kemenova VA, Van den Mooter G. Characteristics of interpolyelectrolyte complexes of Eudragit E 100 with sodium alginate. *Int J Pharm* [Internet]. 2005 Apr [cited 2016 Nov 21];294(1–2):113–20. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517305000992>
150. Quinteros DA, Manzo RH, Allemandi DA. Interaction between Eudragit® E100 and anionic drugs: Addition of anionic polyelectrolytes and their influence on drug release performance. *J Pharm Sci* [Internet]. 2011 Nov [cited 2016 Sep 4];100(11):4664–73. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915318347>
151. Anderson BD. Predicting Solubility/Miscibility in Amorphous Dispersions: It Is Time to Move Beyond Regular Solution Theories. Vol. 107, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Elsevier B.V.; 2018. p. 24–33.
152. Li Y, Pang H, Guo Z, Lin L, Dong Y, Li G, et al. Interactions between drugs and polymers influencing hot melt extrusion. *J Pharm Pharmacol* [Internet]. 2014 Feb 1 [cited 2020 Jun 2];66(2):148–66. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jphp.12183>
153. Tian Y, Jacobs E, Jones DS, McCoy CP, Wu H, Andrews GP. The design and development of high drug loading amorphous solid dispersion for hot-melt extrusion platform. *Int J Pharm* [Internet]. 2020 Aug [cited 2021 Mar 8];586:119545. Available from: www.elsevier.com/locate/ijpharm
154. Mamidi HK, Rohera BD. Application of Thermodynamic Phase Diagrams and Gibbs Free Energy of Mixing for Screening of Polymers for Their Use in Amorphous Solid Dispersion Formulation of a Non-Glass-Forming Drug. *J Pharm Sci*. 2021 Jul 1;110(7):2703–17.
155. Wiranidchamong C, Tucker IG, Rades T, Kulvanich P. Miscibility and interactions between 17 β -estradiol and Eudragit® RS in solid dispersion. *J Pharm Sci*. 2008 Nov 1;97(11):4879–88.
156. Shah S, Maddineni S, Lu J, Repka MA. Melt extrusion with poorly soluble drugs. *Int J Pharm* [Internet]. 2013 Aug 30;453(1):233–52. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517312009908>
157. Alshetaili AS, Almutairy BK, Alshahrani SM, Ashour EA, Tiwari R V., Alshehri SM, et al. Optimization of hot melt extrusion parameters for sphericity and hardness of polymeric face-cut pellets. *Drug Dev Ind Pharm* [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2021 Aug 16];42(11):1833–41. Available from: [/pmc/articles/PMC5041532/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27111111/)
158. Meka VS, Sing MKG, Pichika MR, Nali SR, Kolapalli VRM, Kesharwani P. A comprehensive review on polyelectrolyte complexes. *Drug Discov Today* [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2018 Nov 21];22(11):1697–706. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644617301265>
159. United States Pharmacopeia. General Notices and Requirements. In: *United States Pharmacopeia 37 (USP 37)*. 2013. p. 1–11.
160. U.S. Department of Health and Human Services, And F and DA. Guidance for Industry Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms

- [Internet]. Vol. 20857. Rockville, MD 20857; 1997 [cited 2021 Feb 3]. Available from: <http://www.fda.gov/cder/guidance.htm>
161. Fawcett TG, Gates-Rector S, Gindhart AM, Rost M, Kabekkodu SN, Blanton JR, et al. A practical guide to pharmaceutical analyses using X-ray powder diffraction. *Powder Diffr* [Internet]. 2019 Jun 15;34(2):164–83. Available from: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S088571561900023X/type/journal_article
 162. Maruyama SA, Lisboa FDS, Ramos LP, Wypych F. Alkaline earth layered benzoates as reusable heterogeneous catalysts for the methyl esterification of benzoic acid. *Quim Nova* [Internet]. 2012 [cited 2020 Jul 20];35(8):1510–6. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012000800004&lng=en&nrm=iso&tlng=en
 163. Yamamura S, Momose Y. Characterization of monoclinic crystals in tablets by pattern-fitting procedure using X-ray powder diffraction data. *Int J Pharm*. 2003 Jun 18;259(1–2):27–37.
 164. Przybyłek M, Ziłkowska D, Kobierski M, Mroczyńska K, Cysewski P. Utilization of oriented crystal growth for screening of aromatic carboxylic acids cocrystallization with urea. *J Cryst Growth*. 2016;433(January):128–38.
 165. Elbagerma MA, Edwards HGM, Alajtal AI, Scowen IJ. Identification and Structural Studies of the Salicylic Acid DL-Phenylalanine Cocrystal. *Am J Chem Mater Sci*. 2018;4(6):49–58.
 166. Liu H, Wang P, Zhang X, Shen F, Gogos CG. Effects of extrusion process parameters on the dissolution behavior of indomethacin in Eudragit® E PO solid dispersions. *Int J Pharm* [Internet]. 2010 Jan [cited 2020 Aug 6];383(1–2):161–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517309006164>
 167. He H, Yang R, Tang X. In vitro and in vivo evaluation of fenofibrate solid dispersion prepared by hot-melt extrusion. *Drug Dev Ind Pharm* [Internet]. 2010 Jun 6 [cited 2020 Aug 4];36(6):681–7. Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=iddi20http://www.informapharmascience.com/ddi>
 168. Pradhan R, Kim SY, Yong CS, Kim JO. Preparation and characterization of spray-dried valsartan-loaded Eudragit® E PO solid dispersion microparticles. *Asian J Pharm Sci* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2020 Aug 4];11(6):744–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2016.05.002>
 169. Jung JY, Yoo SD, Lee SH, Kim KH, Yoon DS, Lee KH. Enhanced solubility and dissolution rate of itraconazole by a solid dispersion technique. *Int J Pharm* [Internet]. 1999 Oct 5 [cited 2020 Aug 6];187(2):209–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10502627/>
 170. Sandhu H, Shah N, Chokshi H, Malick AW. Amorphous Solid Dispersions [Internet]. Shah N, Sandhu H, Choi DS, Chokshi H, Malick AW, editors. New York, NY: Springer New York; 2014. 91–122 p. (Advances in Delivery Science and Technology). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-1598-9_3
 171. Chiou WL, Riegelman S. Pharmaceutical Applications of Solid Dispersion Systems. *J Pharm Sci* [Internet]. 1971 Sep 1 [cited 2020 Aug 3];60(9):1281–302. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915380850>
 172. Al-Shdefat R, Ali BE, Anwer MK, Fayed MH, Alalaiwe A, Soliman GA. Sildenafil citrate-Glycyrrhizin/Eudragit binary spray dried microparticles: A sexual behavior studies on male rats. *J Drug Deliv Sci Technol* [Internet]. 2016 Dec [cited 2020 Aug 4];36:141–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2016.10.004>
 173. Six K, Murphy J, Weuts I, Craig DQM, Verreck G, Peeters J, et al. Identification of

- phase separation in solid dispersions of itraconazole and eudragit® E100 using microthermal analysis. *Pharm Res* [Internet]. 2003 Jan;20(1):135–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12608548>
174. Ainurofiq A, Mauludin R, Mudhakar D, Soewandhi SN. A novel desloratadine-benzoic acid co-amorphous solid: Preparation, characterization, and stability evaluation. *Pharmaceutics*. 2018 Sep 1;10(3).
 175. Royal Society of Chemistry. Benzoic acid - ChemSpider [Internet]. ChemSpider Search and share chemistry. 2020 [cited 2020 Jul 10]. Available from: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.238.html>
 176. PubChem. Salicylic acid | HOC6H4COOH - PubChem [Internet]. U.S. National Library of Medicine. 2020 [cited 2020 Aug 21]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Salicylic-acid>
 177. Six K, Leuner C, Dressman J, Verreck G, Peeters J, Blaton N, et al. Thermal properties of hot-stage extrudates of itraconazole and eudragit E100. Phase separation and polymorphism. *J Therm Anal Calorim* [Internet]. 2002 [cited 2019 Apr 13];68(2):591–601. Available from: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1023%2FA%3A1016056222881.pdf>
 178. Kawakami K, Bi Y, Yoshihashi Y, Sugano K, Terada K. Time-dependent phase separation of amorphous solid dispersions: Implications for accelerated stability studies. *J Drug Deliv Sci Technol* [Internet]. 2018 [cited 2020 Aug 12];46:197–206. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.05.016>
 179. Boersen N, Brown C, Dinunzio J, Johnson D, Marsac P, Meyer R, et al. Hot-Melt Extrusion : The Process-Product- Performance Interplay. In 2015. p. 345–81.
 180. Huang Y, Dai W-G. Fundamental aspects of solid dispersion technology for poorly soluble drugs. *Acta Pharm Sin B* [Internet]. 2014 Feb 1 [cited 2019 Apr 9];4(1):18–25. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211383513000968>
 181. Lang B, McGinity JW, Williams III RO. Drug Development and Industrial Pharmacy Hot-melt extrusion – basic principles and pharmaceutical applications Hot-melt extrusion – basic principles and pharmaceutical applications. *Drug Dev Ind Pharm* [Internet]. 2014;409(409):1133–55. Available from: <http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=iddi20>
 182. Sarode AL, Sandhu H, Shah N, Malick W, Zia H. Hot melt extrusion (HME) for amorphous solid dispersions: Predictive tools for processing and impact of drug–polymer interactions on supersaturation. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2013 Feb [cited 2020 Aug 12];48(3):371–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2012.12.012>
 183. Zhang J, Bunker M, Parker A, Madden-Smith CE, Patel N, Roberts CJ. The stability of solid dispersions of felodipine in polyvinylpyrrolidone characterized by nanothermal analysis. *Int J Pharm*. 2011 Jul 29;414(1–2):210–7.
 184. Qi S, Gryczke A, Belton P, Craig DQM. Characterisation of solid dispersions of paracetamol and EUDRAGIT E prepared by hot-melt extrusion using thermal, microthermal and spectroscopic analysis. *Int J Pharm*. 2008;354:158–67.
 185. Palazi E, Karavas E, Barmplexis P, Kostoglou M, Nanaki S, Christodoulou E, et al. Melt extrusion process for adjusting drug release of poorly water soluble drug felodipine using different polymer matrices. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2019 Feb 25];114:332–45. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098718300046?via%3Dihub>
 186. Ma X, Williams RO. Characterization of amorphous solid dispersions: An update. *J Drug Deliv Sci Technol* [Internet]. 2019 Apr [cited 2020 Aug 12];50:113–24. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.01.017>

187. Chemspider. 4-Hydroxybenzoic acid | C₇H₆O₃ | ChemSpider [Internet]. 2019 [cited 2020 Aug 18]. Available from: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.132.html>
188. chemspider. Salicylic acid | C₇H₆O₃ | ChemSpider [Internet]. Chemspider- Rpyal Society of Chemistry. 2016 [cited 2020 Aug 18]. p. 1. Available from: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.331.html>
189. University P. Size of Atoms [Internet]. 2012 [cited 2020 Aug 18]. p. 1–7. Available from: <http://chemed.chem.purdue.edu/genchem/topicreview/bp/ch7/size.html>
190. Javeer SD, Patole R, Amin P. Enhanced solubility and dissolution of simvastatin by HPMC-based solid dispersions prepared by hot melt extrusion and spray-drying method. *J Pharm Investig*. 2013;43(6):471–80.
191. Zoppi A, Linck YG, Monti GA, Genovese DB, Jimenez Kairuz ÁF, Manzo RH, et al. Studies of pilocarpine:carbomer intermolecular interactions. *Int J Pharm*. 2012;427(2):252–9.
192. Lenz E, Löbmann K, Rades T, Knop K, Kleinebudde P. Hot Melt Extrusion and Spray Drying of Co-amorphous Indomethacin-Arginine With Polymers. *J Pharm Sci* [Internet]. 2017 Jan;106(1):302–12. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354916417648>
193. Song Y, Zemlyanov D, Chen X, Su Z, Nie H, Lubach JW, et al. Acid-base interactions in amorphous solid dispersions of lumefantrine prepared by spray-drying and hot-melt extrusion using X-ray photoelectron spectroscopy. *Int J Pharm* [Internet]. 2016 [cited 2020 Aug 21];514(2):456–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.06.126>
194. Song Y, Zemlyanov D, Chen X, Nie H, Su Z, Fang K, et al. Acid–Base Interactions of Polystyrene Sulfonic Acid in Amorphous Solid Dispersions Using a Combined UV/FTIR/XPS/ssNMR Study. *Mol Pharm* [Internet]. 2016 Feb [cited 2019 May 22];13(2):483–92. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00708>
195. Stevens JS, Byard SJ, Muryn CA, Schroeder SLM. Identification of Protonation State by XPS, Solid-State NMR, and DFT: Characterization of the Nature of a New Theophylline Complex by Experimental and Computational Methods. *J Phys Chem B* [Internet]. 2010 Nov 11;114(44):13961–9. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp106465u>
196. Bukhovets A V, Fotaki N, Khutoryanskiy V V, Moustafine RI. Interpolymer Complexes of Eudragit® Copolymers as Novel Carriers for Colon-Specific Drug Delivery. *Polymers (Basel)* [Internet]. 2020 Jun 30 [cited 2021 Aug 11];12(7):1459. Available from: www.mdpi.com/journal/polymers
197. Stevens JS, Byard SJ, Seaton CC, Sadiq G, Davey RJ, Schroeder SLM. Proton transfer and hydrogen bonding in the organic solid state: a combined XRD/XPS/ssNMR study of 17 organic acid–base complexes. *Phys Chem Chem Phys* [Internet]. 2014 Jan 21 [cited 2020 Jun 2];16(3):1150–60. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C3CP53907E>
198. Rotich MK, Glass BD, Brown ME. Thermal studies on some substituted aminobenzoic acids. In: *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2001. p. 681–8.
199. Stevens JS, Schroeder SLM, Light D. *Encyclopedia of Physical Organic Chemistry, 5 Volume Set* [Internet]. Wang Z, editor. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2016. 1–53 p. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118468586>
200. Hendrickson DN, Hollander JM, Jolly WL. Nitrogen Is electron binding energies. Correlations with molecular orbital calculated nitrogen charges. *Inorg Chem* [Internet]. 1969 Dec 1;8(12):2642–7. Available from:

- <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ic50082a020>
201. Maniruzzaman M, Morgan DJ, Mendham AP, Pang J, Snowden MJ, Douroumis D. Drug-polymer intermolecular interactions in hot-melt extruded solid dispersions. *Int J Pharm* [Internet]. 2013 Feb 25 [cited 2018 Oct 16];443(1–2):199–208. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517312010642>
 202. Mahmah O, Tabbakh R, Kelly A, Paradkar A. A comparative study of the effect of spray drying and hot-melt extrusion on the properties of amorphous solid dispersions containing felodipine. *J Pharm Pharmacol* [Internet]. 2014 Feb [cited 2020 Jun 23];66(2):275–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24433426/>
 203. Sóti PL, Bocz K, Pataki H, Eke Z, Farkas A, Verreck G, et al. Comparison of spray drying, electroblowing and electrospinning for preparation of Eudragit E and itraconazole solid dispersions. *Int J Pharm* [Internet]. 2015;494(1):23–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.07.076>
 204. Carey FA, Sundberg RJ. Chemical Bonding and Molecular Structure. In: *Advanced Organic Chemistry* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2007 [cited 2021 Aug 15]. p. 1–117. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-44899-2_1
 205. Bruce C, Fegely KA, Rajabi-Siahboomi AR, McGinity JW. Crystal growth formation in melt extrudates. *Int J Pharm* [Internet]. 2007 Aug 16 [cited 2020 Oct 12];341(1–2):162–72. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517307003201>
 206. Martinez-Marcos L, Lamprou DA, McBurney RT, Halbert GW. A novel hot-melt extrusion formulation of albendazole for increasing dissolution properties. *Int J Pharm* [Internet]. 2016 Feb 29 [cited 2021 Nov 15];499(1–2):175–85. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517316300059>
 207. Michael E. Aulton. *Pharmaceuticals The design and manufacture of medicine*. 3era ed. Edinburgh, New York: Churchill Livingstone; 2007. 763 p.
 208. Ekdahl A, Mudie D, Malewski D, Amidon G, Goodwin A. Pharmaceuticals, Drug Delivery and Pharmaceutical Technology Effect of Spray-Dried Particle Morphology on Mechanical and Flow Properties of Felodipine in PVP VA Amorphous Solid Dispersions. *J Pharm Sci* [Internet]. 2019 [cited 2021 Aug 16];108:3657–66. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.08.008>.
 209. Sester C, Ofriam F, Lebaz N, Gagnière E, Mangin D, Elaissari A. pH-Sensitive methacrylic acid–methyl methacrylate copolymer Eudragit L100 and dimethylaminoethyl methacrylate, butyl methacrylate, and methyl methacrylate tri-copolymer Eudragit E100. *Polym Adv Technol* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2021 Aug 17];31(3):440–50. Available from: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02342633>
 210. Vehring R. Pharmaceutical particle engineering via spray drying. *Pharm Res* [Internet]. 2008 May [cited 2017 Nov 25];25(5):999–1022. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18040761>
 211. Iyer R, Hegde S, Zhang YE, Dinunzio J, Singhal D, Malick A, et al. The impact of hot melt extrusion and spray drying on mechanical properties and tableting indices of materials used in pharmaceutical development. *J Pharm Sci*. 2013;102(10):3604–13.
 212. Elversson J, Millqvist-Fureby A, Alderborn G, Elofsson U. Droplet and particle size relationship and shell thickness of inhalable lactose particles during spray drying. *J Pharm Sci* [Internet]. 2003 Apr 1 [cited 2020 Oct 26];92(4):900–10. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354916312187>
 213. Mönckedieck M, Kamplade J, Fakner P, Urbanetz NA, Walzel P, Steckel H, et al. Spray drying of mannitol carrier particles with defined morphology and flow characteristics for dry powder inhalation. <https://doi-org.ezproxy.unal.edu.co/101080/0737393720171281291> [Internet]. 2017 Nov 18 [cited 2021 Aug 18];35(15):1843–57. Available from: <https://www.tandfonline->

- com.ezproxy.unal.edu.co/doi/abs/10.1080/07373937.2017.1281291
214. Viswanathan P, Muralidaran Y, Ragavan G. Challenges in oral drug delivery: a nano-based strategy to overcome. In: Nanostructures for Oral Medicine [Internet]. Elsevier; 2017. p. 173–201. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-47720-8/00008-0>
 215. Sun YE, Tao J, Zhang GGZ, Yu L. Solubilities of crystalline drugs in polymers: An improved analytical method and comparison of solubilities of indomethacin and nifedipine in PVP, PVP/VA, and PVAc. *J Pharm Sci* [Internet]. 2010 Sep 1 [cited 2019 Apr 23];99(9):4023–31. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jps.22251>
 216. Dong B, Hadinoto K. Carboxymethyl cellulose is a superior polyanion to dextran sulfate in stabilizing and enhancing the solubility of amorphous drug-polyelectrolyte nanoparticle complex. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2019 [cited 2021 Feb 25];139:500–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.023>
 217. Danda LJ de A, Batista L de M, Melo VCS, Soares Sobrinho JL, Soares MF de LR. Combining amorphous solid dispersions for improved kinetic solubility of posaconazole simultaneously released from soluble PVP/VA64 and an insoluble ammonio methacrylate copolymer. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2019 [cited 2021 Feb 25];133:79–85. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.03.012>
 218. Jayasuriya AC. Production of micro- and nanoscale chitosan particles for biomedical applications. In: Chitosan Based Biomaterials [Internet]. Elsevier; 2017. p. 185–209. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100230-8.00008-X>
 219. Sundaramurthy A. Responsive polyelectrolyte multilayer nanofilms for drug delivery applications. In: Stimuli Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery Applications, Volume 1 [Internet]. Elsevier; 2018. p. 247–66. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101997-9.00013-8>
 220. Rowe RC, Sheskey PJ, Owen SC, Association AP. Handbook of Pharmaceutical Excipients [Internet]. Pharmaceut. Pharmaceutical Press; 2006. 918 p. Available from: <https://books.google.com.co/books?id=BGJqAAAAMAAJ>
 221. Brouwers J, Brewster ME, Augustijns P. Supersaturating drug delivery systems: The answer to solubility-limited oral bioavailability? Vol. 98, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. John Wiley and Sons Inc.; 2009. p. 2549–72.
 222. Wu D, Delair T. Stabilization of chitosan/hyaluronan colloidal polyelectrolyte complexes in physiological conditions. *Carbohydr Polym*. 2015 Mar 30;119:149–58.
 223. Mechtaeva EV, Zorin IM, Gavrilova DA, Fetin PA, Zorina NA, Bilibin AY. Polyelectrolyte complexes of polyacrylic acid with oligovalent organic counterions. *J Mol Liq* [Internet]. 2019 Nov [cited 2021 Aug 19];293:111418. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111418>
 224. Tan DK, Davis DA, Miller DA, Williams RO, Nokhodchi A. Innovations in Thermal Processing: Hot-Melt Extrusion and KinetiSol® Dispersing. *AAPS PharmSciTech* [Internet]. 2020 Nov 8 [cited 2021 Jan 29];21(8):312. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33161479>
 225. Saboo S, Mugheirbi NA, Zemlyanov DY, Kestur US, Taylor LS. Congruent release of drug and polymer: A “sweet spot” in the dissolution of amorphous solid dispersions. *J Control Release* [Internet]. 2019 Mar 28 [cited 2020 Oct 14];298:68–82. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.01.039>
 226. Barbosa JAC, Abdelsadig MSE, Conway BR, Merchant HA. Using zeta potential to study the ionisation behaviour of polymers employed in modified-release dosage forms and estimating their pKa. *Int J Pharm X* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2020 Sep 27];1:100024. Available from:

- <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2590156719300386>
227. Anandan K, Kolandaivel P, Kumaresan R. Molecular structural conformations and hydration of internally hydrogen-bonded salicylic acid: Ab initio and DFT studies. *Int J Quantum Chem.* 2005;103(2):127–39.
228. Catalán J, Ignacio Fernández-Alonso J. A theoretical study of the stereochemistry of the intramolecular hydrogen bond of salicylic acid. *J Mol Struct.* 1975;27(1):59–65.
229. Denisov GS, Golubev NS, Schreiber VM, Shajakhmedov SS, Shurukhina A V. Effect of intermolecular hydrogen bonding and proton transfer on fluorescence of salicylic acid. *J Mol Struct.* 1997;436–437(97):153–60.
230. PubChem. Phosphate | O4P-3 - PubChem [Internet]. PubChem. 2020 [cited 2021 Nov 16]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1061#section=Computed-Properties>
231. PubChem. Hydroxide | HO- - PubChem [Internet]. PubChem. 2020 [cited 2021 Nov 16]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/961#section=Computed-Properties>
232. Orienti I, Zuccari G, Carosio R, G. Montaldo P. Improvement of aqueous solubility of fenretinide and other hydrophobic anti-tumor drugs by complexation with amphiphilic dextrans. *Drug Deliv.* 2009;16(7):389–98.
233. Lim LM, Hadinoto K. Enhancing the stability of amorphous drug-polyelectrolyte nanoparticle complex using a secondary small-molecule drug as the stabilizer: A case study of ibuprofen-stabilized curcumin-chitosan nanoplex. *Int J Pharm* [Internet]. 2020 Feb [cited 2021 Mar 5];575:119007. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.119007>
234. Beneš M, Pekárek T, Beránek J, Havlíček J, Krejčík L, Šimek M, et al. Methods for the preparation of amorphous solid dispersions – A comparative study. *J Drug Deliv Sci Technol* [Internet]. 2017 [cited 2020 Aug 21];38:125–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2017.02.005>
235. Linares V, Yarcé CJ, Echeverri JD, Galeano E, Salamanca CH. Relationship between Degree of Polymeric Ionisation and Hydrolytic Degradation of Eudragit® E Polymers under Extreme Acid Conditions. *Polymers (Basel)* [Internet]. 2019 Jun 7 [cited 2021 Feb 22];11(6):1010. Available from: www.mdpi.com/journal/polymers
236. Angel V. Delgado FJA. Electrokinetic Phenomena and Their Experimental Determination: An Overview. In: *Interfacial Electrokinetics and Electrophoresis* [Internet]. CRC Press; 2001 [cited 2021 Feb 17]. p. 21–74. Available from: <https://www.taylorfrancis.com/chapters/electrokinetic-phenomena-experimental-determination-overview-angel-delgado-francisco-arroyo/e/10.1201/9781482294668-3>
237. Dukhin AS, Xu R. Zeta-potential measurements. In: *Characterization of Nanoparticles* [Internet]. Elsevier; 2020 [cited 2021 Feb 16]. p. 213–24. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128141823000146>
238. ISO. ISO 13099-1:2012 - Colloidal systems -- Methods for zeta-potential determination -- Part 1: Electroacoustic and electrokinetic phenomena [Internet]. 2102 [cited 2021 Feb 17]. Available from: <https://www.iso.org/standard/52807.html>
239. Delgado A V, González-Caballero F, Hunter RJ, Koopal LK, Lyklema J, International Union of Pure and Applied Chemistry P and BCDITR. Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. *J Colloid Interface Sci* [Internet]. 2007 May 15 [cited 2021 Feb 17];309(2):194–224. Available from: www.elsevier.com/locate/jcis
240. Ohshima H. Electrophoresis of soft particles. *Adv Colloid Interface Sci* [Internet]. 1995 Dec [cited 2021 Feb 17];62(2–3):189–235. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/222159197>

241. Ohshima H. Electrophoresis of soft particles: Analytic approximations. *Electrophoresis*. 2006;27(3):526–33.
242. Malvern Instruments. Manual: Zetasizer Nano user manual (English) MAN0485. 1st ed. Malvern, editor. Worcestershire: Malvern Instruments Ltd; 2013. 250 p.
243. Alarcón Ramirez LP. Estudio de la Interacción entre los Grupos Fosfato del Ácido Desoxirribonucleico y Fármacos modelo que poseen Grupos Básicos [Internet]. Universidad Nacional de Córdoba; 2017 [cited 2021 Jan 15]. Available from: <https://rdu.unc.edu.ar/handle/11086/15644>
244. Palena MC, García MC, Manzo RH, Jimenez-Kairuz AF. Self-organized drug-interpolyelectrolyte nanocomplexes loaded with anionic drugs. Characterization and in vitro release evaluation. *J Drug Deliv Sci Technol* [Internet]. 2015 Dec 1 [cited 2020 Jul 22];30:45–53. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1773224715300265>
245. Salamanca CH, Castillo DF, Villada JD, Rivera GR. Physicochemical characterization of in situ drug-polymer nanocomplex formed between zwitterionic drug and ionomeric material in aqueous solution. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2017;72:405–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.097>
246. Montaña JA, Perez LD, Baena Y. A pH-responsive drug delivery matrix from an interpolyelectrolyte complex: preparation and pharmacotechnical properties. *Brazilian J Pharm Sci* [Internet]. 2018 Jul 26 [cited 2021 Feb 19];54(2):17183. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/s2175-97902018000217183>
247. Ofriam F, Lebaz N, Gagnière É, Mangin D, Elaissari A. Polymethylmethacrylate derivatives Eudragit E100 and L100: Interactions and complexation with surfactants. *Polym Adv Technol*. 2021;32(1):379–90.
248. Quinteros DA. Desarrollo de nuevas estrategias de formulación de fármacos mediante el acomplejamiento con polielectrolitos. [s.n.]; 2010.
249. Dillen K, Vandervoort J, Van den Mooter G, Ludwig A. Evaluation of ciprofloxacin-loaded Eudragit® RS100 or RL100/PLGA nanoparticles. *Int J Pharm* [Internet]. 2006 Jan [cited 2017 May 5];314(1):72–82. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517303005076>
250. Bijukumar D, Choonara YE, Murugan K, Choonara BF, Kumar P, du Toit LC, et al. Design of an Inflammation-Sensitive Polyelectrolyte-Based Topical Drug Delivery System for Arthritis. *AAPS PharmSciTech* [Internet]. 2016 Oct 30 [cited 2021 Jan 14];17(5):1075–85. Available from: <http://link.springer.com/10.1208/s12249-015-0434-6>
251. Li J, Lee IW, Shin GH, Chen X, Park HJ. Curcumin-Eudragit® E PO solid dispersion: A simple and potent method to solve the problems of curcumin. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2015 Aug [cited 2021 Feb 23];94:322–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.06.002>
252. Montero N, Alhaji MJ, Sierra M, Oñate-Garzon J, Yarce CJ, Salamanca CH. Development of Polyelectrolyte Complex Nanoparticles-PECNs Loaded with Ampicillin by Means of Polyelectrolyte Complexation and Ultra-High Pressure Homogenization (UHPH). *Polymers (Basel)* [Internet]. 2020 May 20;12(5):1168. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4360/12/5/1168>
253. Simon A, Amaro MI, Healy AM, Cabral LM, de Sousa VP. Comparative evaluation of rivastigmine permeation from a transdermal system in the Franz cell using synthetic membranes and pig ear skin with in vivo-in vitro correlation. *Int J Pharm* [Internet]. 2016 Oct;512(1):234–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.08.052>
254. Ng SF, Rouse JJ, Sanderson FD, Meidan V, Eccleston GM. Validation of a static

- Franz diffusion cell system for in vitro permeation studies. AAPS PharmSciTech [Internet]. 2010 Sep 15 [cited 2021 Jan 13];11(3):1432–41. Available from: <http://link.springer.com/10.1208/s12249-010-9522-9>
255. Mattiasson J. Method development of an in vitro vertical Franz diffusion cell system to assess permeation of cosmetic active ingredients [Internet]. 2020 [cited 2021 Jan 13]. Available from: <http://www.teknat.uu.se/student>
256. Peppas NA, Narasimhan B. Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems. J Control Release [Internet]. 2014 Sep 28 [cited 2021 Jan 13];190:75–81. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365914004507>
257. Siepmann J, Peppas NA. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). Adv Drug Deliv Rev [Internet]. 2012 Dec 1 [cited 2021 Jan 13];64(SUPPL.):163–74. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X12002888>
258. Bruschi ML. Mathematical models of drug release. Strateg to Modify Drug Release from Pharm Syst [Internet]. 2015;63–86. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081000922000059>
259. Higuchi T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. J Pharm Sci [Internet]. 1963 Dec 1 [cited 2020 Jul 11];52(12):1145–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jps.2600521210>
260. Hixson AW, Crowell JH. Dependence of Reaction Velocity upon surface and Agitation: I—Theoretical Consideration. Ind Eng Chem [Internet]. 1931 Aug 1 [cited 2021 Jan 14];23(8):923–31. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ie50260a018>
261. Korsmeyer RW, Gurny R, Doelker E, Buri P, Peppas NA. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. Int J Pharm [Internet]. 1983 May 1 [cited 2020 Jul 11];15(1):25–35. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0378517383900649>
262. Seki T, Kawaguchi T, Endoh H, Ishikawa K, Juni K, Nakano M. Controlled release of 3', 5'-diester prodrugs of 5-fluoro-2'-deoxyuridine from poly-L-lactic acid microspheres. J Pharm Sci [Internet]. 1990 Nov 1 [cited 2021 Jan 14];79(11):985–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915483819>
263. Katzhendler I, Hoffman A, Goldberger A, Friedman M. Modeling of Drug Release from Erodible Tablets. J Pharm Sci. 1997 Jan 1;86(1):110–5.
264. Langenbucher F. Letters to the Editor: Linearization of dissolution rate curves by the Weibull distribution [Internet]. Vol. 24, Journal of Pharmacy and Pharmacology. John Wiley & Sons, Ltd; 1972 [cited 2021 Jan 14]. p. 979–81. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.2042-7158.1972.tb08930.x>
265. Kharat A.R. Mathematical Models of Drug Dissolution: A Review. Sch Acad J PharmacyOnline) Sch Acad J Pharm [Internet]. 2014 [cited 2021 Jan 14];3(5):2320–4206. Available from: www.saspublisher.com
266. Palena MC, Manzo RH, Jimenez-Kairuz AF. Self-organized nanoparticles based on drug-interpolyelectrolyte complexes as drug carriers. J Nanoparticle Res [Internet]. 2012 Jun 3 [cited 2021 Jan 14];14(6):867. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11051-012-0867-8>
267. Quinteros DA, Allemandi DA, Manzo RH. Equilibrium and release properties of aqueous dispersions of non-steroidal anti-inflammatory drugs complexed with polyelectrolyte eudragit E 100. Sci Pharm [Internet]. 2012 Apr 30 [cited 2021 Jan 14];80(2):487–96. Available from: <http://www.mdpi.com/2218-0532/80/2/487>
268. Battistini FD, Olivera ME, Manzo RH. Equilibrium and release properties of hyaluronic

- acid-drug complexes. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2013 Jul 16 [cited 2021 Jan 14];49(4):588–94. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928098713001619>
269. Cerchiara T, Abruzzo A, Parolin C, Vitali B, Bigucci F, Gallucci MC, et al. Microparticles based on chitosan/carboxymethylcellulose polyelectrolyte complexes for colon delivery of vancomycin. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2016 Jun 5 [cited 2018 May 7];143:124–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27083351>
270. Sonje AG, Mahajan HS. Nasal inserts containing ondansetron hydrochloride based on Chitosan-gellan gum polyelectrolyte complex: In vitro-in vivo studies. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2021 Jan 14];64:329–35. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493116302673>
271. García MC, Cuggino JC, Rosset CI, Páez PL, Strumia MC, Manzo RH, et al. 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* [Internet]. 2016;69:236–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.06.071>
272. Lefnaoui S, Moulai-Mostefa N, Yahoum MM, Gasmi SN. Design of antihistaminic transdermal films based on alginate-chitosan polyelectrolyte complexes: characterization and permeation studies. *Drug Dev Ind Pharm* [Internet]. 2018 Mar 4 [cited 2021 Jan 14];44(3):432–43. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03639045.2017.1395461>
273. Carton F, Chevalier Y, Nicoletti L, Tarnowska M, Stella B, Arpicco S, et al. Rationally designed hyaluronic acid-based nano-complexes for pentamidine delivery. *Int J Pharm* [Internet]. 2019 Sep 10 [cited 2021 Jan 14];568:118526. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517319305708>
274. Sumaila M, Ramburrun P, Kumar P, Choonara YE, Pillay V. Lipopolysaccharide Polyelectrolyte Complex for Oral Delivery of an Anti-tubercular Drug. *AAPS PharmSciTech* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2021 Jan 14];20(3):1–16. Available from: <https://link-springer-com.ezproxy.unal.edu.co/article/10.1208/s12249-019-1310-6>
275. Dubey V, Mohan P, Dangi JS, Kesavan K. Brinzolamide loaded chitosan-pectin mucoadhesive nanocapsules for management of glaucoma: Formulation, characterization and pharmacodynamic study. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2021 Jan 14];152:1224–32. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813019371673>
276. Phillips DJ, Pygall SR, Cooper VB, Mann JC. Overcoming sink limitations in dissolution testing: a review of traditional methods and the potential utility of biphasic systems. *J Pharm Pharmacol* [Internet]. 2012 Oct 12 [cited 2021 Aug 25];64(11):1549–59. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.2042-7158.2012.01523.x>
277. Liu P, De Wulf O, Laru J, Heikkilä T, Van Veen B, Kiesvaara J, et al. Dissolution studies of poorly soluble drug nanosuspensions in non-sink conditions. *AAPS PharmSciTech* [Internet]. 2013 Jun [cited 2021 Aug 25];14(2):748–56. Available from: </pmc/articles/PMC3666001/>
278. Jassim ZE, Hussein AA. DISSOLUTION METHOD DEVELOPMENT AND ENHANCEMENT OF SOLUBILITY OF CLOPIDOGREL BISULFATE. *Int Res J Pharm* [Internet]. 2017 [cited 2021 Aug 25];8(6):25–9. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/325854313>
279. Siepmann J, Siepmann F. Sink conditions do not guarantee the absence of saturation effects. *Int J Pharm* [Internet]. 2020 Mar 15 [cited 2021 Jan 21];577:119009. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.119009>
280. Huang J, Wigent RJ, Schwartz JB. Drug-polymer interaction and its significance on

- the physical stability of nifedipine amorphous dispersion in microparticles of an ammonio methacrylate copolymer and ethylcellulose binary blend. *J Pharm Sci* [Internet]. 2008 Jan 1 [cited 2021 Aug 27];97(1):251–62. Available from: <http://jpharmsci.org/article/S0022354916324406/fulltext>
281. Hurley D, Carter D, Foong Ng LY, Davis M, Walker GM, Lyons JG, et al. An investigation of the inter-molecular interaction, solid-state properties and dissolution properties of mixed copovidone hot-melt extruded solid dispersions. *J Drug Deliv Sci Technol* [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2020 Jun 5];53:101132. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1773224719305556>
282. García MC, Martinelli M, Ponce NE, Sanmarco LM, Aoki MP, Manzo RH, et al. Multi-kinetic release of benzimidazole-loaded multiparticulate drug delivery systems based on polymethacrylate interpolyelectrolyte complexes. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2018 Jul;120(January):107–22. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.04.034>
283. Chandra Basak S, Senthil Kumar K, Ramalingam M, Basak SC. Design and release characteristics of sustained release tablet containing metformin HCl. Vol. 44, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008.
284. Hu X, Wang Y, Zhang L, Xu M. Formation of self-assembled polyelectrolyte complex hydrogel derived from salectan and chitosan for sustained release of Vitamin C. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2020 Apr 15 [cited 2020 Sep 7];234:115920. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115920>
285. Yan JK, Qiu WY, Wang YY, Wu LX, Cheung PCK. Formation and characterization of polyelectrolyte complex synthesized by chitosan and carboxylic curdlan for 5-fluorouracil delivery. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2018 [cited 2021 Sep 3];107(PartA):397–405. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.004>
286. Mugoyela V, Mugoyela V, Mwambete K.D. Microbial contamination of nonsterile pharmaceuticals in public hospital settings. *Ther Clin Risk Manag* [Internet]. 2010 Sep [cited 2021 Nov 17];6:443. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2952482/>
287. Jairoun AA, Al-Hemyari SS, Shahwan M, Zyoud SH. An investigation into incidences of microbial contamination in cosmeceuticals in the uae: Imbalances between preservation and microbial contamination. *Cosmetics* [Internet]. 2020 Nov 24 [cited 2021 Nov 17];7(4):1–14. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-9284/7/4/92/htm>
288. Kamil OH, Lupuliasa D. Modern aspects regarding the microbial spoilage of pharmaceutical products. *Farmacia*. 2011;59(2):133–46.
289. Kabara JJ, Orth SD. *Preservative-Free and Self-Preserving Cosmetics and Drugs: Principles and Practices* [Internet]. CRC Press; 1997 [cited 2016 Apr 4]. 286 p. Available from: <https://books.google.com/books?id=qHgB7ZFLOC4C&pgis=1>
290. Erkmen O, Bozoglu F. Food Preservation by Removal Methods. In: *Food Microbiology: Principles into Practice* [Internet]. Wiley; 2016 [cited 2021 Sep 8]. p. 127–31. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/9781119237860.ch33>
291. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal* [Internet]. 2016 Apr [cited 2017 Mar 21];6(2):71–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095177915300150>
292. Evangelista TFS, Andrade GRS, Nascimento KNS, dos Santos SB, de Fátima Costa Santos M, Da Ros Montes D'Oca C, et al. Supramolecular polyelectrolyte complexes based on cyclodextrin-grafted chitosan and carrageenan for controlled drug release. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2021 Feb 16];245:116592. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116592>

293. Dillen K, Vandervoort J, Van den Mooter G, Ludwig A. Evaluation of ciprofloxacin-loaded Eudragit® RS100 or RL100/PLGA nanoparticles. *Int J Pharm.* 2006;314(1):72–82.
294. TOPUZOGULLARI M. Effect of polyelectrolyte complex formation on the antibacterial activity of copolymer of alkylated 4-vinylpyridine. *TURKISH J Chem* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2021 Mar 23];44(3):634–46. Available from: <http://online.journals.tubitak.gov.tr/openDoiPdf.htm?mKodu=kim-1909-95>
295. Qian L, Dong C, Liang X, He B, Xiao H. Polyelectrolyte complex containing antimicrobial guanidine-based polymer and its adsorption on cellulose fibers. *Holzforschung.* 2014;
296. Tsao CT, Chang CH, Lin YY, Wu MF, Wang J-L, Han JL, et al. Antibacterial activity and biocompatibility of a chitosan- γ -poly(glutamic acid) polyelectrolyte complex hydrogel. *Carbohydr Res* [Internet]. 2010 Aug;345(12):1774–80. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000862151000248X>
297. Procop GW, Barbara Alexander MD, Philippe Dufresne MJ, Jeff Fuller R, Mahmoud Ghannoum DA, Kimberly Hanson ME, et al. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts [Internet]. 2018 [cited 2021 Mar 29]. p. 44–6. Available from: www.clsi.org.
298. CLSI. M51-A: Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Nondermatophyte Filamentous Fungi; Approved Guideline [Internet]. Vol. 30. 2010 [cited 2021 Mar 29]. 1–29 p. Available from: www.clsi.org.
299. Wikler MA, Cockerill FR, Bush K, Dudley MN, Eliopoulos GM, Hardy DJ, et al. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests [Internet]. Vol. 29. 2009 [cited 2021 Mar 29]. Available from: www.clsi.org.
300. CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically [Internet]. Approved Standard-Tenth Edition. CLSI document M07-A10. 2015. 1–87 p. Available from: http://shop.clsi.org/site/Sample_pdf/M07A10_sample.pdf
301. Rex JH. M27-A3 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Third Edition. 2008.
302. Tapia C V. Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. *Rev Chil Infectol.* 2009;26(2):144–50.
303. Sandle T. Antibiotics and preservatives. In: *Pharmaceutical Microbiology*. First Edit. Cambridge: Elsevier; 2016. p. 171–83.
304. Wilson D. *Candida albicans*. *Trends Microbiol* [Internet]. 2019 Feb [cited 2021 Mar 29];27(2):188–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.10.010>
305. Kabir MA, Hussain MA, Ahmad Z. *Candida albicans* : A Model Organism for Studying Fungal Pathogens. *ISRN Microbiol* [Internet]. 2012 Sep 29 [cited 2021 Mar 29];2012:1–15. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/isrn/2012/538694/>
306. Prasad R. *Candida albicans*: Cellular and Molecular Biology [Internet]. Prasad R, editor. *Candida albicans: Cellular and Molecular Biology: Second Edition*. Cham: Springer International Publishing; 2017 [cited 2021 Mar 30]. 1–554 p. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-50409-4>
307. Salci TP, Negri M, Abadio AKR, Svidzinski TIE, Kioshima ÉS. Targeting *Candida* spp. to develop antifungal agents. *Drug Discov Today* [Internet]. 2018 Apr [cited 2021 Mar 29];23(4):802–14. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.01.003>
308. Boundless. Classification of Microorganisms - Biology LibreTexts [Internet]. Vol. 2019. 2019 [cited 2021 Mar 30]. Available from: [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3A_Microbiology_\(Boundless\)/1%3A_Introduction_to_Microbiology/1.2%3A_Microbes_and_the_World/1.2B%](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3A_Microbiology_(Boundless)/1%3A_Introduction_to_Microbiology/1.2%3A_Microbes_and_the_World/1.2B%3A)

- 3A_Classification_of_Microorganisms
309. Percival SL, Williams DW. *Escherichia coli* [Internet]. Second Edi. *Microbiology of Waterborne Diseases: Microbiological Aspects and Risks: Second Edition*. Elsevier; 2013. 89–117 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-415846-7.00006-8>
 310. Fleckenstein JM, Hardwidge PR, Munson GP, Rasko DA, Sommerfelt H, Steinsland H. Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Microbes Infect* [Internet]. 2010 Feb [cited 2021 Mar 30];12(2):89–98. Available from: www.elsevier.com/locate/micinf
 311. Ratajczak M, Kubicka MM, Kamińska D, Sawicka P, Długaszewska J. Microbiological quality of non-sterile pharmaceutical products. *Saudi Pharm J* [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2021 Mar 30];23(3):303–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2014.11.015>
 312. Jairoun AA, Al-Hemyari SS, Shahwan M, Zyoud SH. An Investigation into Incidences of Microbial Contamination in Cosmeceuticals in the UAE: Imbalances between Preservation and Microbial Contamination. *Cosmetics* [Internet]. 2020 Nov 24;7(4):92. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-9284/7/4/92>
 313. Sataloff RT, Johns MM, Kost KM. *Staphylococcus aureus* [Internet]. Elsevier; 2018. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/C20150047578>
 314. Pollitt EJG, Szkuta PT, Burns N, Foster SJ. *Staphylococcus aureus* infection dynamics. Prince A, editor. *PLOS Pathog* [Internet]. 2018 Jun 14 [cited 2021 Mar 30];14(6):e1007112. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1007112>
 315. Wong F, Stokes JM, Cervantes B, Penkov S, Friedrichs J, Renner LD, et al. Cytoplasmic condensation induced by membrane damage is associated with antibiotic lethality. *Nat Commun* [Internet]. 2021 Apr 19 [cited 2021 Sep 15];12(1):1–15. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-22485-6>
 316. Okkeh M, Bloise N, Restivo E, De Vita L, Pallavicini P, Visai L. Gold nanoparticles: Can they be the next magic bullet for multidrug-resistant bacteria? *Nanomaterials* [Internet]. 2021 Jan 26 [cited 2021 Sep 15];11(2):1–30. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-4991/11/2/312/htm>
 317. Lonergan NE, Britt LD, Sullivan CJ. Immobilizing live *Escherichia coli* for AFM studies of surface dynamics. *Ultramicroscopy* [Internet]. 2014 Feb 1 [cited 2019 Mar 7];137:30–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304399113002945>
 318. Louise Meyer R, Zhou X, Tang L, Arpanaei A, Kingshott P, Besenbacher F. Immobilisation of living bacteria for AFM imaging under physiological conditions. *Ultramicroscopy* [Internet]. 2010 Oct 1 [cited 2019 Mar 7];110(11):1349–57. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304399110001919>
 319. Harimawan A, Rajasekar A, Ting YP. Bacteria attachment to surfaces - AFM force spectroscopy and physicochemical analyses. *J Colloid Interface Sci* [Internet]. 2011 Dec 1 [cited 2019 Mar 7];364(1):213–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979711010046>
 320. Nasompag S, Siritongsuk P, Thammawithan S, Srichaiyapol O, Prangkio P, Camesano TA, et al. Afm study of nanoscale membrane perturbation induced by antimicrobial lipopeptide c14 kyr. *Membranes (Basel)* [Internet]. 2021 Jun 30 [cited 2021 Sep 15];11(7):495. Available from: <https://www.mdpi.com/2077-0375/11/7/495/htm>
 321. Dorobantu LS, Goss GG, Burrell RE. Atomic force microscopy: A nanoscopic view of microbial cell surfaces. *Micron* [Internet]. 2012 [cited 2021 Sep 15];43(12):1312–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2012.05.005>

322. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *J Control Release* [Internet]. 2016 Aug 10 [cited 2018 Apr 7];235:337–51. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365916303832>
323. Ferreyra Maillard APV, Espeche JC, Maturana P, Cutro AC, Hollmann A. Zeta potential beyond materials science: Applications to bacterial systems and to the development of novel antimicrobials. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2021 Jun [cited 2021 Sep 15];1863(6):183597. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2021.183597>
324. Klapetek P, Nečas D, Anderson C. One-Dimensional Roughness Parameters [Internet]. *Gwyddion user guide*. 2021 [cited 2021 Jul 8]. p. On line. Available from: <http://gwyddion.net/documentation/user-guide-en/roughness-iso.html>
325. Wang H, Feng H, Liang W, Luo Y, Malyarchuk V. Effect of Surface Roughness on Retention and Removal of *Escherichia coli* O157:H7 on Surfaces of Selected Fruits. *J Food Sci* [Internet]. 2009 Jan [cited 2021 Jul 8];74(1):E8–15. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1750-3841.2008.00998.x>
326. Halder S, Yadav KK, Sarkar R, Mukherjee S, Saha P, Haldar S, et al. Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents. *Springerplus* [Internet]. 2015 [cited 2019 Jun 28];4(1):1–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26558175>
327. Chen LC, Chiang WD, Chen WC, Chen HH, Huang YW, Chen WJ, et al. Influence of alanine uptake on *Staphylococcus aureus* surface charge and its susceptibility to two cationic antibacterial agents, nisin and low molecular weight chitosan. *Food Chem* [Internet]. 2012 [cited 2021 Apr 13];135(4):2397–403. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.122>
328. Huang YT, Kumar SR, Chan HC, Jhan ZH, Chen DW, Lue SJ. Efficacy of antimicrobial peptides (AMPs) against *Escherichia coli* and bacteria morphology change after AMP exposure. *J Taiwan Inst Chem Eng* [Internet]. 2021 [cited 2021 Sep 20];126:307–12. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2021.07.003>
329. Alfei S, Schito AM. Positively Charged Polymers as Promising Devices against Multidrug Resistant Gram-Negative Bacteria: A Review. *Polymers (Basel)* [Internet]. 2020 May 23 [cited 2021 Sep 20];12(5):1195. Available from: <https://pmc/articles/PMC7285334/>
330. Di Somma A, Moretta A, Canè C, Cirillo A, Duilio A. Antimicrobial and Antibiofilm Peptides. *Biomolecules* [Internet]. 2020 Apr 23;10(4):652. Available from: <http://aps.unmc.edu/AP>
331. Perinelli DR, Fagioli L, Campana R, Lam JKW, Baffone W, Palmieri GF, et al. Chitosan-based nanosystems and their exploited antimicrobial activity. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2018 May [cited 2021 Apr 23];117:8–20. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.01.046>
332. Yaroslavov AA, Melik-Nubarov NS, Menger FM. Polymer-induced flip-flop in biomembranes. *Acc Chem Res* [Internet]. 2006 Oct [cited 2021 Sep 20];39(10):702–10. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ar050078q>
333. Ergene C, Palermo EF. Antimicrobial Synthetic Polymers: An Update on Structure-Activity Relationships. *Curr Pharm Des*. 2018;24(8):855–65.
334. Pundir RK, Jain P. Evaluation of five chemical food preservatives for their antibacterial activity against bacterial isolates from bakery products and mango pickles. *J Chem Pharm Res*. 2011;3(1):24–31.
335. Kosova M, Hradkovica I, Matlova V, Kadlec D, Šmidrcal J, Filip V. Antimicrobial effect of 4-hydroxybenzoic acid ester with glycerol. *J Clin Pharm Ther* [Internet]. 2015 Aug 1 [cited 2021 Apr 27];40(4):436–40. Available from:

- <http://doi.wiley.com/10.1111/jcpt.12285>
336. Adamczak A, Ożarowski M, Karpiński TM. Antibacterial Activity of Some Flavonoids and Organic Acids Widely Distributed in Plants. *J Clin Med* [Internet]. 2019 [cited 2021 Apr 27];9(1):109. Available from: www.mdpi.com/journal/jcm
 337. Paredes F, Roca J. Acción de los antibióticos: perspectiva de la medicación antimicrobiana. *Offarm Farm y Soc* [Internet]. 2004 [cited 2021 Sep 21];23(3):116–24. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13059414>
 338. Lambert RJ, Stratford M. Weak-acid preservatives: Modelling microbial inhibition and response. *J Appl Microbiol*. 1999;86(1):157–64.
 339. Spirescu VA, Chircov C, Grumezescu AM, Andronescu E. Polymeric Nanoparticles for Antimicrobial Therapies: An up-to-date Overview. *Polymers (Basel)* [Internet]. 2021 Feb 27;13(5):724. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4360/13/5/724>
 340. Alasino R V., Leonhard V, Bianco ID, Beltramo DM. Eudragit E100 surface activity and lipid interactions. *Colloids Surf B Biointerfaces* [Internet]. 2012 Mar 1 [cited 2019 Nov 23];91(1):84–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776511006254>
 341. Alasino R V., Bianco ID, Vitali MS, Zarzur JA, Beltramo DM. Characterization of the inhibition of enveloped virus infectivity by the cationic acrylate polymer eudragit e100. *Macromol Biosci*. 2007;7(9–10):1132–8.
 342. Ausar SF, Bianco ID, Castagna LF, Alasino R V., Beltramo DM. Interaction of a cationic acrylate polymer with caseins: Biphasic effect of Eudragit E100 on the stability of casein micelles. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2003 Jul 16 [cited 2021 May 25];51(15):4417–23. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf034070b>
 343. Alasino R V., Ausar SF, Bianco ID, Castagna LF, Contigiani M, Beltramo DM. Amphipathic and membrane-destabilizing properties of the cationic acrylate polymer Eudragit® E100. *Macromol Biosci*. 2005;5(3):207–13.
 344. Abdel-Rahman LM, Eltaher HM, Abdelraouf K, Bahey-El-Din M, Ismail C, Kenawy ERS, et al. Vancomycin-functionalized Eudragit-based nanofibers: Tunable drug release and wound healing efficacy. *J Drug Deliv Sci Technol* [Internet]. 2020;58:101812. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101812>
 345. Taghe S, Mirzaeei S, Alany RG, Nokhodchi A. Polymeric Inserts Containing Eudragit® L100 Nanoparticle for Improved Ocular Delivery of Azithromycin. *Biomedicines* [Internet]. 2020 Oct 31;8(11):466. Available from: <https://www.mdpi.com/2227-9059/8/11/466>
 346. Kong J, Xie Y, Yu H, Guo Y, Cheng Y, Qian H, et al. Synergistic antifungal mechanism of thymol and salicylic acid on *Fusarium solani*. *LWT* [Internet]. 2021 [cited 2021 Jul 4];140:110787. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110787>
 347. Rodrigues ML. The Multifunctional Fungal Ergosterol. *MBio* [Internet]. 2018 Nov 7 [cited 2021 Jul 4];9(5). Available from: [/pmc/articles/PMC6143734/](https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/mb801333a001)
 348. da Rocha Neto AC, Maraschin M, Di Piero RM. Antifungal activity of salicylic acid against *Penicillium expansum* and its possible mechanisms of action. *Int J Food Microbiol*. 2015 Dec 23;215:64–70.
 349. Choi H, Kim KJ, Lee DG. Antifungal activity of the cationic antimicrobial polymer-polyhexamethylene guanidine hydrochloride and its mode of action. *Fungal Biol* [Internet]. 2017 [cited 2021 Sep 24];121(1):53–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2016.09.001>
 350. Garcia IM, Rodrigues SB, Rodrigues Gama ME, Branco Leitune VC, Melo MA, Collares FM. Guanidine derivative inhibits *C. albicans* biofilm growth on denture liner without promote loss of materials' resistance. *Bioact Mater*. 2020 Jun 1;5(2):228–32.
 351. Borawska MH, Czechowska SK, Markiewicz R, Pałka J, Świsłocka R. Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of Picolinic Acid and Selected. *Polish J Food Nutr Sci*.

- 2008;58(4):415–8.
352. Rajput SB, Karuppaiyl SM. Small molecules inhibit growth, viability and ergosterol biosynthesis in *Candida albicans*. Springerplus [Internet]. 2013 Dec 29 [cited 2021 Jun 22];2(1):26. Available from: <http://www.springerplus.com/content/2/1/26>
 353. Cho JY, Moon JH, Seong KY, Park KH. Antimicrobial activity of 4-hydroxybenzoic acid and trans 4-hydroxycinnamic acid isolated and identified from rice hull. Biosci Biotechnol Biochem [Internet]. 1998 [cited 2021 Apr 27];62(11):2273–6. Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=tbbb20>
 354. Karlsson AJ, Flessner RM, Gellman SH, Lynn DM, Palecek SP. Polyelectrolyte multilayers fabricated from antifungal β -peptides: Design of surfaces that exhibit antifungal activity against *Candida albicans*. Biomacromolecules [Internet]. 2010 Sep 13 [cited 2021 Sep 24];11(9):2321–8. Available from: </pmc/articles/PMC2939741/>
 355. Gifu IC, Maxim ME, Cinteza LO, Popa M, Aricov L, Leonties AR, et al. Antimicrobial activities of hydrophobically modified poly(acrylate) films and their complexes with different chain length cationic surfactants. Coatings [Internet]. 2019 Apr 11 [cited 2021 Sep 27];9(4):244. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-6412/9/4/244/html>
 356. Alves CS, Melo MN, Franquelim HG, Ferre R, Planas M, Feliu L, et al. Escherichia coli Cell Surface Perturbation and Disruption Induced by Antimicrobial Peptides BP100 and pepR. J Biol Chem [Internet]. 2010 Sep 3 [cited 2019 May 21];285(36):27536–44. Available from: <http://www.jbc.org/>
 357. Eaton P, Fernandes JC, Pereira E, Pintado ME, Xavier Malcata F. Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Ultramicroscopy [Internet]. 2008 Sep 1 [cited 2019 Mar 7];108(10):1128–34. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304399108000922?via%3Dihub>
 358. Laskowski D, Strzelecki J, Pawlak K, Dahm H, Balter A. Effect of ampicillin on adhesive properties of bacteria examined by atomic force microscopy. Micron [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2019 Mar 7];112:84–90. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968432818300696>
 359. Overton K, Greer HM, Ferguson MA, Spain EM, Elmore DE, Núñez ME, et al. Qualitative and Quantitative Changes to *Escherichia coli* during Treatment with Magainin 2 Observed in Native Conditions by Atomic Force Microscopy. Langmuir [Internet]. 2020 Jan 21 [cited 2021 Jul 9];36(2):650–9. Available from: </pmc/articles/PMC7430157/>
 360. Soon RL, Nation RL, Harper M, Adler B, Boyce JD, Tan CH, et al. Effect of colistin exposure and growth phase on the surface properties of live *Acinetobacter baumannii* cells examined by atomic force microscopy. Int J Antimicrob Agents. 2011;38(6):493–501.
 361. Domingues MM, Silva PM, Franquelim HG, Carvalho FA, Castanho MARB, Santos NC. Antimicrobial protein rBPI21-induced surface changes on Gram-negative and Gram-positive bacteria. Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med [Internet]. 2014;10(3):543–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2013.11.002>
 362. Hammer KA, Heel KA. Use of multiparameter flow cytometry to determine the effects of monoterpenoids and phenylpropanoids on membrane polarity and permeability in staphylococci and enterococci. Int J Antimicrob Agents [Internet]. 2012 Sep 1 [cited 2020 May 28];40(3):239–45. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857912002166>
 363. Zhang D, Lee Y-C, Shabani Z, Frankenfeld Lamm C, Zhu W, Li Y, et al. Processing Impact on Performance of Solid Dispersions. Pharmaceutics [Internet]. 2018 Aug 30;10(3):142. Available from: <http://www.mdpi.com/1999-4923/10/3/142>

364. Ebejer JP, Charlton MH, Finn PW. Are the physicochemical properties of antibacterial compounds really different from other drugs? *J Cheminform* [Internet]. 2016 Jun 3 [cited 2021 Oct 5];8(1):1–9. Available from: <https://jcheminf.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13321-016-0143-5>
365. Mugumbate G, Overington JP. The relationship between target-class and the physicochemical properties of antibacterial drugs. *Bioorganic Med Chem*. 2015 Aug 15;23(16):5218–24.
366. Mengelers MJB, Hougee PE, Janssen LHM, Van Miert ASJPAM. Structure-activity relationships between antibacterial activities and physicochemical properties of sulfonamides. *J Vet Pharmacol Ther*. 1997;20(4):276–83.
367. Rezaee S, Khalaj A, Adibpour N, Saffary M. Correlation between lipophilicity and antimicrobial activity of some 2-(4-substituted phenyl)-3(2H)-isothiazolones. *Daru* [Internet]. 2009 Jan 1 [cited 2021 Oct 11];17(4):256–63. Available from: <https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?ID=171362>
368. Singh UP, Bhat HR, Gahtori P. Antifungal activity, SAR and physicochemical correlation of some thiazole-1,3,5-triazine derivatives. *J Mycol Med* [Internet]. 2012;22(2):134–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2011.12.073>
369. Pasquet J, Chevalier Y, Couval E, Bouvier D, Noizet G, Morlière C, et al. Antimicrobial activity of zinc oxide particles on five micro-organisms of the Challenge Tests related to their physicochemical properties. *Int J Pharm*. 2014 Jan 2;460(1–2):92–100.
370. Insua I, Zizmare L, Peacock AFA, Krachler AM, Fernandez-Trillo F. Polymyxin B containing polyion complex (PIC) nanoparticles: Improving the antimicrobial activity by tailoring the degree of polymerisation of the inert component. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1). Available from: www.nature.com/scientificreports/
371. Perinelli DR, Petrelli D, Vitali LA, Vllasaliu D, Cespi M, Giorgioni G, et al. Quaternary ammonium surfactants derived from leucine and methionine: Novel challenging surface active molecules with antimicrobial activity. *J Mol Liq* [Internet]. 2019 [cited 2021 Oct 11];283:249–56. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.03.083>
372. Makowski D, Ben-Shachar M, Patil I, Lüdecke D. Methods and Algorithms for Correlation Analysis in R. *J Open Source Softw* [Internet]. 2020 [cited 2021 Oct 11];5(51):2306. Available from: <https://github.com/easystats/>
373. Mukaka MM. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Med J* [Internet]. 2012 [cited 2021 Oct 11];24(3):69–71. Available from: [/pmc/articles/PMC3576830/](http://pmc/articles/PMC3576830/)
374. Benesty J, Chen J, Huang Y, Cohen I. Pearson correlation coefficient. In: *Springer Topics in Signal Processing* [Internet]. Springer, Berlin, Heidelberg; 2009 [cited 2021 Oct 12]. p. 1–4. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-00296-0_5
375. Fernández S. P, Pértega Díaz S. Investigación: relación entre variables cuantitativas. *Cad Atención Primaria* [Internet]. 1997 [cited 2021 Oct 12];4:141–4. Available from: www.fisterra.com
376. Chan YH. Biostatistics 104: Correlational Analysis. *Singapore Med J*. 2003;44(12):614–9.
377. Akoglu H. User's guide to correlation coefficients. *Turkish J Emerg Med*. 2018;18(3):91–3.
378. Chang S-H, Lin H-TV, Wu G-J, Tsai GJ. pH Effects on solubility, zeta potential, and correlation between antibacterial activity and molecular weight of chitosan. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2015 Dec 10 [cited 2021 Sep 15];134:74–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.072>
379. Chung YC, Su YP, Chen CC, Jia G, Wang HL, Wu JCG, et al. Relationship between

- antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacol Sin.* 2004;25(7):932–6.
380. Topuzogullari M. Effect of polyelectrolyte complex formation on the antibacterial activity of copolymer of alkylated 4-vinylpyridine. *Turkish J Chem.* 2020;44(3):634–46.
381. Dash A, Singh S, Tolman J. *Pharmaceutics Basic Principles and Application to Pharmacy Practice*. 1st Editio. Academic Press; 2013. 392 p.