USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Facultad de Farmacia

Departamento de Farmacia
y Tecnología Farmacéutica

HIDROGELES DE CICLODEXTRINAS CO-RETICULADOS E INTERPENETRADOS PARA LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS



Mª del Carmen Rodríguez-Tenreiro y Sánchez

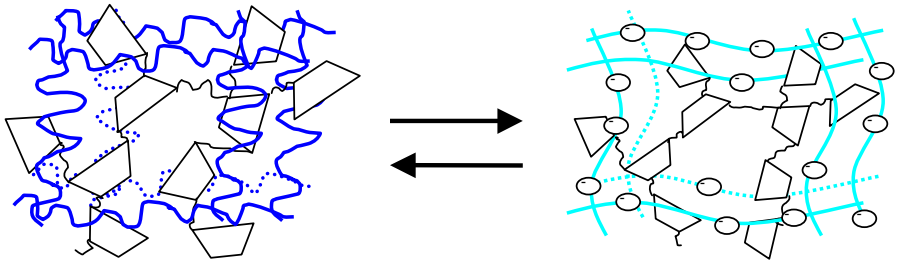
Santiago de Compostela, 2006

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

HIDROGELES DE CICLODEXTRINA CO-RETICULADOS E INTERPENETRADOS PARA LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS



Carmen Rodríguez-Tenreiro y Sánchez

Santiago de Compostela, 2006

In memoriam

Doctor Rodríguez-Tenreiro

Mi padre, mi amigo, mi maestro, tenías razón: "Hay cosas que para saberlas bien, no basta con haberlas aprendido"

GRACIAS

Cuando estoy a punto de cerrar esta etapa de mi vida, vuelvo a esta mesa en la que he pasado tantas horas dando vueltas a todos estos resultados que hoy, por fin, constituyen mi tesis doctoral y me doy cuenta de que podría escribir otro ejemplar con las experiencias personales que han completado este trabajo. Es a todas esas personas que irían en la "tesis paralela" a las que quiero dedicar esta página y dada la dificultad que supone tal síntesis y a riesgo de que muchas se me queden en el tintero simplemente GRACIAS. Gracias por el tiempo que invertisteis en mi para ayudarme a crecer personal y profesionalmente, a todos los que os sintais parte de este trabajo, GRACIAS.

Juan, gracias por tu apoyo, tus consejos, tus ánimos, tu sentido del humor. Por haberme ayudado a llegar a buen puerto, GRACIAS.

Carmen y Ángel, gracias por vuestro esfuerzo y dedicación. Por haber compartido conmigo tantas horas de trabajo, GRACIAS.

A mis compañeros de laboratorio, a Bea, contigo aprendí que los viernes por la tarde no eran un buen día para trabajar, a Leticia, a Helena y a Jaime, GRACIAS.

Fernando y Ana, los incondicionales, con quienes compartí risas y lágrimas, triunfos y derrotas, supisteis estar siempre ahí y ahora que la aventura ha terminado nos queda una gran amistad, GRACIAS.

Mamá, gracias, por tu ejemplo, tu fuerza, tu inspiración, tu confianza en que este día pronto iba a llegar, GRACIAS.

A mis hermanos, gracias por vuestra alegría, por esa forma tan particular que teneis de sacarme una sonrisa, GRACIAS.

Evaristo, porque llegaste justo en el momento oportuno, como siempre, pusiste luz en los momentos de tiniebla y me diste en todo momento ese empujón para avanzar cada día un poco más y ayudarme a ser lo que hoy soy, GRACIAS.

A todos los que hoy, os sentís felices por mí, aunque no os nombre, GRACIAS.

Las investigaciones que forman parte de esta Tesis Doctoral se han llevado a cabo dentro de los proyectos PGIDIT04BTF203011PR de la Xunta de Galicia y SAF2005-01930 del Ministerio de Ciencia y Tecnología.

Agradezco a la Xunta de Galicia la Beca Predoctoral concedida para realizar los estudios de doctorado y a Roquette-Laisa España y Janssen Pharmaceutische la donación de β-ciclodextrina e Hidroxipropil-β-ciclodextrina, respectivamente.

CARMEN ÁLVAREZ LORENZO, PROFESORA TITULAR INTERINA Y JUAN JOSÉ TORRES LABANDEIRA, PROFESOR TITULAR DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA,

CERTIFICAMOS: Que la memoria titulada "Hidrogeles de ciclodextrinas co-*reticulados e interpenetrados para liberación controlada de* fármacos" ha sido elaborada por Dña. Mª del Carmen Rodríguez-Tenreiro y Sánchez bajo nuestra dirección, en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y, hallándose concluida, autorizamos su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Santiago de Compostela, a 30 de noviembre de 2006.

Carmen Álvarez Lorenzo ***Juan José Torres Labandeira***

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN 1

1.1. CICLODEXTRINAS 5

1. 1. 1. GENERALIDADES 5

1.1.1.a. Las ciclodextrinas naturales 6
1.1.1.b. Derivados de ciclodextrinas naturales 7
1.1.1.c. Propiedades de las ciclodextrinas 9
1.1.1.d. Toxicidad 19
1.1.1.e. Estatus regulatorio 21

1. 1. 2. UTILIDAD DE LAS CICLODEXTRINAS EN LA FORMULACIÓN DE MEDICAMENTOS 23

1.1.2.a. Hidrosolubilización de fármacos 23
1.1.2.b. Estabilización química de fármacos 26
1.1.2.c. Estabilización física de fármacos y formas de dosificación 26
1.1.2.d. Mejora en la biodisponibilidad 27

1.2. LAS CICLODEXTRINAS EN LIBERACIÓN CONTROLADA Y VECTORIZADA 29

1. 2. 1. COMPLEJOS FÁRMACO:CICLODEXTRINA 29

1. 2. 2. COMPLEJOS FÁRMACO:CICLODEXTRINA DISPERSOS EN MATRICES HIDROFÍLICAS 33

1. 2. 3. MICROPARTICULAS Y SISTEMAS COLOIDALES 33

1. 2. 4. CONJUGADOS FARMACO: CICLODEXTRINA 34

1. 2. 5. POLÍMEROS E HIDROGELES DE CICLODEXTRINA *37*

1.2.5.a. Preparación de polímeros de ciclodextrina 39

1.2.5.b. Preparación de hidrogeles de ciclodextrina 45

1.2.5.c. Los hidrogeles de ciclodextrinas como sistemas de liberación de fármacos 54

2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS..... 61

3. TRABAJOS PUBLICADOS..... 65

Characterization of cyclodextrin-carbopol interactions by DSC and FTIR 67

Procedimiento de obtención de hidrogeles de ciclodextrinas con glicidiléteres, las composiciones obtenidas y sus aplicaciones 79

New cyclodextrin hydrogels cross-linked with diglycidylethers with a high drug loading and controlled release ability..... 113

Estradiol sustained release from high affinity cyclodextrin hydrogels..... 125

Interpenetrating carbopol-cyclodextrin hydrogels for drug delivery 135

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 169

4.1. HIDROGELES OBTENIDOS POR RETICULACIÓN SIMULTÁNEA DE DERIVADOS DE β-CICLODEXTRINA (βCD) CON POLISACÁRIDOS SEMISINTÉTICOS UTILIZANDO ETILENGLICOLDIGLICIDILÉTER (EGDE) COMO AGENTE RETICULANTE 172

4. 1. 1. PREPARACIÓN *172*

4. 1. 2. CARACTERIZACIÓN *177*

4.1.2.a. Propiedades estructurales 177

4.1.2.b. Hinchamiento 178

4.1.2.c. Carga y cesión de fármacos 179

4.2. SISTEMAS PREPARADOS POR RETICULACIÓN DE CICLODEXTRINAS E INTERPENETRACIÓN SIMULTÁNEA DE SUS ENTRAMADOS CON MICROGELES DE CARBOPOL. 191

4. 2. 1. INTERACCIÓN DEL CARBOPOL CON LA HPBCD. EFECTO SOBRE LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS. 192

4. 2. 2. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE IPNs 194

4.2.2.a. Preparación 194

4.2.2.b. Hinchamiento 195

4.2.2.c. Propiedades mecánicas y bioadhesivas 196

4.2.2.d. Carga y cesión de fármacos hidrofóbicos 198

5. CONCLUSIONES 203

6. BIBLIOGRAFÍA 207

1. Introducción

La eficacia terapéutica de un determinado principio activo una vez que se administra a un organismo vivo está condicionada en gran medida por sus características físico-químicas y, en particular, por su solubilidad y permeabilidad. Los principios activos deben ser lo suficientemente hidrosolubles como para garantizar su completa disolución en los fluidos biológicos y, por lo tanto, asegurar su disponibilidad para la absorción y, al mismo tiempo, deben presentar un cierto carácter apolar que favorezca su paso a través de las membranas fisiológicas.

El éxito de la terapia farmacológica radicará en buena medida en el equilibrio entre la hidrofilia y la lipofilia de una determinada molécula. Alcanzar este equilibrio es difícil para los fármacos de clase II (poco solubles y muy permeables), clase III (muy solubles y poco permeables) y clase IV (poco solubles y poco permeables) de acuerdo con el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica *(Amidon y col., 1995)*. En general, una mejora de la solubilidad aparente sin disminuir su liposolubilidad permite aumentar la absorción de fármacos de Clase II y Clase IV a través de las membranas biológicas. De entre las numerosas alternativas desarrolladas con tal propósito el empleo de

ciclodextrinas ha despertado durante los últimos años un gran interés abriendo una nueva puerta para la formulación de fármacos de limitada hidrosolubilidad. También resultan útiles en el desarrollo de formas de liberación modificada de fármacos solubles en agua *(Loftsson y col., 2005a)*.

1.1. CICLODEXTRINAS

1. 1. 1. *GENERALIDADES*

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos de origen natural constituidos por unidades de α-D-glucopiranosa unidas por enlaces α -1,4 (Figura 1.1), que se aislaron por primera vez hace más de cien años a partir de productos de degradación del almidón *(Villiers, 1891; Bender y Komiyama, 1978).* Su uso como excipientes data de los años 70 *(Szejtli, 2004).*

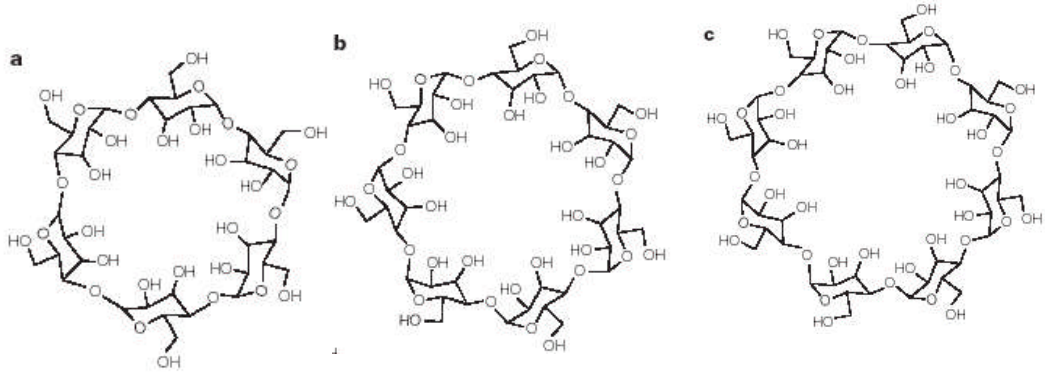


Figura 1.1.- Estructura de las ciclodextrinas naturales (a.- α-ciclodextrina; b.- β-ciclodextrina; c.-γ-ciclodextrina , *Davis y Brewster, 2004*).

La conformación en silla de los anillos de glucopiranosa determina que las ciclodextrinas presenten una estructura cíclica con una cavidad troncocónica, de cara interna hidrofóbica y cara externa hidrofílica. La superficie interna de la cavidad está constituida por el esqueleto carbonado de los anillos de glucopiranosa y por los oxígenos que forman los grupos éter. Por su parte, los grupos hidroxilo se orientan hacia

la parte exterior, disponiéndose los secundarios en la zona más ancha y los primarios en la más estrecha (Figura 1.2).

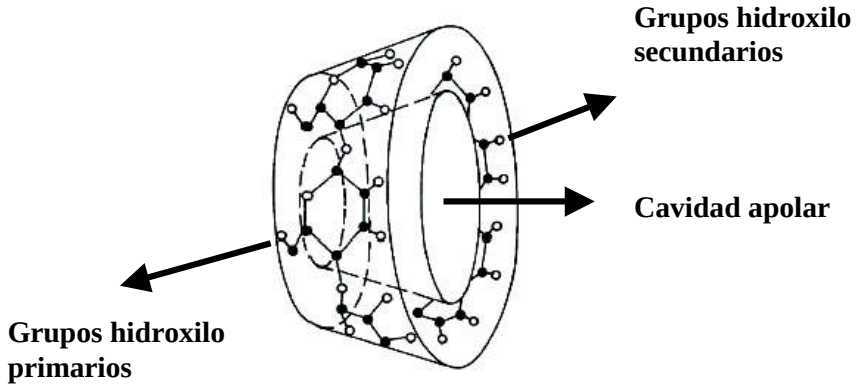


Figura 1.2.- Estructura troncocónica de la α-ciclodextrina *(Loftsson y Brewster, 1996)*.

En Tecnología Farmacéutica, el interés de las ciclodextrinas se deriva de la posibilidad de que ciertas moléculas de baja hidrosolubilidad se puedan alojar en su cavidad hidrofóbica, formándose un complejo de inclusión que las estabiliza en el entorno acuoso.

1.1.1.a. Las ciclodextrinas naturales

Las ciclodextrinas naturales se clasifican tomando como base el número de unidades glucopiranosa que las forman; así la α-, β- y γ-ciclodextrina son los derivados formados por 6, 7 y 8 unidades. Las ciclodextrinas constituidas por más de 8 unidades de glucopiranosa se conocen como ciclodextrinas grandes y son más difíciles de aislar *(French, 1957)*. La variedad de diámetros de sus cavidades determina que las ciclodextrinas puedan formar complejos de inclusión con moléculas de tamaño muy diverso *(Fundueanu y col., 2003)*.

Las ciclodextrinas naturales presentan un número variable de grupos hidroxilo susceptibles de reaccionar químicamente para incorporar diferentes grupos funcionales, lo que hace posible la formación de una gran variedad de derivados *(Duchêne y Wouessidjewe, 1990)*. La incorporación de estos grupos modifica las propiedades fisico-químicas de la ciclodextrina original y la dota de nuevos lugares de unión.

En la tabla 1.1 se resumen algunas características estructurales de las ciclodextrinas naturales:

	α	β	γ
Nº unidades de glucopiranosa	6	7	8
Peso molecular	972	1135	1297
Diámetro de la cavidad central (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3

Tabla 1.1.- Algunas propiedades de las ciclodextrinas naturales *(Loftsson y Brewster, 1996)*.

1.1.1.b. Derivados de ciclodextrinas naturales

La incorporación de sustituyentes con diferentes estructuras a los grupos hidroxilo libres de las ciclodextrinas naturales permite obtener derivados con propiedades muy variadas (Tabla 1.2).

Derivados	α	β	γ
Alquilados	Metil- Butil-	Metil- Etil- Butil-	Metil- Butil- Pentil-
Hidroxialquilados	2-hidroxipropil-	Hidroxietil- 2-hidroxipropil- 2-hidroxibutil-	Hidroxietil- 2-hidroxipropil-
Esterificados	Acetil- Succinil-	Acetil- Propionil- Butiril- Succinil- Benzoil- Palmitil- Toluen sulfonil-	Acetil- Succinil-
Esterificados y Alquilados		Acetil metil- Acetil butil-	
Ramificados	Glucosil- Maltosil-	Glucosil- Maltosil-	Glucosil- Maltosil-
Iónicos	Carboximetil éter Éster fosfato	Carboximetil éter Carboximetil etil- Éster fosfato 3-Trimetilamonio-2-hidroxipropil éter Sulfobutil éter	Carboximetil éter Éster fosfato
Polimerizados	Policarboximetil-	Policarboximetil-	Policarboximetil-

Tabla 1.2.- Algunos derivados de las ciclodextrinas naturales.

La alquilación no se produce de manera aleatoria, sino que está condicionada por la reactividad relativa de los distintos grupos hidroxilo de la ciclodextrina. Los hidroxilos secundarios, que se encuentran en posiciones 2 y 3, tienen un carácter más ácido que los primarios unidos al carbono 6. En consecuencia, dependiendo de la composición del medio de reacción, la sustitución de unos u otros grupos hidroxilo se encuentra más o menos favorecida. En un medio fuertemente básico la alquilación se

producirá preferentemente en posición 6, mientras que en un medio menos básico lo harán en la posición 2 *(Pitha y col., 1990)*. Este hecho tiene una gran trascendencia práctica puesto que las propiedades físico-químicas de los derivados de ciclodextrina y su aptitud para formar complejos de inclusión dependen, no sólo de su grado de sustitución, sino también de las posiciones que ocupan sus sustituyentes *(Botsi y col., 1995*).

1.1.1.c. Propiedades de las ciclodextrinas

A diferencia de los sacáridos lineales, las ciclodextrinas naturales, en especial la β-ciclodextrina, cuentan con una hidrosolubilidad limitada (Tabla 1.3). Esta reducida hidrosolubilidad es consecuencia del establecimiento de puentes de hidrógeno entre sus grupos hidroxilo secundarios *(Frömming y Szejtli, 1994; Miyazaga y col., 1995)*.

	α	β	γ
Solubilidad acuosa (25ºC, g/100 ml)	14.5	1.85	23.2

Tabla 1.3.- Solubilidad acuosa a 25ºC de las ciclodextrinas naturales (g/100ml).

La sustitución de los grupos hidroxilo dificulta la formación de uniones intramoleculares y facilita la interacción con el agua *(Frömming y Szejtli, 1994)*. El incremento de solubilidad se manifiesta de una manera muy clara cuando el grado de sustitución (es decir, el número de grupos hidroxilo de cada unidad glucopiranosa sustituidos por término medio en cada ciclodextrina) es relativamente bajo. Sin embargo, un grado de sustitución muy elevado puede dar lugar a una disminución drástica de la solubilidad. Sobre la base de su hidrosolubilidad, los derivados de

ciclodextrina se suelen clasificar como hidrofílicos, hidrofóbicos o ionizables. La solubilidad de estos últimos es muy dependiente del pH y se incrementa cuando sus grupos ácidos o básicos se ionizan. Este es el caso de la o-carboximetil-o-etil-β-ciclodextrina (CME-βCD) (Figura 1.3; *Hirayama y Uekama, 1999).*

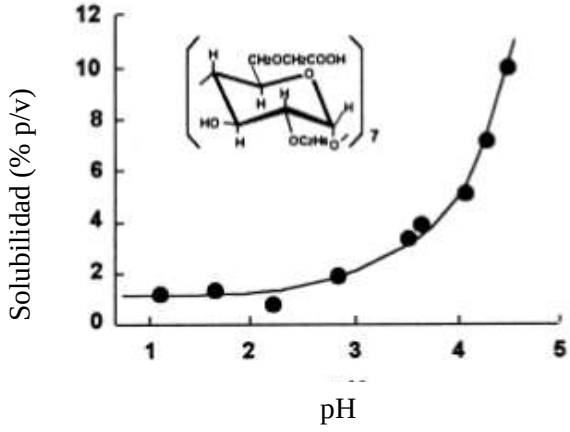


Figura 1.3.- Dependencia de la solubilidad de la CME-βCD respecto del pH *(Hirayama y Uekama., 1999).*

En la tabla 1.4 se muestran algunas de las características más relevantes de los derivados de la β-ciclodextrina, junto con las vías de administración para las que son aptos.

		Derivado	Caracteríticas	Formas de dosificación
Derivados hidrofílicos	Metilados	2,6-di-*O*-metil-βCD per-*O*-metil-βCD	Solubles en agua fría y en disolventes orgánicos, actividad superficial y hemolítica.	Oral, cutánea, transmucosal.
		dimetil-βCD acetilada	Soluble en agua, poco hemolítica	Parenteral
	Hidroxialqui-lados	2-hidroxietil-βCD 2-hidroxipropil-βCD 3-hidroxipropil-βCD 2,3-dihidroxipropil-βCD	Mezcla amorfa de diferentes grados de sustitución., muy solubles en agua, baja toxicidad.	Oral, cutánea, transmucosal, parenteral (i.v.).
	Ramificados	Glicosil-βCD Maltosil-βCD Glucuronil-glucosil-βCD	Muy solubles en agua, baja toxicidad.	Oral, transmucosal, parenteral (i.v.).
Derivados hidrofóbicos	Alquilados	2,6-di-*O*-etil-βCD per-*O*-etil-βCD	Poco solubles en agua, solubles en disolventes orgánicos, actividad superficial.	Oral, parenteral (subcutánea).
	Esterificados	per-*O*-acetil-βCD	Poco solubles en agua, solubles en disolventes orgánicos.	Oral, cutánea.
		per-*O*-valeril-βCD	Formadora de películas	
Derivados ionizables	Aniónicos	O-carboximetil-O-etil-βCD βCD sulfato Sulfobutil éter CD	pKa entre 3 y 4, soluble a pH>4 pKa>1, soluble en agua	Oral, cutánea, transmucosal
		βCD fosfato Al βCD sulfato	Insoluble en agua	Parenteral (i.v.)

Tabla 1.4.- Caracteríticas de los derivados de la β-ciclodextrina (βCD) *(Uekama, 2004)*.

Desde la perspectiva de la Tecnología Farmacéutica, los derivados más interesantes son la hidroxipropil-β-ciclodextrina, la sulfobutiléter-β-ciclodextrina y algunas β-ciclodextrinas ramificadas, cuya baja toxicidad las hace útiles para el desarrollo de formas parenterales *(Matsubara y col., 1997; Nagase y col., 2001; Nagase y col., 2003)*. Este es el caso de la glucuronil-glucosil-β-ciclodextrina (GUG-βCD) que

presenta un grupo carboxilo en la ramificación contituida por el grupo maltosilo (Figura 1.4) *(Tavornvipas y col., 2002).*

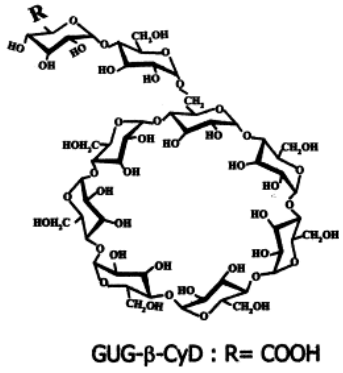


Figura 1.4.- Estructura química de la glucuronil-glucosil-β-ciclodextrina.

La actividad hemolítica de este nuevo derivado, que se ha estudiado en conejos, es muy inferior a la de la βCD y a la de otros de sus derivados (Figura 1.5). Además, al contar con un grupo carboxilo la afinidad de esta ciclodextrina por moléculas huésped de carácter básico es muy superior a la de otras debido a las interacciones electrostáticas que se pueden establecer con grupos catiónicos de fármacos *(Uekama, 2004).*

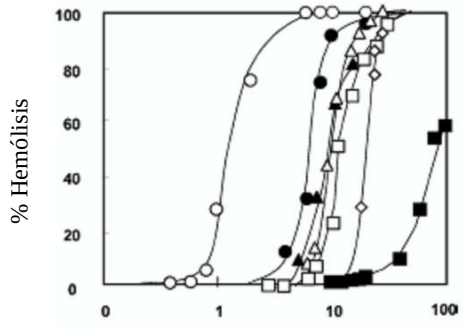


Figura 1.5.- Curvas de hemólisis de diferentes derivados hidrofílicos de la βCD obtenidas con eritocitos de conejo en tampón fosfato pH 7.4 (0.1 M) a 37ºC (○- dimetil-βCD; ●- βCD; Δ- hidroxipropil-βCD;▲- maltosil-βCD; ◊- sulfobutiléter-βCD, □- glucuronil-glucosil-βCD; ■- 2,6-di-o-metil-βCD acetilada).

Formación de complejos de inclusión

Las interacciones que se establecen en los complejos de inclusión ciclodextrina:fármaco son de carácter no covalente y su formación/disociación transcurre a una velocidad muy rápida, que es comparable o incluso superior a la de muchos procesos fisiológicos *(Cramer y col., 1967; Hersey y col., 1986; Loftsson y col., 2005a).* Por lo tanto, aunque los complejos se suelen representar como una única especie, en realidad se comportan en disolución como sistemas dinámicos en los que éstos coexisten con la ciclodextrina y el fármaco libres *(Uekama, 2004).*

Las moléculas de agua se encuentran en el interior de la cavidad en un estado energético desfavorable como consecuencia de la repulsión que se produce con los grupos apolares de la ciclodextrina. Su reemplazo por otras moléculas menos polares, que se introducen total o parcialmente en la cavidad, conduce a la formación de un complejo de inclusión *(Szejtli, 1988).* Obviamente para que el complejo se pueda formar, las moléculas deben presentar un tamaño adecuado y ser más apolares que el agua *(Uekama, 2004).* Las características estéricas del huésped determinan su posibilidad de inclusión en una determinada ciclodextrina, reflejándose el grado de adecuación entre sus dimensiones y las de la cavidad en el valor de la constante de formación del complejo *(Perlovich y col., 2003).* Si la molécula huésped es excesivamente voluminosa, como es el caso de las hormonas esteroídicas, las vitaminas liposolubles o los glucósidos cardiotónicos, sólo podrá introducirse parcialmente en la cavidad, con lo que la formación del complejo puede requerir más de una molécula de ciclodextrina por cada molécula de fármaco. La polaridad de la molécula huésped no sólo condiciona su afinidad sino también su orientación dentro de la cavidad. En general, la disposición que se adopta es la que proporciona el máximo contacto posible entre la parte hidrofóbica del fármaco y la superficie interna de la cavidad. Cuando las dimensiones moleculares son comparables, la afinidad es tanto mayor cuanto más hidrofóbico es el fármaco *(Saenger, 1980).*

En el proceso de inclusión intervienen fuerzas de distinta naturaleza: hidrofóbicas, de Van der Waals, puentes de hidrógeno, transferencia de carga y resultantes de tensiones del anillo de ciclodextrina *(Loftsson y Brewster, 1996; Liu y Guo, 2002)*. Cuando la resultante es favorable, se produce la complejación, lo que provoca cambios en las propiedades físico-químicas de la ciclodextrina y del fármaco. Estas modificaciones se pueden poner de manifiesto por diferentes técnicas, que permiten dilucidar la estequiometría del complejo de inclusión y estimar el valor de su constante de formación *(Hirayama y Uekama, 1987)*. Los métodos más usuales se basan en la medida de las alteraciones que sufre la solubilidad del fármaco, la reactividad química, el espectro de absorción en la región ultravioleta-visible, la fluorescencia, el tiempo de retención en una columna de cromatografía, el pKa, la estabilidad química, el desplazamiento químico de los protones en el espectro de H^1-RMN y la capacidad de paso del fármaco a través de membranas. Como la complejación modifica las propiedades del medio, para monitorizar el proceso se puede acudir también a la medida de cambios en la conductividad, el punto de congelación o la viscosidad de las disoluciones *(Loftsson y col., 2005a)*. Una aproximación de uso habitual consiste en seguir la influencia de la concentración de ciclodextrinas en la solubilidad del fármaco. Los resultados de estos estudios se representan en forma de diagramas de solubilidad (Figura 1.6), que pueden ser de dos tipos *(Higuchi y Connors, 1965)*:

- **Tipo A**: la solubilidad del fármaco aumenta a medida que se incrementa la concentración de ciclodextrina en el medio, pudiendo darse tres tipos de comportamientos:
    - **A_L:** la dependencia es lineal; se asume que la estequiometría de formación del complejo es fármaco: ciclodextrina 1:1.
    - **A_P:** se produce una desviación positiva de la linealidad, que indica que la estequiometría del complejo fármaco:ciclodextrina es 1:2 ó superior.

- **A_N:** se observa una desviación negativa de la linealidad, que suele ser consecuencia de cambios en la constante dieléctrica del medio o en la solubilidad del complejo de inclusión, o de la formación de estructuras macromoleculares fruto de la asociación parcial de varias unidades de ciclodextrina para dar lugar a micelas *(Brewster y Loftsson, 1999)*.

- **Tipo B**: la dependencia de la solubilidad del fármaco respecto de la concentración de ciclodextrina es no lineal. Este tipo de diagramas son indicativos de la formación de complejos de inclusión con solubilidad limitada.

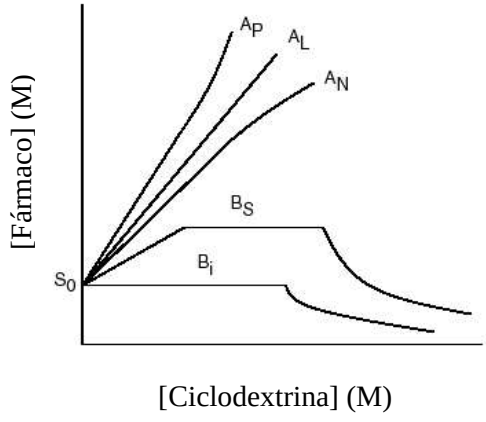
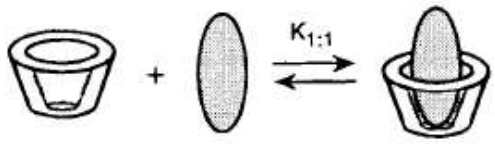


Figura 1.6.- Clasificación de los complejos de inclusión propuesta por Higuchi y Connors (1965).

En general, los derivados de ciclodextrina que son solubles en agua dan lugar a perfiles de tipo A_L, mientras que las ciclodextrinas naturales de más baja solubilidad proporcionan perfiles de tipo B. Sin embargo, los diagramas de solubilidad no prueban por sí solos que se forme un complejo y únicamente ponen de manifiesto un incremento de la solubilidad del fármaco en presencia de la ciclodextrina. Puede ocurrir que este incremento se produzca por otros mecanismos, como por ejemplo la incorporación del fármaco a micelas de ciclodextrinas *(Loftsson y col., 2002; Loftsson y col., 2004a)*. Para

concluir que se forman complejos de inclusión, los datos de solubilidad deben complementarse con otros procedentes de la aplicación de técnicas que aporten información directa acerca de las estructuras que se forman en el sistema, como H^1-RMN, fluorescencia, espectroscopía ultavioleta-visible o técnicas calorimétricas *(Loftsson y col., 2002; Fundueanu y col., 2003; Iliescu y col., 2004; Loftsson y col., 2004a; Rodríguez-Pérez y col., 2006a).*



Ciclodextrina Fármaco Complejo de inclusión

Figura 1.7.- Esquema de la formación de un complejo de inclusión de estequiometría 1:1.

La constante de formación de los complejos 1:1 ($K_{1:1}$; Figura 1.7) se estima a partir de la pendiente de los diagramas A_L, utilizando la siguiente expresión *(Higuchi y Connors, 1965)*:

$$K_{1:1} = \frac{pendiente}{S_0(1 - pendiente)}$$

en la que *So* representa la solubilidad intrínseca del fármaco. Son valores habituales los comprendidos entre 50 y 2000 M^{-1}.

Otro parámetro útil para caracterizar los procesos de formación de este tipo de complejos es la eficacia de complejación, que viene dada por *(Loftsson y col., 2005b)*:

$$CE = S_0 \times K_{1:1} = \frac{pendiente}{(1 - pendiente)}$$

Entre las relaciones estequiométricas de orden superior la más común es la fármaco:ciclodextrina 1:2. En este caso, el diagrama se suele ajustar a una ecuación de segundo orden:

$$S_{tot} = S_0 + K_{1:1} S_0 [CD] + K_{1:1} K_{1:2} S_0 [CD]^2$$

en la que *[CD]* representa la concentración de ciclodextrina y $K_{1:2}$ la constante de formación del complejo.

Métodos de preparación de complejos de inclusión

Para preparar complejos de inclusión se pueden aplicar distintos procedimientos *(Hirayama y Uekama, 1987; Hedges, 1998)*. A continuación se describen brevemente los más usuales.

- *Disolución*

Consiste en adicionar un exceso de fármaco a una disolución acuosa de ciclodextrina, manteniendo el sistema en agitación, generalmente a temperatura ambiente, durante el tiempo necesario para que se alcance el equilibrio. Seguidamente, el sistema se filtra o se centrifuga para separar el principio activo no disuelto. La eliminación del agua por evaporación o liofilización permite obtener el complejo de inclusión en estado sólido (Figura 1.8). El proceso se puede acortar preparando una disolución sobresaturada de fármaco aplicando ultrasonidos y provocando, a continuación, la precipitación de la fracción no complejada *(Loftsson y Brewster, 1996).*

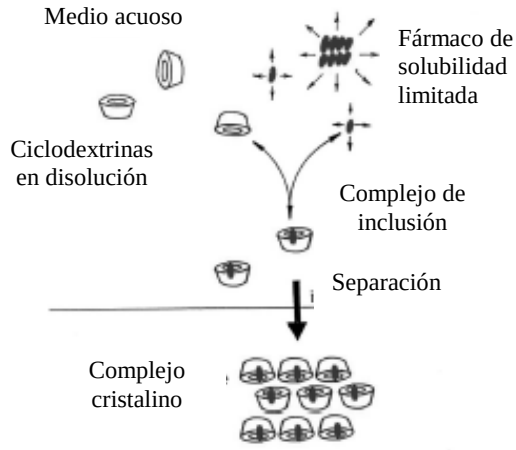


Figura 1.8.- Proceso de formación de complejos de inclusión en disolución.

Si la eficacia del proceso es baja, se requiren grandes cantidades de ciclodextrina para preparar el complejo. Además, ciertos componentes habituales de las formulaciones como los cosolventes *(Pitha y Hoshino, 1992; Loftsson y col., 1993)*, los conservantes *(Loftsson y col., 1992)*, los agentes osmóticos, los sistemas reguladores de pH, o los agentes tensoactivos *(Kraus y col., 1991)*, pueden dificultar significativamente el proceso. En estos casos, se puede promover la inclusión actuando sobre el grado de ionización del fármaco. En general, las formas no ionizadas dan lugar a complejos de inclusión más estables que las ionizadas, aun cuando su solubilidad intrínseca sea más baja. Una alternativa para mejorar la capacidad de complejación de las ciclodextrinas consiste en incorporar un tercer componente, que puede ser un hidroxiácido *(Esclusa-Diaz y col., 1996)* o un polímero hidrofílico *(Loftsson y col., 1994a; Loftsson y col., 1994b; Loftsson y col., 1994c)*. Con frecuencia se ha logrado un mayor incremento en la solubilidad de fármacos no ionizados mediante su ionización como paso previo al establecimiento del complejo de inclusión, a pesar de que éste se establezca más fácilmente con la forma no ionizada *(Loftsson y Brewster, 1996)*.

- *Coprecipitación*

Por el elevado consumo energético que implica, este método sólo es útil a nivel de laboratorio. Consiste en preparar una disolución de ciclodextrina a la que se añade el fármaco a concentraciones altas, bajo agitación y aplicando calor. Una vez que se recupera la temperatura ambiente, se produce la precipitación del complejo, que se separa por filtración o centrifugación.

- *Malaxado*

Consiste en mezclar el fármaco con la ciclodextrina en proporciones estequiométricas, adicionando una mezcla hidroalcohólica. Tras mezclar hasta conseguir una pasta relativamente homogénea, ésta se somete a desecación. En general, este procedimiento proporciona rendimientos de encapsulación bajos.

- *Molienda*

Se pulverizan en un molino mezclas de fármaco y ciclodextrina. Esta técnica sólo es aplicable, con buenos resultados, a un número limitado de sistemas.

- *Atomización*

Se prepara una disolución de fármaco y ciclodextrina en proporciones estequiométricas y, a continuación, se elimina el disolvente por atomización.

1.1.1.d. Toxicidad

Las ciclodextrinas naturales se consideran seguras por vía oral ya que su absorción gastrointestinal es prácticamente nula *(Irie y Uekama, 1997)*. También son

compatibles con la vía ocular dado que no irritan el epitelio corneal ni la conjuntiva ocular y no producen lacrimeo. No obstante, su incorporación a este tipo de formulaciones se ve limitada por su interacción con los parabenos, y por la consiguiente reducción de la efectividad conservante que producen *(Lehner y col., 1993)*. Las ciclodextrinas son también potencialmente útiles como excipientes de formas de administración nasal, ya que actúan como promotores de la absorción de péptidos y proteínas sin dañar el funcionamiento del sistema mucociliar ni las estructuras mucosales *(Schipper y col., 1990; Merkus y col., 1993)*. Por vía rectal, promueven la absorción de macromoléculas, sin irritar significativamente la mucosa *(Watanabe y col., 1992)*. También se usan como excipientes de formas de aplicación tópica, si bien en cantidades elevadas pueden promover la extracción de ciertos componentes de la piel, deteriorando su funcionalidad como barrera *(Uekama y col., 1982; Okamoto y col., 1986)*.

El uso de las ciclodextrinas como componentes de formas parenterales se ve limitado por su potencial toxicidad cuando se administran por esta vía *(Irie y Uekama, 1997)*. Las ciclodextrinas naturales, en especial la β-ciclodextrina, pueden producir daño celular por su capacidad para unirse a la membrana formando complejos con fosfolípidos y colesterol y facilitando así su extracción. Como consecuencia de ello, se altera su permeabilidad y, si la concentración es suficientemente alta, se puede producir hemólisis *(Irie y col., 1982; Ohtani y col., 1989)*. La nefrotoxicidad de las ciclodextrinas está relacionada con sus efectos sobre las membranas de las células del túbulo proximal *(Rajewski y col., 1995)*. Para paliar estos problemas, se han preparado derivados metilados, hidroxialquilados e iónicos de alta solubilidad *(Szente y Szejtli, 1999)*. En general, una mayor hidrosolubilidad supone una menor toxicidad *(Uekama y Irie, 1987)*; por ejemplo, los derivados sulfato y sulfobutil-etil de la β-ciclodextrina muestran una actividad hemolítica mucho menor que la correspondiente ciclodextrina natural *(Macarak y col., 1991; Shiotani y col., 1995)*. Recientemente se ha comprobado que las β-ciclodextrinas modificadas con grupos amina cuaternaria no complejan

significativamente colesterol, lo que dota a estos derivados de un futuro prometedor como materiales hemocompatibles *(Li y col., 2004)*.

1.1.1.e. Estatus regulatorio

La α- y la β-ciclodextrina cuentan con sendas monografías en la United States Pharmacopoeia-National Formulary (USP30/NF25), en la Farmacopea Europea (EP, 4ª y 5ª Ed.) y en la Farmacopea Japonesa (JP, 14ª Ed.). Este es también el caso de algunos derivados de la β-ciclodextrina, como la 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina. Tanto la β-ciclodextrina como su derivado hidroxipropilado cuentan con sendas monografías en la Real Farmacopea Española (3ª Ed., 2005). En este momento se están elaborando monografías de la γ-ciclodextrina para las próximas ediciones de la USP y de la EP. Además, la β- y la γ- ciclodextrina están incluidas en la relación de productos reconocidos como generalmente seguros (GRAS) de la Food and Drug Administration (FDA), lo que las hace útiles como aditivos alimentarios *(Loftsson y col., 2005a)*.

En la actualidad se encuentran comercializados más de 30 medicamentos que incorporan alguna ciclodextrina como excipiente (Tabla 1.5):

Ciclodextrina	Fármaco	Vía	Nombre comercial	Mercado
α-CD	Alprostadilo	I.V.	Prostavastin, Caverject,Edex	Europa, Japón
	Cefotiam	Oral	Pansporin T	EEUU
	Alprostadil	Oral	Opalmon, Proenal	Japón
β-CD	Benexato	Oral	Ulgut, Lonmiel	Japón
	Dexametasona	Dérmica	Glymesason	Japón
	Yodo	Tópica	Mena-Gargle	Japón
	Nicotina	Sublingual	Nicorette	Europa
	Nimesulida	Oral	Nimedex, Mesulid	Europa
	Nitroglicerina	Sublingual	Nitropen	Japón
	Omeprazol	Oral	Omebeta	Europa
	Dinoprostone	Sublingual	Prostarmon E	Japón
	Piroxicam	Oral	Brexin	Europa
	Ácido tiaprofénico	Oral	Surgamyl	Europa
Hidroxipropil -β-CD	Cisaprida	Rectal	Propulsid	Europa
	Hidrocortisona	Bucal	Dexocort	Europa
	Indometacina	Colirio	Indocid	Europa
	Itraconazol	Oral, I.V.	Sporanox	Europa, EEUU
	Mitomicina	I.V.	Mitozytrex	EEUU
Metil-β-CD	17-β-estradiol	Spray nasal	Aerodiol	Europa
	Cloranfenicol	Colirio	Clorocil	Europa
Sulfobutiléter β-CD	Voriconazol	I.V.	Vfend	Europa, EEUU
	Ziprasidone maleato	I.M.	Geodon, Zeldox	Europa, EEUU
Hidroxipropil -γ-CD	Diclofenaco sódico	Colirio	Voltaren	Europa

Tabla 1.5.- Ejemplos de especilidades farmacéuticas comercializadas que incorporan ciclodextrinas en su composición (Davis y Brewster, 2004).

1. 1. 2. *UTILIDAD DE LAS CICLODEXTRINAS EN LA FORMULACIÓN DE MEDICAMENTOS*

Inicialmente las ciclodextrinas se introdujeron en Tecnología Farmacéutica para resolver problemas de formulación relacionados con la baja solubilidad, la inestabilidad y la volatilidad de algunos fármacos *(Nakai y col., 1983; Loftsson y Brewster, 1996; Bibby y col., 2000; Loftsson y col., 2004b)*. Posteriormente, se desarrollaron otras interesantes aplicaciones como la reducción de la irritación gástrica y ocular, la mejora de las propiedades organolépticas (sabor, color y olor), la transformación de fármacos líquidos en polvos microcristalinos o amorfos, o la compatibilización de fármacos entre sí o con excipientes *(Challa y col., 2005)*. En los últimos años, el potencial de las ciclodextrinas como componentes funcionales de sistemas de liberación controlada de fármacos está despertando una atención creciente *(Uekama, 2004)*.

1.1.2.a. Hidrosolubilización de fármacos

Es la aplicación más común y también la más directa *(Szejtli, 1988; Frömming y Szejtli, 1994)*. La introducción de las ciclodextrinas sustituidas ha supuesto un gran avance en esta línea y ha permitido resolver algunos de los dificiles problemas de formulación que plantean los fármacos de muy baja solubilidad *(Loftsson y col., 1991; Gorecka y col., 1995; Sigurdadóttir y Loftsson, 1995)*. Por ejemplo, la α-ciclodextrina y la dimetil-β-ciclodextrina permiten solubilizar eficazmente péptidos como la ciclosporina A *(Uekama, 2004)*. En general, el efecto hidrosolubilizante de las ciclodextrinas se puede mejorar incorporando aditivos, como electrolitos o polímeros hidrofílicos, que incrementan su afinidad por el fármaco *(Loftsson y col., 1994 a, b y c; Faucci y Mura, 2001; Valero y col., 2003)*. Los polímeros hidrofílicos permiten reducir

la cantidad de ciclodextrina necesaria para solubilizar la dosis de fármaco, hasta un 40-50% *(Loftsson, 1998; Loftsson y Massón, 2004; Loftsson y col., 2005a).* Con frecuencia, para que este efecto se manifieste resulta necesaria la aplicación de calor o de ultrasonidos *(Nakai y col., 1987).*

Los sistemas ternarios fármaco-ciclodextrina-polímero hidrofílico, que se obtienen en estado sólido por liofilización, presentan una solubilidad más alta que la de los sistemas binarios obtenidos en ausencia del polímero. Adicionalmente, el polímero puede contribuir a regular la velocidad de disolución del fármaco *(Mura y col., 2001; Pose-Vilarnovo y col., 2002).* No obstante, en algunos casos los polímeros hidrofílicos interaccionan con las ciclodextrinas, estableciendo complejos de inclusión, lo que reduce el número de cavidades disponibles para ser ocupadas por el fármaco. Para que estos sistemas, conocidos como polirotaxanos o pseudo-polirotaxanos, se puedan formar es necesario que el diámetro de la cavidad de la ciclodextrina sea compatible con las dimensiones del polímero hidratado *(Harada y Kamachi, 1990; Harada y col., 1994,; Hladon y Cwiertina, 1994; Harada, 1997; Rodríguez-Pérez y col., 2006b).* La complejación puede ser completa, si la cadena lineal se introduce en un número suficiente de cavidades de la ciclodextrina, o parcial, si en la ciclodextrina sólo se introducen cadenas laterales. En cualquiera de los dos casos, se forma una estructura supramolecular en la que el polímero se enhebra en las unidades de la ciclodextrina, que simulan las cuentas de un collar. Si la complejación es reversible se utiliza el término pseudorotaxano. Los rotaxanos son sistemas similares en los que la cadena polimérica presenta en sus extremos dos grupos voluminosos que bloquean las ciclodextrinas, haciendo la formación del complejo irreversible (Figura 1.9).

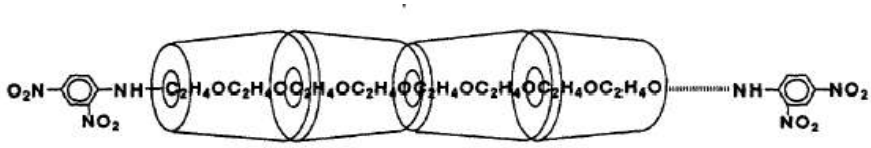


Figura 1.9 .- Ejemplo de un rotaxano *(Harada y col., 1994).*

La síntesis de rotaxanos ha abierto un nuevo campo de investigación dentro del diseño de macromoléculas, hasta tal punto que también se ha planteado la posibilidad de reticular con epiclorhidrina ciclodextrinas próximas dentro de la estructura de un rotaxano previamente formado para dar lugar a lo que se conocen como polímeros tubulares (Figura 1.10) *(Harada, 1997).*



Figura 1.10.- Estructura de un polímero tubular de ciclodextrina *(Harada, 1997).*

La formación de estos complejos está, obviamente, condicionada por factores estéricos dependientes de la ciclodextrina y del polímero. Así, mientras la α-ciclodextrina es capaz de complejar polietilenglicoles de diferentes pesos moleculares *(Harada y col., 1994),* la β-ciclodextrina puede hacerlo con polipropilenglicoles *(Harada y Kamachi, 1990)* y la γ-ciclodextrina con polimetilviniléter *(Harada y col., 1993).* Al estar el polímero englobado en las ciclodextrinas, su hidrofilia se incrementa, con lo que se modifica su conformación en el agua y, consecuentemente, propiedades como su capacidad viscosizante y su respuesta a cambios de temperatura. Además, la ciclodextrina puede dotar a los polímeros de nuevas funcionalidades, bien por

sustitución de algún grupo hidroxilo o por reacción con agentes reticulantes para formar hidrogeles.

1.1.2.b. Estabilización química de fármacos

El efecto de las ciclodextrinas sobre la estabilidad química de los fármacos resulta dificilmente predecible; en algunos casos es positivo, en otros no se manifiesta y en ocasiones incluso se aceleran los procesos de degradación *(Loftsson y Brewster, 1996)*. Las aplicaciones más relevantes en este campo se relacionan con la protección de ciertos fármacos frente a la oxidación *(Tavornvipas y col., 2004)*, la hidrólisis *(Maffeo y col., 2006)* o el calor *(Hadaruga y col., 2006)*.

1.1.2.c. Estabilización física de fármacos y formas de dosificación

Como es sabido, la estructura cristalina de los fármacos condiciona de manera decisiva su solubilidad y su velocidad de disolución, lo que puede tener un importante efecto sobre su biodisponibilidad *(Amidon y col., 1995)*. En general, los fármacos amorfos presentan una solubilidad más alta que en sus formas cristalinas. Sin embargo, el uso de fármacos en estado amorfo puede plantear problemas de estabilidad física. Para prevenir las transiciones polimórficas que pueden sufrir ciertos fármacos, como el nifedipino y el cloramfenicol, se ha acudido a la formación de complejos de inclusión *(Hirayama y col., 1997; Uekama y col., 1998; Kimura y col., 1999)*. Algunos derivados amorfos de las ciclodextrinas, como la hidroxipropil-β-ciclodextrina, también se han mostrado útiles para evitar el crecimiento cristalino *(Yoshida y col., 1989)*. Por otra parte, la incorporación a un complejo de inclusión reduce la volatilidad de fármacos con

elevada presión de vapor, contribuyendo a la estabilización de sus formulaciones *(Szente y col., 1985).*

En la formulación de fármacos peptídicos, se ha comprobado que la sulfobutiléter-β-ciclodextrina (SB4-CD) ralentiza el proceso de agregación de la insulina, facilitando su formulación en formas de administración subcutánea *(Uekama, 2002)*, y que el uso de éste y otros derivados hidrofílicos de β-ciclodextrina evita la adsorción de péptidos por los componentes hidrofóbicos de los materiales de acondicionamiento *(Tokihiro y col., 2000; Okimoto y col., 1999).*

1.1.2.d. Mejora en la biodisponibilidad

La biodisponibilidad oral de fármacos de Clase II (baja solubilidad, alta permeabilidad) y IV (baja solubilidad, baja permeabilidad) del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica se puede mejorar incorporándolos a complejos con ciclodextrinas *(Amidon y col., 1995; Loftsson y col., 2005a).* Los derivados de ciclodextrina más hidrofílicos se han mostrado especialmente aptos para esta aplicación, y han permitido mejorar sensiblemente la biodisponibilidad de esteroides, glucósidos cardiotónicos, antiinflamatorios no esteroídicos (AINES), barbitúricos, antiepilépticos, benzodiacepinas, antidiabéticos, antifúngicos, antibióticos e inmunosupresores *(Uekama y Otagiri, 1987; Brewster y col., 1991; Albers y Muller, 1992; Miyake y col., 1999; Arima y col., 2001).*

La formación de complejos puede servir también para incrementar la absorción nasal y subcutánea de polipéptidos como la calcitonina *(Challa y col., 2005)*, previniendo su degradación enzimática y promoviendo su penetración. Por ejemplo, se ha comprobado que la α-ciclodextrina reduce el aclaramiento mucociliar de acetato de

leuprolide tras su administración nasal *(Shimamoto, 1987)* y que la dimetil-β-ciclodextrina promueve la absorción de insulina cuando se administra por esta vía *(Schipper y col., 1992).* La administración de estradiol en forma de complejos de inclusión formando parte de comprimidos sublinguales acelera su absorción y reduce el efecto de primer paso hepático *(Loftsson y col., 2003).*

1.2. LAS CICLODEXTRINAS EN LIBERACIÓN CONTROLADA Y VECTORIZADA

1. 2. 1. *COMPLEJOS FÁRMACO:CICLODEXTRINA*

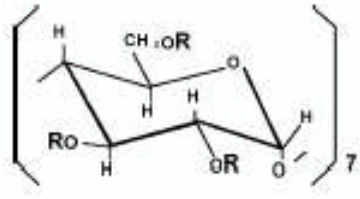
Las ciclodextrinas pueden jugar papeles diferentes en la formulación de sistemas de liberación controlada de fármacos, dependiendo de su polaridad y grado de ionización *(Challa y col., 2005)*:

- Los **derivados hidrofílicos** mejoran la solubilidad y la velocidad de disolución de principios activos de baja hidrosolubilidad, y se utilizan mayoritariamente en la formulación de sistemas de liberación inmediata *(Zhang y Rees, 1999; Loftsson y col., 2003)*.

- Los **derivados ionizables**, que presentan sustituyentes con grupos ácido débil, se pueden utilizar para la formulación de sistemas de liberación retardada y entérica. Como ya se comentó, la solubilidad de estas ciclodextrinas es muy dependiente del pH (Figura 1.3). A pH neutro o alcalino, los grupos ácido se ionizan y la solubilidad se incrementa, induciéndose la liberación del fármaco *(Uekama y col., 1993)*.

- Los **derivados hidrofóbicos**, en particular los alquilados y los esterificados, permiten prolongar en el tiempo la liberación de fármacos hidrosolubles, tanto convencionales como peptídicos, cuando se administran por vía oral o transdérmica *(Irie y Uekama, 1999; Yamada y col., 1999)*. Las ciclodextrinas aciladas, si se seleccionan adecuadamente los sustituyentes, sirven para modular la cesión de fármacos, y las per-O-aciladas con sustituyentes de tamaño no superior a seis átomos de carbonos, como la perbutiril-β-CD (Figura 1.11), permiten obtener complejos que combinan hidrofobicidad y mucoadhesividad elevadas. Se ha

acudido a esta aproximación para desarrollar formulaciones orales de molsidomina y salbutamol *(Hirayama y col., 1995a; Hirayama y col., 1995b).* Derivados etilados de la β-ciclodextrina se han utilizado con éxito para conseguir una liberación controlada de acetato de buserelina a partir de soluciones oleosas administradas por vía endovenosa *(Matsubara y col., 1994).*



COMPUESTO	R
β -ciclodextrina (βCD)	H
Per-O-acetil-β-ciclodextrina (TAβCD)	$COCH_3$
Per-O-propinoil-β-ciclodextrina (TPβCD)	COC_2H_5
Per-O-butiril-β-ciclodextrina (TBβCD)	COC_3H_7
Per-O-valeril-β-ciclodextrina (TVβCD)	COC_4H_9
Per-O-hexanoil-β-ciclodextrina (THβCD)	COC_5H_{11}
Per-O-octanoil-β-ciclodextrina (TOβCD)	COC_7H_{15}
Per-O-decanoil-β-ciclodextrina (TDβCD)	COC_9H_{19}
Per-O-dodecanoil- β-ciclodextrina (TLβCD)	$COC_{11}H_{23}$

Figura 1.11.- Derivados acilados de la β-ciclodextrina (βCD).

Cuando el objetivo que se plantea es modular el proceso de cesión, se puede acudir al uso de combinaciones de ciclodextrinas. Sistemas constituidos por complejos de un derivado hidrofílico (hidroxipropil- β-ciclodextrina) -que promueve la cesión rápida de una fracción de la dosis- y de un derivado hidrofóbico (triacetil-β-ciclodextrina)- responsable de la cesión prolongada de la fracción restante- se han mostrado eficaces para conseguir una liberación controlada de nicardipino *(Fernándes y Veiga, 2002; Fernándes y col., 2003).* En sistemas ternarios captoprilo/hidroxipropil-β-ciclodextrina/perbutanoil-β-ciclodextrina, se ha puesto de manifiesto un efecto sinérgico de las dos ciclodextrinas sobre el control de la cesión, que se ha atribuido a la capacidad filmogénica del derivado hidrofílico *(Ikeda y col. 2000).* Finalmente, se ha propuesto el uso de ciertos derivados, como la sulfobutiléter-ciclodextrina para que además de incrementar la solubilidad de fármacos poco solubles, actúen como agentes osmóticos *(Okimoto y col., 1999).*

El campo de aplicación de las ciclodextrinas se ha extendido hasta el extremo de que hoy en día constituyen el punto de partida de estructuras poliméricas capaces de aunar en una misma molécula las propiedades de las matrices poliméricas y la capacidad de las ciclodextrinas para formar complejos de inclusión con diferentes principios activos. De este modo es posible evitar que el fármaco una vez disociado del complejo precipite por dilución en los fluidos corporales. La precipitación de un determinado fármaco tras administrarlo incorporado a una forma farmacéutica en la que se encuentra formulado, estableciendo un complejo de inclusión con una ciclodextrina, depende de la solubilidad intrínseca del mismo, de la intensidad de la interacción entre el fármaco y la ciclodextrina (caracterizada por la constante de formación de complejo) y de la estequiometría del complejo establecida sobre la base de su diagrama de solubilidad *(Rajewski y Stella, 1996).* Cuando la relación entre la solubilidad del fármaco y la concentración de ciclodextrina es de tipo lineal, rara vez se produce la precipitación del fármaco por efecto de la dilución en los fluidos fisiológicos, mientras

que cuando se pierde la linealidad cabe esperar que el fármaco precipite modificándose de forma importante su biodisponibilidad. De hecho, cuando el complejo de inclusión fármaco-ciclodextrina presenta una estequiometría 1:1, la solubilidad del fármaco aumenta de manera lineal a medida que se incrementa la concentración de ciclodextrina. En este caso no es tan relevante la fracción de fármaco libre tras la administración ya que, a pesar de la dilución y la rápida disociación del complejo, la concentración de fármaco permanece por debajo de su solubilidad intrínseca. En la figura 1.12 se compara el comportamiento frente a la dilución de dos fármacos, uno de los cuales forma complejos de inclusión de estequiometría 1:1 (Figura 1.12A) mientras que el otro lo hace en relaciones 1:1 y 1:2 (Figura 1.12B). En este último caso, se observa un aumento no lineal de la solubilidad del fármaco a medida que incrementa la concentración de ciclodextrina. Tras la dilución de una disolución del complejo, se produce la precipitación del fármaco.

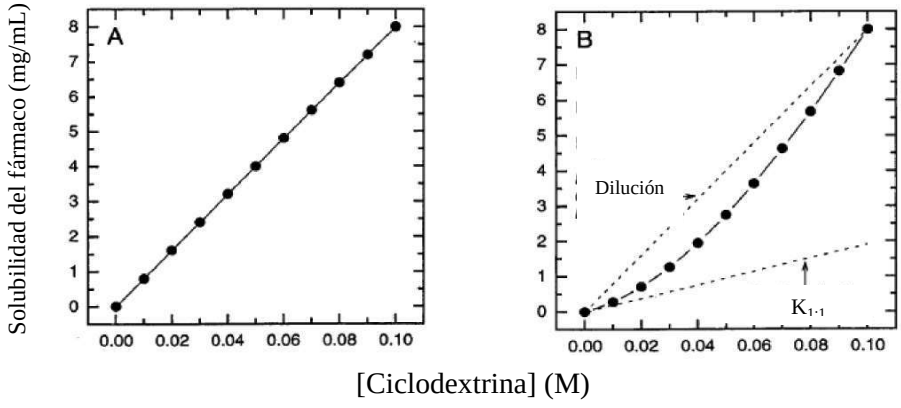


Figura 1.12.- Evolución de la solubilidad en función de la concentración de ciclodextrina; A: el fármaco forma complejos de inclusión de estequiometría 1:1, B: El fármaco forma complejos de inclusión de estequiometría 1:1 y 1:2 *(Rajewski y Stella, 1996).*

1. 2. 2. *COMPLEJOS FÁRMACO:CICLODEXTRINA DISPERSOS EN MATRICES HIDROFÍLICAS*

La incorporación de ciclodextrinas a geles físicos o a comprimidos matriz hidrofílica no sólo modifica la solubilidad del fármaco sino que también puede afectar a su capacidad de difusión a través del entramado polimérico. En general, la ciclodextrina facilita la hidratación de la matriz, incrementa la velocidad de disolución del fármaco con el que forme complejo y promueve la erosión de la capa de gel, facilitando la liberación *(Bibby y col., 2000; Pose-Vilarnovo y col., 2004).* Sin embargo, cuando el tamaño de malla es suficientemente pequeño, la velocidad de cesión se puede reducir si el radio hidrodinámico del complejo es significativamente mayor que el del fármaco libre. Cuando sólo las moléculas libres son capaces de abandonar el sistema, la afinidad del fármaco por la ciclodextrina regulará la velocidad de cesión. La presencia de otros componentes puede alterar el equilibrio de complejación, favoreciendo o dificultando la velocidad del proceso de liberación *(Loftsson y col., 1994b; Stella y Rajewski, 1997),* que también se puede ralentizar si la ciclodextrina interacciona con la cadena polimérica y actúa como un obstáculo para la difusión del fármaco libre o reduce la movilidad del complejo.

1. 2. 3. *MICROPARTICULAS Y SISTEMAS COLOIDALES*

La incorporación de fármacos en complejos de inclusión a microsferas o a nanopartículas permite incrementar la capacidad de carga y modular el proceso de cesión *(Monza da Silveira y col., 1998; Duchêne y col, 1999; Memisoglu y col., 2003*). Se ha descrito un efecto de este tipo en formulaciones de microesferas de nifedipino e

hidrocortisona a base de quitosano y β-ciclodextrina *(Filipovic-Grcic y col., 1996; 2000)*.

El uso de ciclodextrinas permite evitar las interferencias que producen ciertos fármacos hidrofóbicos en la formación de la capa lipídica de los liposomas. Además, ofrece la posibilidad de incorporar fármacos de este tipo a la fase acuosa. En estos sistemas, la nefrotoxicidad de las ciclodextrinas se atenúa considerablemente al tiempo que se mejora considerablemente la eficacia terapéutica de los fármacos. Con este objetivo se ha formulado en liposomas doxorrubicina *(Arima y col., 2006)*, dexametasona *(Piel y col., 2006)*, prednisolona *(Fatouros y col., 2001)*, nifedipino *(Skalko y col., 1996)* e indometacina *(Loukas y col., 1998)* junto con distintas ciclodextrinas.

1. 2. 4. *CONJUGADOS FARMACO: CICLODEXTRINA*

Algunos fármacos se pueden unir covalentemente a las ciclodextrinas mediante enlaces éster o amida, para dar lugar a sistemas conjugados con los que se consigue una cesión específica a nivel del colon. Estos profármacos se mantienen inalterados en el tracto gastrointestinal hasta que en el colon se produce una degradación enzimática de los enlaces, por acción de la microflora natural de esta zona del tracto digestivo, liberándose el fármaco (figura 1.13).

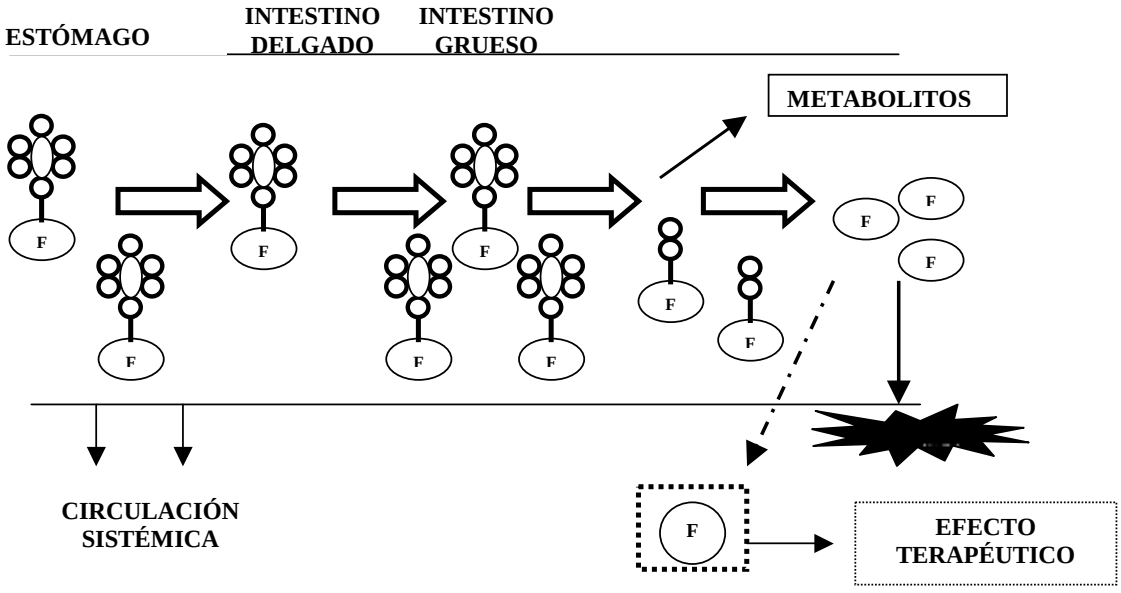


Figura 1.13.- Esquema de liberación de fármacos a nivel colónico a partir de conjugados fármaco-ciclodextrina.

Entre los conjugados fármaco-ciclodextrina que se han desarrollado hasta el momento se encuentran los de ketoprofeno y α-ciclodextrina *(Kamada y col., 2002)*, los de ácido bifenilacético con α-, β-, γ-ciclodextrinas por medio de enlaces tipo éster o amida *(Uekama y col., 1997)*, y los de prednisolona con α-ciclodextrina *(Yano y col., 2001)*.

Los conjugados de fármaco-ciclodextrina se pueden combinar en la misma forma farmacéutica con un complejo de inclusión de ese fármaco y una ciclodextrina hidrofílica para obtener diferentes perfiles de liberación (Figura 1.14).

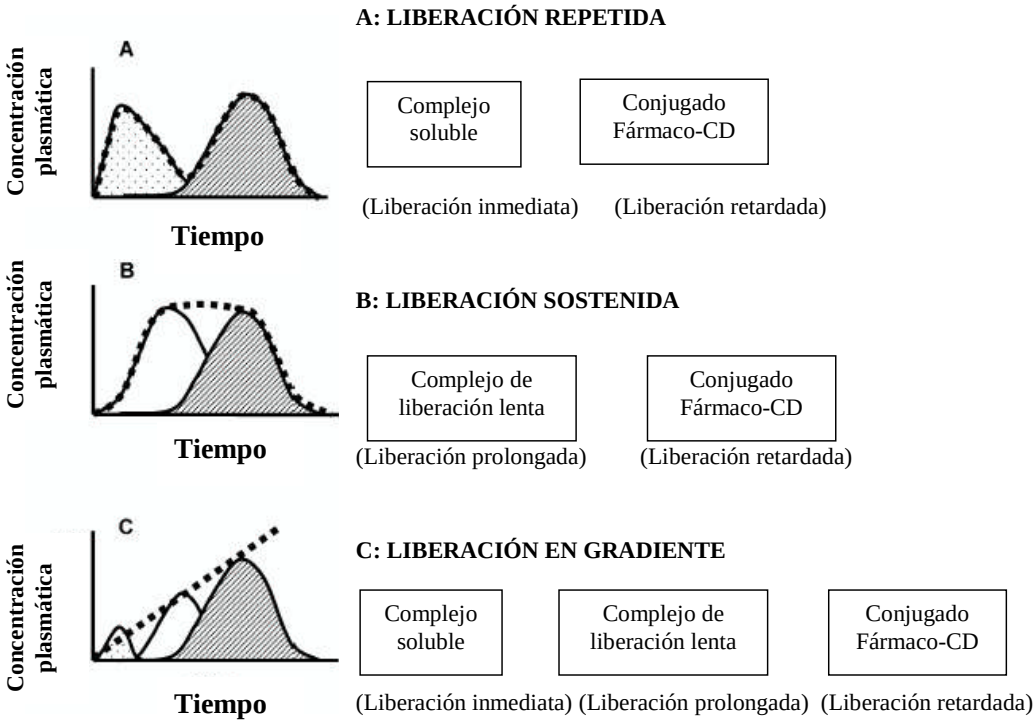


Figura 1.14.- Posibilidades de liberación que ofrecen los conjugados fármaco-ciclodextrina *(Uekama, 2004).*

Si la ciclodextrina es hidrofílica, el complejo dará lugar a una rápida liberación de una fracción de la dosis para que se absorba de una manera inmediata (Figura 1.14A); si la ciclodextrina es hidrofóbica se pueden obtener niveles de fármaco sostenidos a lo largo del tiempo (Figura 1.14B); si se combinan complejos hidrofílicos e hidrofóbicos, junto con el conjugado, se obtiene una liberación gradual del fármaco (Figura 1.14C) *(Uekama,2004).*

1. 2. 5. *POLÍMEROS E HIDROGELES DE CICLODEXTRINA*

El término polímero de ciclodextrina hace referencia a cualquier material constituido por varias de sus unidades enlazadas covalentemente formando estructuras lineales o ramificadas *(Frömming y Szejtli, 1994)* (Figura 1.15). Cuando las cadenas de polímero se unen entre sí en una malla tridimensional, en la que puede alojarse un volumen importante de agua sin que las uniones (puntos de reticulación) se rompan, el sistema se conoce como hidrogel de ciclodextrina *(Kanjickal y col., 2005)*. Los polímeros de ciclodextrina despiertan un gran interés en sí mismos y su preparación puede constituir, además, una etapa previa en la síntesis de los hidrogeles. En algunas ocasiones es posible combinar en un único hidrogel mallas de distinta composición que se encuentren entrelazadas sin que entre ellas se establezcan uniones químicas. Estos hidrogeles se conocen como interpenetrados *(Lee y col., 2001)*. Tanto los polímeros como los hidrogeles de ciclodextrina tienen una gran utilidad potencial como vehículos de fármacos convencionales y de origen biotecnológico *(Mocanu y col., 2001; Chien y Lin, 2002)*.

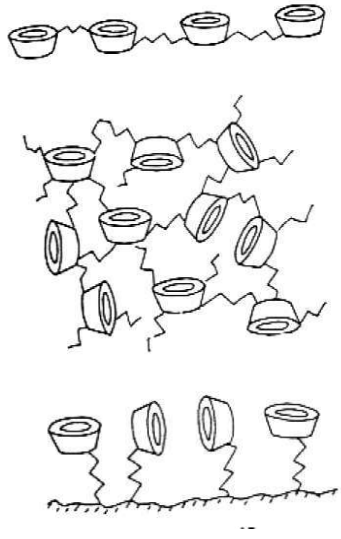


Figura 1.15.- Estructuras características de materiales poliméricos formados por unidades de ciclodextrina unidas covalentemente *(Frömming y Szejtli, 1994)*.

En general, los hidrogeles se obtienen por procedimientos de síntesis muy versátiles y presentan una elevada biocompatibilidad *(Peppas y col., 2004).* Una vez hidratados se comportan como sistemas viscoelásticos, lo que los dota de una consistencia muy adecuada para su manipulación y evita que se produzca daño mecánico cuando entran en contacto con los tejidos biológicos. Frente a estas ventajas tienen el inconveniente de que suelen presentar una afinidad muy baja por fármacos poco hidrosolubles, que dificulta su incorporación al entramado, y una escasa capacidad de control de la liberación del fármaco cargado, especialmente si éste es muy hidrofílico *(Coughlan y col., 2004).* Para paliar estos inconvenientes se puede acudir a aproximaciones como la incorporación de los fármacos formando parte de sistemas vesiculares como micelas o liposomas *(Fallons y Chauhan, 2006)* o el *imprinting molecular (Alvarez-Lorenzo y Concheiro, 2004; Asanuma y col., 2004; Hiratani y col., 2005).* En los últimos años se está evaluando el potencial que ofrece la unión química de unidades de ciclodextrina a la estructura de los hidrogeles, con el fin de dotarles de la capacidad de complejación de las ciclodextrinas.

La hidratación de un hidrogel se produce inicialmente por solvatación de los grupos polares de su estructura. Una vez que estos grupos están hidratados, otros menos hidrofílicos se exponen hacia el medio acuoso e interaccionan con nuevas moléculas de agua. El agua que se incorpora al hidrogel por este mecanismo recibe el nombre de agua unida. Además, las fuerzas osmóticas promueven la penetración de cantidades adicionales de agua, que se comporta como agua libre. El proceso de hinchamiento finaliza cuando se establece un equilibrio entre las fuerzas osmóticas y las fuerzas de retracción, causadas por los enlaces covalentes y las interacciones de carácter atractivo entre los componentes del hidrogel *(Tamai y Tanaka, 1996).*

El contenido en agua y, en consecuencia, la biocompatibilidad de un hidrogel depende en buena medida de su composición, que es determinante para el paso de sustancias, que como el oxígeno o los nutrientes, son esenciales para la actividad biológica. La proporción de agua en el hidrogel condiciona también su aptitud para

incorporar fármacos. La permeabilidad de un hidrogel a un soluto depende de factores como el tamaño y la morfología molecular del propio soluto, su polaridad y la cantidad de agua disponible para hidratarlo y disolverlo. La permeabilidad (P) se puede estimar como el producto del coeficiente de reparto agua/hidrogel (K) por el coeficiente de difusión aparente del fármaco (D_{app}). Tanto el coeficiente de reparto como la uniformidad en la distribución en el hidrogel dependen a su vez de la carga neta de las moléculas de fármaco, del contenido en grupos apolares o iónicos del entramado polimérico, y de las condiciones del entorno.

1.2.5.a. Preparación de polímeros de ciclodextrina

Todas las rutas de síntesis de polímeros de ciclodextrina se basan en la reactividad de los grupos hidroxilo libres que están orientados hacia el exterior de la cavidad *(Loftsson y Brewster, 1996)*. Como consecuencia de ello la cavidad de la ciclodextrina se mantiene accesible en los polímeros para la formación de complejos de inclusión con fármacos *(Friedman, 1991)*. Los primeros polímeros de ciclodextrina se obtuvieron utilizando como agentes polimerizantes sustancias bi o multifuncionales. Con posterioridad se han sintetizado polímeros lineales y estructuras complejas a través de la polimerización de ciclodextrinas modificadas con grupos acrílicos o vinílicos *(Martel y col., 2005)*. Para optimizar las características de los polímeros de ciclodextrina se pueden combinar diferentes ciclodextrinas entre sí o con otros componentes (Figura 1.15).

Reticulación con agentes bi o multifuncionales

Un reactivo muy utilizado en la síntesis de polímeros de ciclodextrina es la epiclorhidrina *(Harada y col., 1981; Uekama y col., 1985; Renard y col., 1997a y 1997b; Li y col., 2004).* Esta sustancia, que cuenta con un grupo epóxido y otro alquilhaluro en su estructura, puede intervenir en una gran variedad de reacciones (Figura 1.16).

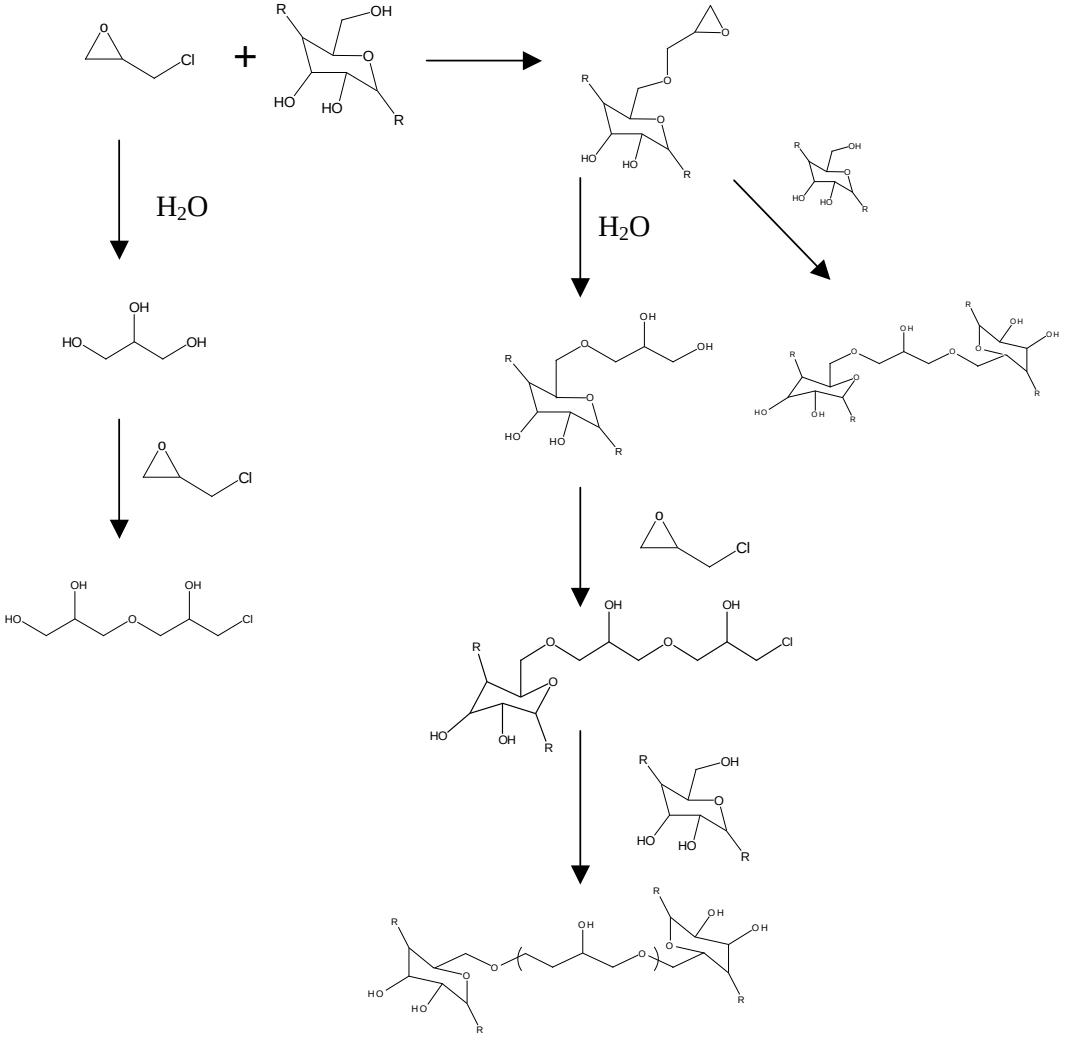


Figura 1.16.- Diferentes posibilidades de reacción de la β-ciclodextrina con epiclorhidrina.

En presencia de ciclodextrinas y en medio alcalino puede intervenir en reacciones de sustitución para dar lugar a derivados de las ciclodextrinas naturales, servir como puente de unión entre dos unidades de ciclodextrina o sufrir procesos de hidrólisis seguida de autopolimerización *(Szejtli y col., 1982a; Friedman, 1991)*. Por lo tanto no se obtiene un producto puro, sino una mezcla heterogénea de varios gliceril éteres de ciclodextrina.

Los primeros polímeros de ciclodextrina se sintetizaron por este procedimiento a partir de una mezcla de las tres ciclodextrinas naturales *(Solms y Egli, 1965)*. El proceso transcurre muy lentamentemente, lo que facilita el control del número de unidades de ciclodextrina que se incorporan a la cadena polimérica. Ello ha permitido obtener polímeros con pesos moleculares muy variados *(Renard y col., 1997b)*. El material resultante, que una vez desecado presenta una elevada capacidad de incorporación de agua, se utilizó en forma de polvo como adsorbente selectivo en separaciones cromatográficas *(Wiedenhof y Frieling, 1971; Fenyvesi y col., 1985)*.

Para sintetizar polímeros de ciclodextrina también se han usado otros agentes bifuncionales como los alquilenglicoldiglicildil éteres *(Szejtli y col., 1982a)*, el bis(epoxipropil)éter *(Cserhati y col., 1992)*, el butilenglicol bis(epoxipropil)éter *(Cserhati y Forgacs, 1994)*, los haluros dicarboxílicos y ciertos diácidos, diésteres y diisocianatos *(Mizobuchi y col., 1980; Zemel y Koch, 1990)*. Cuando estos agentes presentan una cadena hidrocarbonada relativamente larga entre los dos grupos reactivos los polímeros que se obtienen son flexibles.

Polimerización de ciclodextrinas funcionalizadas con grupos acrílicos

Se pueden obtener monómeros acrílicos de ciclodextrina haciendo reaccionar una ciclodextrina natural con un nitrofenil éster (Figura 1.17). La polimerización de estos

monómeros conduce a policiclodextrin-acrilatos de peso molecular comprendido entre 10^4 y 10^5 Da.

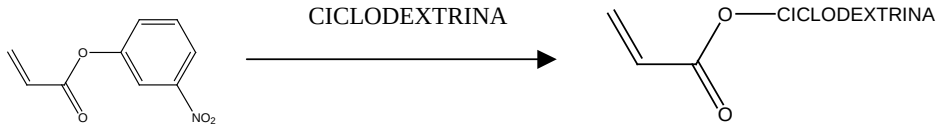


Figura 1.17.- Formación de un monómero acrílico de ciclodextrina *(Harada y col., 1976).*

El empleo de diclohexilcarbodiimida ha permitido llevar a cabo reacciones de condensación entre β-ciclodextrina y ácido acrílico para la síntesis de monómeros capaces de polimerizar y dar lugar a hidrogeles adecuados para modular la liberación de clorambucilo *(Huang y Fan, 2006).* También se pueden preparar monómeros por condensación de ciclodextrinas naturales con N-(hidroximetil)acrilamida para obtener acrilamidometil-ciclodextrinas (Figura 1.18) *(Siemoneit y col., 2006).*

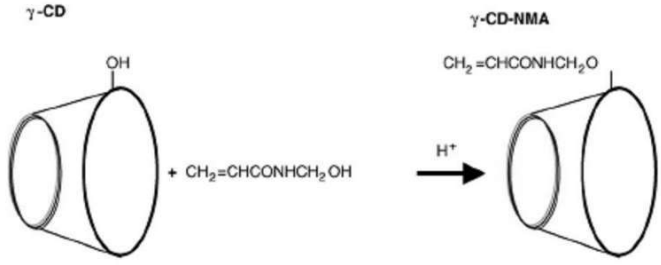


Figura 1.18.- Representación esquemática de la síntesis de acrilamidometil-γ-ciclodextrina a partir de γ-ciclodextrina y N-(hidroximetil)acrilamida *(Siemoneit y col., 2006).*

Unión de ciclodextrinas a esqueletos poliméricos preformados

Las ciclodextrinas se pueden unir a cadenas poliméricas haciendo reaccionar los grupos funcionales reactivos del polímero con los grupos hidroxilo de las ciclodextrinas *(Mocanu y col., 2001).* La estructura de los polímeros resultantes es muy variada, al

igual que sus campos de aplicación. En la tabla 1.6 se recogen algunos ejemplos que prueban la utilidad de este procedimiento.

Las ciclodextrinas también se pueden fijar sobre soportes insolubles como celulosa y derivados celulósicos, polivinil acetato, poliacrilamida o gel de sílice *(Szejtli, 1988)*. Los materiales resultantes se utilizan ampliamente como fases estacionarias de columnas de cromatografía *(Faraji, 2005)*.

Soporte	Reactivo de unión	Ciclodextrina	Características	Referencia
Polivinilalcohol	Epiclorhidrina	β -ciclodextrina γ-ciclodextrina	Partículas, fibras, films para absorción de compuestos orgánicos en columnas de cromatografía	*Szejtli y col., 1979a* *Zsadon y col., 1983* *Yoshinaga, 1991a*
	Hexametileno diisocianato	α-ciclodextrina	Membranas	*Baldet y Deratani, 1999*
Hidroxietilmetacrilato	Hexametileno diisocianato	β -ciclodextrina	Absorbentes de esteroides	*Sreenivasan, 1997a*
Polivinilamina		β-monotosil-ciclodextrina	Polímero lineal catalizador de agentes de hidrólisis	*Crini y col., 1997* *Crini y col., 1998* *Martel y col., 1995*
Polialilamina		β-mono-6-desoxi-6-iodo-ciclodextrina β-monotosil-ciclodextrina	Films y membranas Polímero lineal	*Yoshinaga, 1991b* *Seo y col., 1987* *Hollas y col., 1998*
Polivinilimidazol		6-O-(3-Cl-2-hidroxipropil)-β -ciclodextrina	Polímero lineal	*Deratani y col., 1995*
Poliisopropilacrilamida		Mono-etilendiamina-β–ciclodextrina	Geles sensibles a la temperatura	*Nozaki y col., 1997*
Cell-CH_2-CO-Cl		Monohidroxi-per-metilada- β-ciclodextrina	Inclusión de fármacos	*Kawaguchi, 1996*
Quitosano deacetilado	Hidroxietilmeta crilato	Ciclodextrina modificada con un grupo aldehido	Inclusión de diferentes compuestos	*Sakairi, 1999*
Sepharose 6B	1,4-bis-(2,3-epoxipropoxi)-butano	α -ciclodextrina	Partículas esféricas de aplicación en cromatografía	*Vretblad, 1974*
Biogel	Succinil hidrazida	Monoamino- β -ciclodextrina	Partículas esféricas de aplicación en cromatografía	*Tanaka y col., 1981* *Tanaka y col., 1982*
Poliuretano	Toluen-2,4-diisocianato	β -ciclodextrina		*Sreenivasan, 1996*
PSCM		β-amino-ciclodextrina	Columnas cromatográficas	*Tabushi y col. 1979*

Tabla 1.6.- Algunos ejemplos de copolímeros que contienen ciclodextrinas en su estructura

Con frecuencia la solubilidad de los polímeros de ciclodextrina es superior a la de las ciclodextrinas de partida (por ejemplo, 360 vs. 16-18 g/l, en el caso de un polímero soluble de la β-ciclodextrina obtenido por reticulación con epiclorhidrina y la ciclodextrina natural). Los polímeros que presentan un peso molecular comprendido entre 3000 y 6000 Da. se dispersan en agua con facilidad, llegando a alcanzar concentraciones de hasta 400-600 g/l, sin que la viscosidad se eleve de forma acusada *(Szejtli, 1988).* En el campo de la Tecnología Farmacéutica, estos polímeros cuentan con importantes aplicaciones, relacionadas preferentemente con la hidrosolubilización de fármacos de baja solubilidad, en particular con estructuras moleculares grandes, y el control de la difusión/liberación *(Fenyvesi y col., 1984; Uekama y col., 1985; Szeman y col., 1987; Fenyvesi y col., 1996).*

1.2.5.b. Preparación de hidrogeles de ciclodextrina

Los hidrogeles de ciclodextrina están constituidos por largas cadenas poliméricas formando una red tridimensional insoluble. El grado de reticulación, estimado como la relación molar entre el agente reticulante y los monómeros, determina el tamaño de malla y la capacidad de hinchamiento del sistema. El grado de empaquetamiento del entramado es muy dependiente de la proporción y la naturaleza de los agentes reticulantes que intervienen en la síntesis. Por ejemplo, si se utiliza un glicol de bajo peso molecular, como el etilenglicol, el propilenglicol o el polietilenglicol, se forma una estructura más empaquetada que la que se obtiene si los grupos reactivos del agente reticulante están más separados. Los entramados muy reticulados no hinchan en agua. Aunque en cromatografía tienen interés como material de relleno, en Tecnología Farmacéutica su utilidad muy limitada *(Lee y col., 2002).*

La capacidad de las unidades de ciclodextrina para formar complejos una vez que se han incorporado al hidrogel depende de las características del entramado. La inclusión de las moléculas de fármaco en las cavidades sólo se produce si no están obstruidas y si, además, el tamaño de malla no impide la penetración del fármaco en el sistema. En el interior del hidrogel se pueden formar complejos de orden superior al que se observa cuando la correspondiente ciclodextrina se encuentra libre en disolución. Comparativamente con los complejos en fase homogénea, la estabilidad de los que se forman en el seno de los hidrogeles es significativamente mayor *(Harada y col., 1981; Szeman y col., 1987; Bettinetti y col., 1989; Li y col., 2004).*

Procedimientos de preparación

Los hidrogeles se pueden preparar a partir de monómeros o de polímeros ya formados. En el primer caso, la síntesis y la reticulación del polímero se producen de manera simultánea, mientras que en el segundo, la formación del hidrogel tiene lugar mediante el establecimiento de uniones covalentes entre grupos funcionales de un polímero preformado y un agente reticulante.

Reticulación y polimerización simultáneas.

En la formación de hidrogeles a partir de monómeros pueden intervenir los mecanismos que se indican a continuación:

a. *Condensación:*

   Las moléculas, de igual o de distinta naturaleza, que van a entrar a formar parte del entramado se unen como consecuencia de la reacción química de grupos funcionales ácido, alcohol o amina, y la consiguiente liberación de moléculas residuales (generalmente, agua). Para que se forme un hidrogel y no simplemente

una cadena lineal, al menos una de las sustancias reaccionantes tiene que presentar más de un grupo reactivo en su estructura. Además, para facilitar el inicio de la reacción, se incorpora un catalizador.

Para preparar hidrogeles de ciclodextrina por este procedimiento se utilizan agentes reticulantes como la epiclorhidrina o derivados de isocianatos que son capaces de reaccionar con grupos hidroxilo *(Hishiya y col.,1999; Fundueanu y col., 2003; Kanjickal, y col. 2005; Zhang y col., 2005; Sreenivasan, 1997a)*. De esta manera, se han sintetizado, por ejemplo, hidrogeles de β-ciclodextrina capaces de cargar y de ceder de manera controlada ácido salicílico *(Sreenivasan, 1997b)* y entramados interpenetrados de poli- β-ciclodextrina (preparados por reacción con epiclorhidrina) y poli(N-isopropilacrilamida) que cargan y liberan ibuprofeno de manera sostenida *(Zhang y col., 2005)*.

b. *Adición:*

Para que se produzcan reacciones de adición hay que partir de monómeros con uno o más dobles enlaces reactivos en su estructura. La polimerización comienza con la formación de radicales libres, que se originan como consecuencia de la descomposición de un iniciador químico o por un aporte energético. Estos radicales libres reaccionan con un doble enlace de un monómero y generan un nuevo centro activo, que a su vez reacciona con otro monómero. La reiteración de este proceso conduce, finalmente, a la formación del polímero *(Osada, 2001)*. En la polimerización pueden intervenir monómeros con un solo doble enlace, que dan lugar a cadenas lineales primarias, o monómeros con dos o más dobles enlaces, que actúan como agentes reticulantes de las cadenas en formación. La reticulación se puede producir en una misma cadena, dando lugar a estructuras cíclicas, o afectar a varias cadenas originando una red tridimensional. Cuando el número de uniones

entre las cadenas de polímero en formación supera un cierto valor, se obtiene un hidrogel viscoelástico *(Sellergren y Hall, 2001*; Figura 1.19*).*

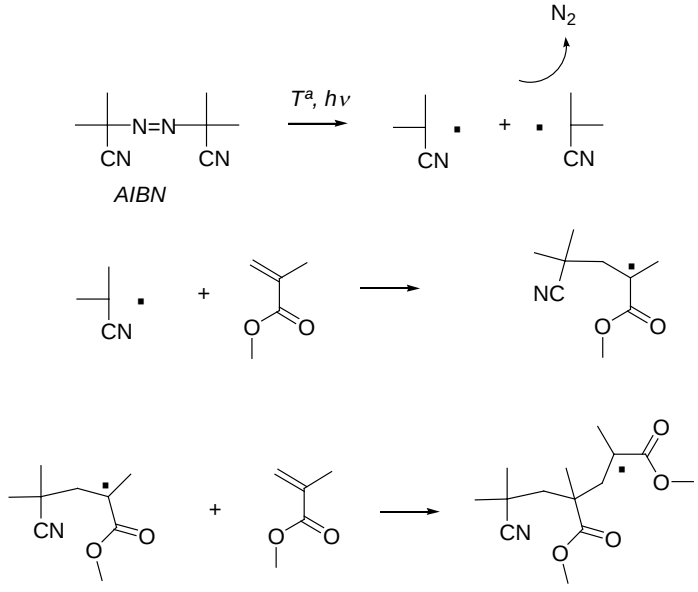


Figura 1.19.- Proceso de formación de radicales libres por descomposición de un iniciador e inicio del proceso de polimerización de un monómero acrílico *(Sellergren y Hall, 2001).*

La union química se puede conseguir haciendo reaccionar monómeros vinílicos o acrílicos de ciclodextrina entre sí o con otros monómeros (Figura 1.20) *(Quaglia y col., 2001; Pariot y col.,2002; Liu y col., 2004c; Davis y Brewster, 2004; Liu y Fan, 2005; Zhang y col., 2005).* Siguiendo este procedimiento, se han preparado hidrogeles de N-isopropilacrilamida con un derivado maleico de la β-ciclodextrina *(Liu y col., 2004)* e hidrogeles de ácido acrílico con monómeros de γ-ciclodextrina obtenidos por policondesación con N-hidroximetilacrilamida *(Siemoneit y col., 2006).*

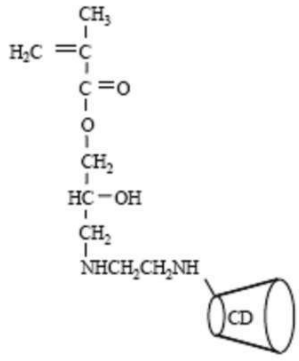


Figura 1.20.- Monómero de monovinil β-ciclodextrina que, por copolimerización, da lugar a hidrogeles de β-ciclodextrina *(Liu y Fan, 2005).*

Reticulación post-polimerización:

La formación del hidrogel también se puede producir partiendo de polímeros ya formados, estableciendo uniones entre los grupos funcionales resultantes de las reacciones de condensación o promoviendo su formación por radicales libres *(Yamauchi, 2001).*

En la tabla 1.7, se muestran algunos de los agentes reticulantes utilizados en la síntesis de hidrogeles a partir de polímeros previamente formados.

AGENTE RETICULANTE	TIPO DE POLÍMERO
Compuestos dialdehídicos	Polímeros con grupos amino e hidroxilo.
Compuestos amínicos	Polímeros halogenados, polímeros ésteres carboxílicos, isocianatos, bases epoxi.
Compuestos aziridínicos	Polímeros con sales carboxílicas.
Fenoles di o polimetilo	Polímeros con grupos nitrilo, mercapto o carboxilo.
Compuestos halogenados	Polímeros con grupos amino o dieno.
Di o poliisocianatos	Polímeros con hidrógenos activos como -OH, -SH, -NH_2, -COOH.
Alcoholes (dioles, polioles, bifenoles)	Polímeros con grupos clorosulfonato o isocianatos.
Compuestos diepóxidos	Polímeros con sales carboxílicas y grupos hidroxilo, mercapto, clorosulfonato.

Tabla 1.7.- Algunos agentes químicos utilizados para reticular polímeros *(Li y col., 1989).*

Este procedimiento tiene, comparativamente con la polimerización-reticulación simultánea, la ventaja de que no plantea problemas de toxicidad por contaminación con residuos de monómeros *(Li y col., 1989).* En ocasiones, si el polímero es de naturaleza hidrofóbica, puede ser necesario modificarlo con el fin de introducirle grupos polares que posteriormente pueden servir de base para la creación de nuevos puntos de reticulación y facilitar la formación de un hidrogel químicamente reticulado (Figura 1.21).

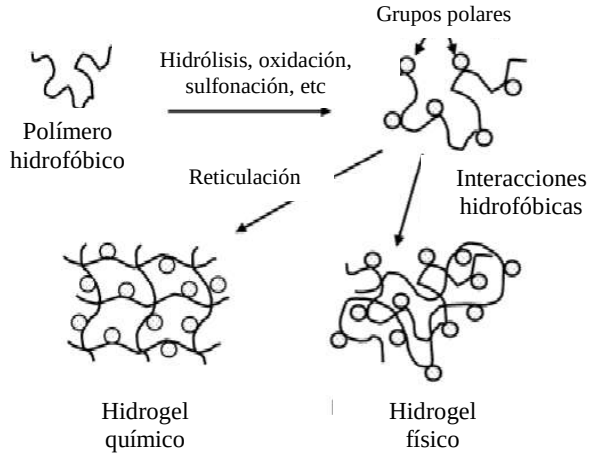


Figura 1.21.- Esquema de la preparación de hidrogeles mediante la modificación de polímeros hidrofóbicos *(Hoffman, 2002).*

Preparación de sistemas interpenetrados

Otra vía para la preparación de hidrogeles consiste en polimerizar un monómero en el seno de un entramado polimérico previamente sintetizado. De esta manera se obtiene un sistema interpenetrado (Figura 1.22), que consta de dos redes poliméricas independientes pero entrelazadas, una de las cuales se sintetiza y reticula (o no, en cuyo caso se habla de sistema semi-interpenetrado) en presencia de la otra *(Lee y col., 2001).*

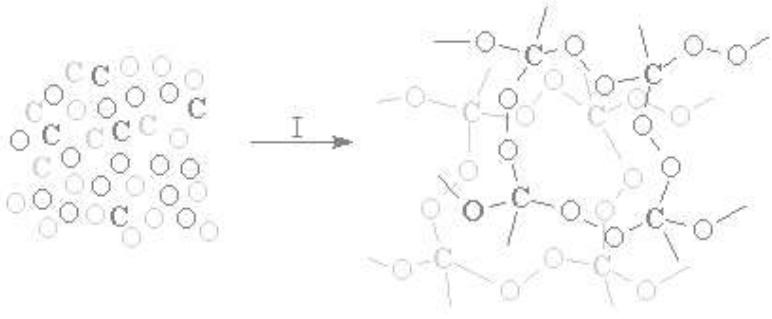


Figura 1.22.- Esquema de preparación de hidrogeles interpenetrados.

Los hidrogeles interpenetrados se caracterizan por presentar, en un mismo sistema dos entramados poliméricos diferentes que, por no encontrarse químicamente unidos, mantienen sus propiedades originales de modo que la resistencia mecánica del sistema es mayor que la de un entramado polimérico homogéneo *(Zhang y Peppas, 2000).* Este tipo de hidrogeles permiten aprovechar las características de los entramados individualmente considerados. Este es el caso de los hidrogeles interpenetrados de poli(N-isopropilacrilamida) y ácido polimetacrílico que combinan en un mismo sistema la capacidad de responder a cambios de temperatura o de pH del entorno *(Zhang y Peppas, 2000).*

En el caso de los hidrogeles de ciclodextrina es posible modular la liberación del fármaco a partir del sistema controlando los factores que puedan influenciar la formación de complejos de inclusión *(Liu y col., 2004a).* Si se combina un hidrogel de ciclodextrina con otro polímero, como el ácido polimetacrílico, para dar lugar a un hidrogel interpenetrado, este nuevo sistema conservará ciertas características de los dos sistemas de partida. El polímero de ciclodextrina le conferirá la capacidad de carga de control de la liberación del fármaco mediante fenómenos de complejación, mientras que el ácido polimetacrílico hará del sistema interpenetrado un hidrogel capaz de hinchar de acuerdo con el pH del medio (Figura 1.23) *(Liu y col., 2004a).*

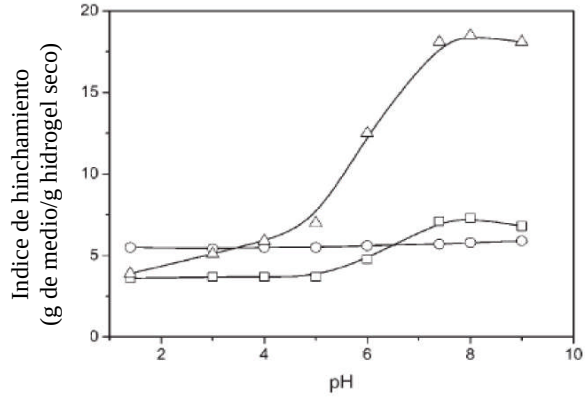


Figura 1.23.- Valores del índice de hinchamiento en función del pH para el hidrogel interpenetrado (□), el hidrogel de ciclodextrina (○) y el ácido polimetaacrílico (Δ) (Liu y col., 2004a).

Lo mismo sucede con los hidrogeles semi-interpenetrados formados a partir de un polímero de β-ciclodextrina, obtenido por reticulación con epiclorhidrina *(Renard y col., 1997b)*, y la poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPA). El sistema resultante mantiene la sensibilidad frente a la temperatura del medio que es característica de los hidrogeles de PNIPA (Figura 1.24) *(Zhang y col., 2005).*

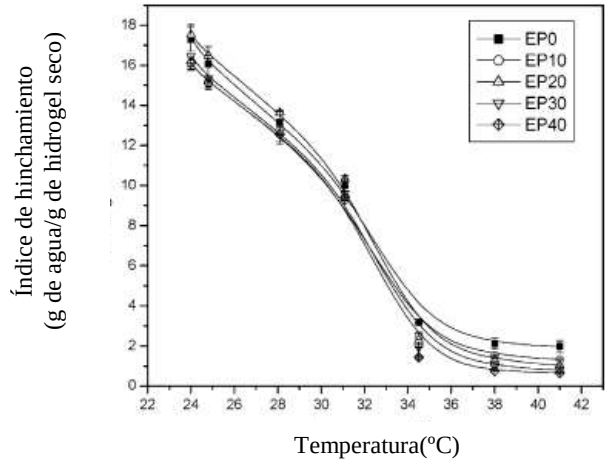


Figura 1.24.- Índice de hinchamiento frente a la temperatura para los hidrogeles de PNIPA con diferentes cantidades de polímero de β-ciclodextrina; EP0- hidrogel de PNIPA; EP10, EP20, EP30, EP40- hidrogeles semiinterpentrados con 10, 20, 30, 40 mg de hidrogel de β-ciclodextrina, respectivamente *(Zhang y col., 2005).*

El estudio de las cinéticas de hinchamiento ponen de manifiesto un comportamiento diferente entre el hidrogel de PNIPA y el sistema semi-interpentrado. La mayor velocidad de hinchamiento de éste último se asocia a la presencia de la β-ciclodextrina, que facilita la penetración de las moléculas de agua en el interior de la matriz polimérica y contribuye a la hidratación y expansión de las cadenas de polímero (Figura 1.25) *(Zhang y col., 2005).*

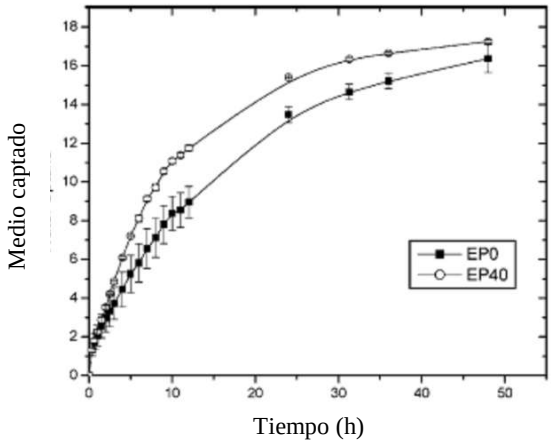


Figura 1.25.- Cinéticas de hinchamiento del hidrogel semiinterpenetrado (EP40) y del hidrogel de PNIPA (EP0) en tampón fosfato 0.1 M a pH 7.4 *(Zhang y col., 2005).*

1.2.5.c. Los hidrogeles de ciclodextrinas como sistemas de liberación de fármacos

Como se ha comentado en apartados anteriores, las ciclodextrinas pueden formar hidrogeles a través de enlaces covalentes entre ellas mismas o con otros componentes (Figura 1.26). Estos hidrogeles se han mostrado muy útiles para formular fármacos hidrofóbicos en materiales compatibles con un medio hidrofílico *(Crini y Morcellet, 2002; Liu y col., 2004a; Liu y col., 2004b; Uekama, 2004; Kanjickal y col., 2005).*

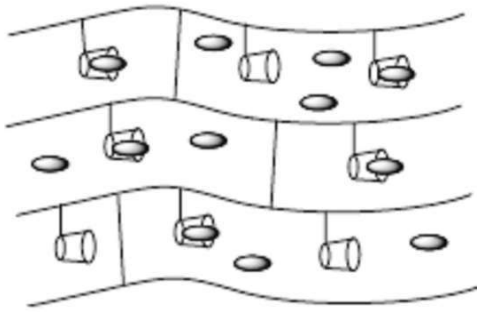


Figura 1.26.- Representación esquemática de un hidrogel constituido a base de ciclodextrinas (Liu y Fan, 2005).

La disociación de los complejos de ciclodextrina en disolución se produce de manera prácticamente instantánea, pudiendo llegar a precipitar el fármaco por dilución en el medio biológico *(Uekama y col., 1994; Stella y Rajewski, 1997; Stella y col., 1999).* En cambio, en el caso de los hidrogeles las unidades de ciclodextrina permanecen fijas en el espacio y el volumen de agua que penetra en el entramado está limitado por su estructura, con lo que el efecto de la dilución es mínimo. De este modo se consigue un microambiente rico en cavidades disponibles para interaccionar con las moléculas de fármaco. Además, las ciclodextrinas mantienen en la red polimérica su capacidad de complejación *(Layre y col., 2002; Uekama, 2004; Liu y col., 2005).* Como consecuencia de ello, estos materiales resultan muy útiles para conseguir una cesión prolongada en el tiempo cuando entran a formar parte de sistemas de liberación de fármacos destinados a la administración oral, bucal o transdérmica *(Davis y Brewster, 2004; Liu y col., 2004a; Kanjickal y col., 2005; Siemoneit y col., 2006).*

Frente a la complejidad de otras alternativas, que requieren el empleo de disolventes orgánicos o la incorporación de estructuras transportadoras sofisticadas (*Gulsen y Chauhan, 2005*)**,** la preparación de hidrogeles de ciclodextrina se puede llevar

a cabo por procedimientos tecnológicos sencillos y que no plantean especiales dificultades de cambio de escala, partiendo de materias primas estables y biocompatibles *(Davis y Brewster, 2004; Kanjickal y col., 2005).*

En la Figura 1.27 se muestran los perfiles de liberación de clorambucilo a partir de un hidrogel preparado por copolimerización de un derivado maleico de la β-ciclodextrina (MAH- β-ciclodextrina) con N-isopropilacrilamida *(Liu y col., 2004b)*. El comportamiento pH dependiente de estos sistemas tiene su origen en el carácter ionizable del derivado maleico de la ciclodextrina.

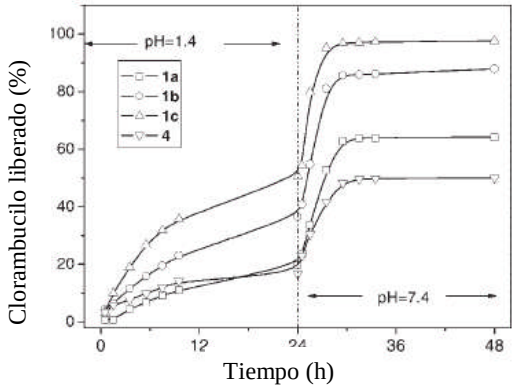


Figura 1.27.- Perfil de liberación pH-dependiente de clorambucilo a partir de diferentes tipos de hidrogel (1a- NIPA (91%)-MAH- β-CD (6.4%), 1b- NIPA (83%)-MAH-β-ciclodextrina (12%), 1c - NIPA (79%)-MAH- β -CD (15%), 4-NIPA/AAc).

Los monómeros de ciclodextrina con grupos vinílicos reactivos han sido objeto de numerosas investigaciones, ya que permiten obtener polímeros de ciclodextrina por homo- o copolimerización con otros vinil-monómeros (Figura 1.28) *(Harada y col., 1976; Liu y Fan, 2002; Liu y col., 2003).*

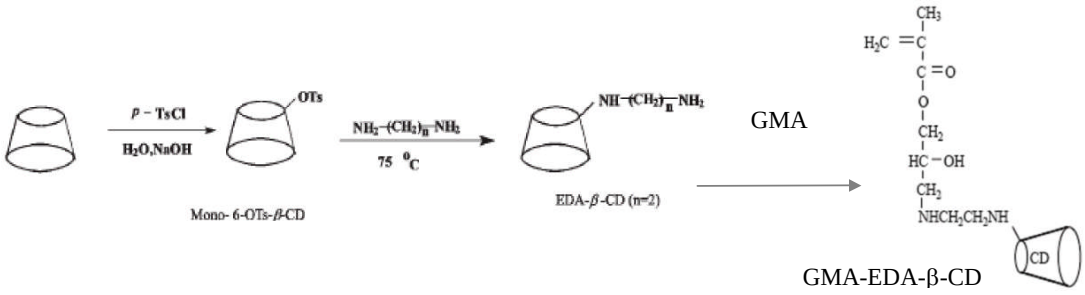


Figura 1.28.- Síntesis de un monómero vinílico de la β-ciclodextrina *(Liu y col., 2003).*

Por ejemplo, la copolimerización del monómero vinílico de la β-ciclodextrina (GMA-EDA- β -CD) con 2-hidroxietilacrilato (HEA) ha permitido sintetizar hidrogeles capaces de retrasar la liberación de melatonina más eficazmente que el polímero sintetizado en ausencia del derivado de la ciclodextrina. Ello es consecuencia de la formación de complejos de inclusión melatonina: β-ciclodextrina. En ambos tipos de sistemas la difusión del fármaco es el mecanismo que regula su liberación. Cuando la ciclodextrina se encuentra incorporada al sistema, el perfil de cesión está controlado por el proceso de disociación del complejo (Figura 1.29) *(Liu y Fan 2005).*

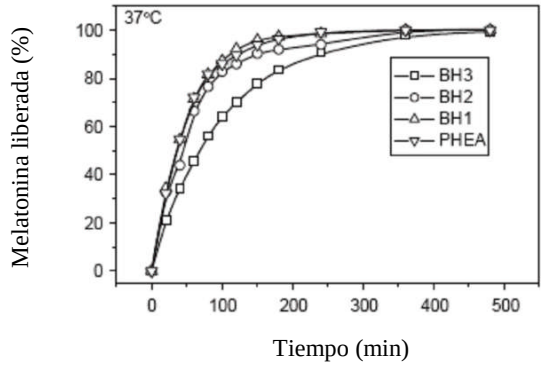


Figura 1.29.- Perfiles de liberación de melatonina a partir de hidrogeles obtenidos por copolimerización de HEA en ausencia de β-ciclodextrina (PHEA) o con diferentes proporciones de β-ciclodextrina: 3.2 % (BH1), 6.1 % (BH2), 8.9 % (BH3) *(Liu y Fan, 2005).*

La copolimerización con ciclodextrinas dota a los hidrogeles de ácido acrílico de capacidad para incorporar fármacos hidrofóbicos. Para obtener materiales de estas características se pueden preparar, en primer lugar, un monómero acrílico de γ-ciclodextrina por condensación con N-hidroximetilacrilamida *(Lee y col., 2001).* Además de multiplicar hasta 53 veces la capacidad de carga de fármaco, estos hidrogeles permiten controlar su cesión durante tiempos prolongados (Figura 1.30) *(Siemoneit y col., 2006).*

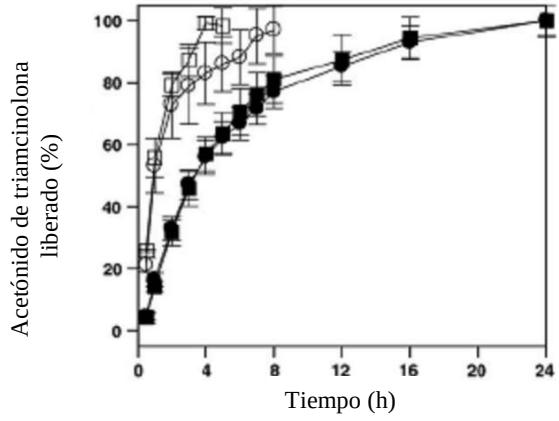


Figura 1.30.- Perfil de liberación del acetónido de triamcinolona en HCl 0.1 N (○,●) y en tampón fosfato pH 6.8 (■,□) a partir de hidrogeles sintetizados con acrilato sódico 3M sin (○,□) o con γ-ciclodextrina al 9.4% (●,■) *(Siemoneit y col., 2006).*

En otros casos la formación del hidrogel tiene lugar por reticulación física, es decir, las cadenas del polímero se introducen parcialmente en la cavidad de la ciclodextrina. Este es el caso de los hidrogeles supramoleculares establecidos entre la α-ciclodextrina y varios óxidos polietileno de diferentes pesos moleculares. Estos sistemas han resultado eficaces para la preparación de inyectables ya que presentan tixotropía, es decir, con moderada agitación su viscosidad disminuye para facilitar el paso a través de una aguja y la recuperan al cabo de pocas horas, dando lugar a una formulación depot

adecuada para la cesión controlada de diferentes principios activos, siendo la erosión el mecanismo de liberación preponderante *(Li y col., 2003).*

La incorporación de un polímero de β-ciclodextrina sintetizado utilizando epiclorhidrina a un hidrogel de N-isopropilacrilamida ha permitido obtener un sistema semi-interpenetrado capaz de modular la liberación de ibuprofeno *(Zhang y col., 2005).* El hidrogel de N-isopropilacrilamida presenta un marcado efecto burst y completa el proceso de cesión en pocas horas. Por el contrario, el sistema interpentrado es capaz de mantener la cesión de ibuprofeno durante 48 horas (Figura 1.31).

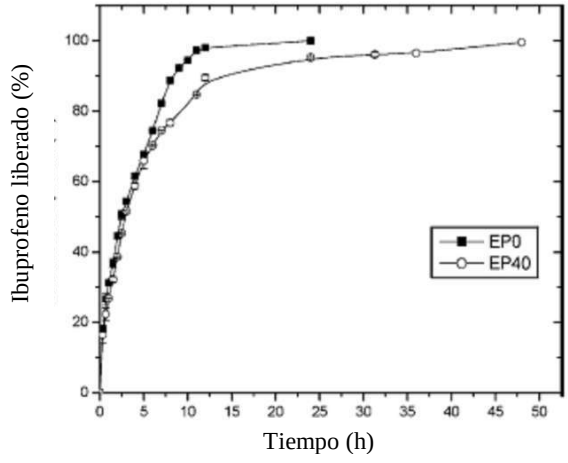


Figura 1.31.- Perfiles de cesión de ibuprofeno a partir del hidrogel semiinterpenetrado (EP40) y del hidrogel de PNIPA (EP0) en tampón fosfato 0.1 M a pH 7.4 *(Zhang y col., 2005).*

Para dotar a los hidrogeles de ciclodextrina de capacidad de reconocimiento de moléculas específicas y de control de la cesión, se puede acudir a las técnicas de *imprinting* o moldeado molecular *(Asanuma y col., 2001; Alvarez-Lorenzo y Concheiro, 2004*). Los materiales con impresión molecular o "*imprinted*" se diferencian de los convencionales en que la síntesis tiene lugar en presencia de moléculas de fármaco que

actúan como moldes, de manera que las ciclodextrinas se ordenan en torno al fármaco y adoptan una disposición espacial adecuada a la estructura de éste, que se hace permanente una vez que se produce el proceso de reticulación (Figura 1.32).

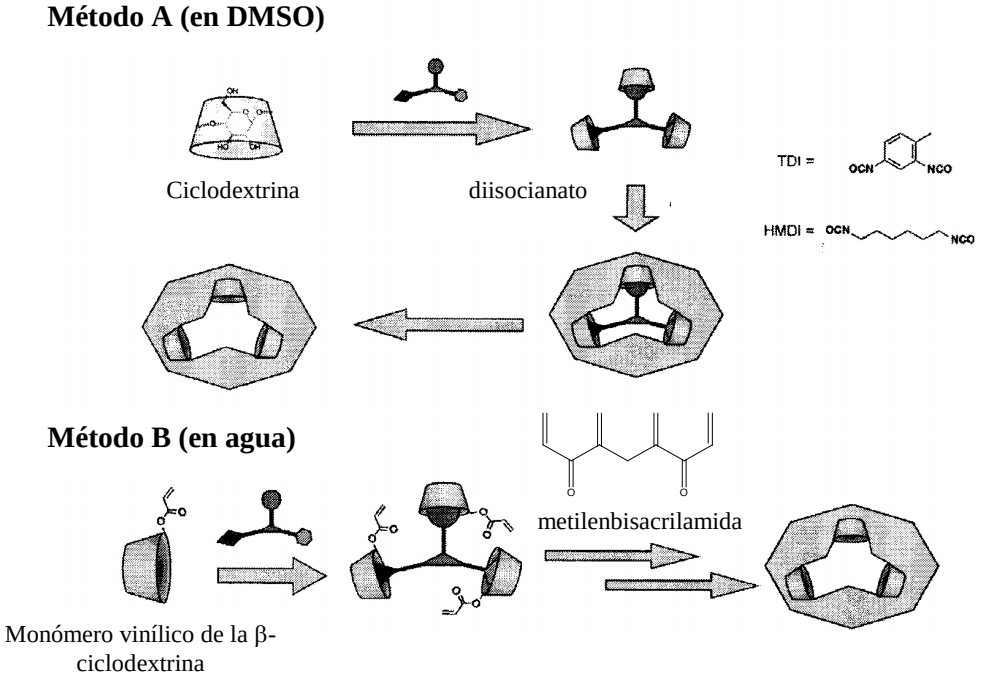


Figura 1.32.- Imprinting o moldeado molecular de ciclodextrinas como receptores de moléculas molde: A.-La ciclodextrina se reticula con isocianato en dimetilsulfóxido (DMSO) en presencia de la plantilla; B.- el monómero vinílico de la ciclodextrina es copolimerizado con metilenbisacrilamida, en agua, en presencia de la molécula molde *(Asanuma y col., 2001*).

El fármaco se elimina por lavado y se obtiene el hidrogel con las unidades de ciclodextrina agrupadas en forma de "receptores", de tal manera que cada unidad pueda interaccionar específicamente con una parte de la molécula de fármaco. Utilizando este procedimiento se han sintetizado entramados poliméricos con afinidad por fármacos peptídicos y antibióticos de estructura compleja muy superior a la de los geles convencionales *(Asanuma y col., 2001).*

2. Planteamiento y Objetivos

El trabajo se ha planteado con el objetivo de desarrollar nuevos materiales a base de ciclodextrinas que permitan aprovechar la capacidad de las ciclodextrinas para formar complejos e hidrosolubilizar fármacos de baja solubilidad, superando sus conocidas limitaciones en el campo de la liberación controlada. Para ello, se pretende inmovilizar las unidades de ciclodextrina en materiales poliméricos reticulados de naturaleza hidrofílica, que hagan posible la penetración del agua y la difusión del fármaco, evitando el efecto de dilución que experimentan las disoluciones de ciclodextrinas cuando entran en contacto con el medio biológico. Se pretende también dotar a estos materiales de propiedades mecánicas adecuadas para su utilización como soportes de sistemas de liberación de fármacos, de aptitud para responder a ciertos estímulos fisiológicos y de propiedades bioadhesivas.

Para alcanzar estos objetivos, el trabajo se ha planificado en las siguientes etapas:

a) Puesta a punto de nuevos procedimientos de reticulación de derivados de la β-ciclodextrina utilizando agentes reticulantes de reconocida atoxicidad, que permitan preparar, en condiciones suaves de pH y temperatura, hidrogeles con

consistencia y flexibilidad suficientes. Para la optimización de estos procedimientos se acudirá a técnicas reológicas.

b) Desarrollo, partiendo de los resultados obtenidos en el apartado anterior, de procedimientos que permitan co-reticular las ciclodextrinas con diferentes polisacáridos semisintéticos, con vistas a obtener sistemas con propiedades mecánicas, capacidad de hinchamiento y propiedades de carga y cesión de principio activo optimizadas. Para abordar este último aspecto, se seleccionarán el diclofenaco y el estradiol y se caracterizarán los complejos de inclusión de estos fármacos con las ciclodextrinas en disolución, con el fin de obtener información útil para dilucidar la contribución de los fenómenos de complejación al proceso de carga y al control de la cesión.

c) Preparación de sistemas interpenetrados que combinen entramados de ciclodextrinas con microgeles de ácido poliacrílico (Carbopol®). En estos sistemas se pretende integrar la capacidad de carga del hidrogel de ciclodextrina con la aptitud para responder a cambios de pH y la capacidad bioadhesiva de las cadenas de ácido poliacrílico. En esta etapa se analizarán también los posibles fenómenos de interacción Carbopol®/ciclodextrina y su efecto sobre la capacidad de complejación de estradiol y de ketoconazol. El trabajo se cerrará con el estudio de los procesos de cesión de estos fármacos a partir de los sistemas interpenetrados.

3. Trabajos publicados

CHARACTERIZATION OF CYCLODEXTRIN-CARBOPOL INTERACTIONS BY DSC AND FTIR

Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 77 (2004) 403-411

Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, Vol. 77 (2004) 403–411

CHARACTERIZATION OF CYCLODEXTRIN-CARBOPOL INTERACTIONS BY DSC AND FTIR

*Carmen Rodríguez-Tenreiro, Carmen Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro and J. J. Torres-Labandeira**

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 - Santiago de Compostela, Spain

Abstract

The interactions between Carbopol and β-cyclodextrin (BCD) or hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPBCD) were studied by differential scanning calorimetry (DSC) and FTIR spectroscopy. Aqueous solutions of both components were desiccated by freeze-drying or heating in an oven (films) at various temperatures. The use of different drying procedures allowed their influence on the interactions to be studied. The evolution of the Carbopol glass-transition was also evaluated by DSC using first heating runs up to different temperatures. Disappearance of the Carbopol glass-transition was observed in the freeze-dried systems prepared with either of the cyclodextrins and in the films that contained HPBCD. The changes in the FTIR band of Carbopol at 1700 cm^{-1} confirmed the existence of interactions with both cyclodextrins, especially with HPBCD. This information may be useful for optimising the solubilizing capacity and controlled release performance of aqueous Carbopol-cyclodextrin systems.

Keywords: Carbopol, cyclodextrin, DSC, film, freeze-dried, FTIR, glass-transition, Lorentzian deconvolution

Introduction

Cyclodextrins are cyclic oligosaccharides that are able to form inclusion complexes with several drugs thus changing their solubility and other physicochemical and biopharmaceutical properties [1, 2]. The concomitant presence of cyclodextrins and hydrophilic polymers in gels and tablets has recently been shown to be a useful way of modulating their swelling, adhesiveness and drug release behaviour [3, 4]. Furthermore, when cyclodextrins are combined with polymers, such as cellulose ethers and poly(vinylpyrrolidone), a solubilizing synergistic effect is observed [1, 5, 6]. Although this phenomenon has been reported in several publications, the mechanisms involved are still not well established. The proportion of the drug solubilized usually exceeds the stoichiometry of the inclusion complexes, which suggests the contributions of surfactant-like effects and of molecular aggregation [6].

* Author for correspondence: E-mail: ffjuant@usc.es

1388–6150/2004/ $ 20.00
© 2004 Akadémiai Kiadó, Budapest
Akadémiai Kiadó, Budapest
Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

Poly(acrylic acid) derivatives, and in particular Carbopol®, are hydrophilic polymers commonly used in pharmaceutical technology [7]. No information about the possible interactions between Carbopol and cyclodextrins, or about the effects of blends on drug hydrosolubilization, has been reported. The presence of a high density of carboxylic acid groups in the Carbopol network and of numerous hydroxyl groups in the cyclodextrins suggests that strong associative phenomena can occur [8]. Interactions between two amorphous substances can be observed as changes in their glass-transition temperatures, T_g [9], or in shifts in the characteristic IR absorption bands of some chemical groups [10]. Although cyclodextrins are known to crystallize as hydrated [11] glass transitions have been also reported and attributed to amorphous portions [12].

The aim of this study was to investigate the interactions between Carbopol and two cyclodextrins with different substitution characteristics. To carry out the work, films and freeze-dried systems were obtained from aqueous dispersions of both components. The analysis by quick characterization techniques, such as DSC and FTIR, of these systems and of physical mixtures should provide evidence of the interactions that could be induced in solution.

Experimental

Materials

Carbopol® 71G (batch C7075GJ013) was provided by BFGoodrich Europe, UK. β-cyclodextrin (BCD) and hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPBCD) (D.S. 4.6) were from Laisa-Roquette (Barcelona, Spain) and Janssen Pharmaceutische (Belgium), respectively.

Preparation of Carbopol-cyclodextrin blends

To aqueous solutions of cyclodextrin (15 mM), amounts of Carbopol were added to obtain a final concentration of 0.25% (mass/vol). The mixtures were stirred until the polymer was completely dispersed. Each solution was divided into three portions to be desiccated in an oven at 37 and at 70°C, to yield films, and for freeze-drying in Labconco Lyph-lock 6 apparatus (–34°C, 48 h) after frozen by immersion in liquid nitrogen.

As references, physical mixtures of cyclodextrin and Carbopol (50:50/ by mass) were prepared by mixing in a Turbula T2C mixer (Schweiz) for 10 minutes, and films of pure Carbopol were obtained by drying a 0.25% Carbopol aqueous dispersion at 37 and 70°C.

Differential scanning calorimetry

DSC experiments were carried out, in duplicate, using a DSC Q100 (TA Instruments, New Castle, DE, USA) with a refrigerated cooling accessory (RCS). Nitrogen was used as the purge gas at a flow rate of 50 mL min^{-1}. The calorimeter was calibrated for baseline using no pans, for cell constant and temperature using indium (melting

point 156.61°C, enthalpy of fusion 28.71 J g^{-1}), and for heat capacity using sapphire standards. All experiments were performed using non-hermetic aluminium pans, in which 2–5 mg of blend were accurately weighed, and then just covered with the lid. The samples were heated from 30 to 150, 200 or 250°C, then cooled to 0°C, and finally heated again to 300°C, always at 10 K min^{-1}.

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

Spectra were recorded using a FTIR Mattson ATR Spectra-Tech spectrometer (Germany) over the range 400–4000 cm^{-1} using the KBr pellet technique. Lorentzian deconvolution of Carbopol carbonyl groups was performed using a multi-peak curve-fitting software (Microcal Origin 5.0, Northampton, MA). The hydrogen-bonding percentage between Carbopol and cyclodextrin was calculated using the following equation [10]:

$$H\% = [A_{1730}/(A_{1730}+A_{1700})]100$$

where A_{1730} and A_{1700} are the area of the peaks at 1730±5 cm^{-1} and at 1700±5 cm^{-1}, respectively.

Results and discussion

Blends of Carbopol-cyclodextrin were desiccated by different techniques to study the influence of the preparation procedure on the visualization of the interactions. The behaviour of the pure components was used as a reference. DSC curves of pure Carbopol films prepared at 37 and 70°C presented three characteristic peaks; a broad endotherm between 50 and 100°C caused by evaporation of some water that remains in the film after desiccation (not observed in the second heating run), a step in the baseline around 133°C that is characteristic of its glass-transition, and a last endotherm, close to 250°C, that reflects the polymer decomposition process [13]. Cyclodextrins did not provide films and were analysed as the initial powder. The DSC curve for β-cyclodextrin powder shows the endotherm of evaporation of water adsorbed between 100 and 170°C, a glass-transition at 216°C, and finally the decomposition signal above 300°C [14]. The glass-transition of BCD could only be clearly observed in the first heating run.

Taking into account the thermal behaviour of each component, we carried out a first screening of the best conditions to detect changes in the T_g of the components when mixed. The maximum temperature of the first heating run seemed to be a critical parameter. Different DSC curves of physical mixtures and films were obtained as the conditions of the first scan were changed (Fig. 1). For example, when the physical mixture was initially heated to 250°C, neither the T_g of Carbopol nor the T_g of BCD was clearly observed, but two broad endotherms due to a) water evaporation and b) overlaping T_g of BCD with the beginning of polymer melting and decomposition. The second heating scan showed a glass-transition at a much greater temperature, around 200°C, than the Carbopol T_g. This behaviour suggests that, at the high tem-

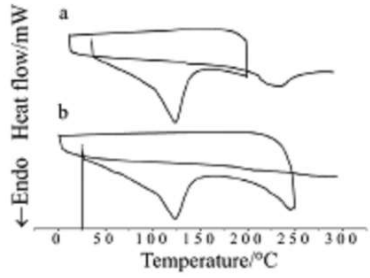


Fig. 1 DSC curves of the physical mixture Carbopol-BCD systems obtained applying a first heating until a – 250°C and b – 200°C

perature reached in the first heating run, the miscibility of both components is promoted, even in the physical mixture, and that the single relatively high T_g shown in the second run reflects the stiffness of the Carbopol/BCD complexes obtained, probably through hydrogen bonding [9].

In contrast, if the first heating run was stopped at 200°C, the Carbopol T_g was detected again in the second run of the physical mixtures, where a melting-decomposition endotherm at 225–250°C also appears. Similar results were found for the films, but the films were more heat-sensitive; i.e. the Carbopol T_g was only detected in the second run when the maximum temperature of the first heating run was 150°C. The same tendency was observed for Carbopol/HPBCD systems. Therefore, to avoid artefacts caused by temperature-induced association phenomena, all the subsequent experiments were carried out with first heating runs up to 150°C. Since the first runs only displayed water evaporation endotherms, only the second heating runs were used to analyse the cyclodextrin/Carbopol interactions.

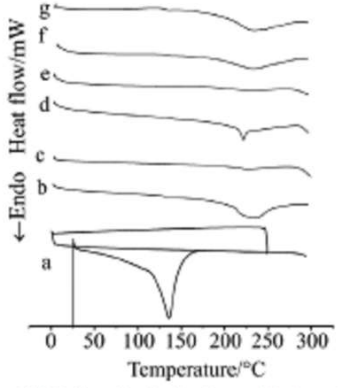


Fig. 2 DSC curves of a – BCD; b – physical mixture Carbopol+BCD; c – Carbopol-BCD blends dried under different conditions: oven at 37°C; d – oven at 70°C, e – freeze-drying; pure Carbopol film dried f – at 37°C and g – at 70°C

Figure 2 shows the DSC second heating runs of β-cyclodextrin/Carbopol blends obtained by physical mixing, oven desiccation or freeze-drying.

A change in the T_g of Carbopol in the DSC curves of the systems can provide information about its miscibility with the cyclodextrins (Table 1). The DSC results indicate that the Carbopol/BCD interaction can be only observed for the freeze-dried blends, because for the other two systems it is possible to observe a glass-transition around 133°C, which is associated with Carbopol. This result is supported by the presence of the endotherm of Carbopol decomposition in the physical mixture and in both kinds of films. The behaviour of the films did not seem to be affected by the temperature used to obtain them.

Table 1 Glass-transition temperature values of Carbopol and cyclodextrin blends after desiccation under different conditions. T_g values were reproducible to about ± 1°C

Systems		T_g/°C
Carbopol	37°C dried film	131.7
	70°C dried film	131.7
BCD	Pure	216.2
BCD:Carbopol	Physical mixture	130.3
	37°C dried film	134.4
	70°C dried film	127.4
	Freeze-dried	–
HPBCD	Pure	225.3
HPBCD:Carbopol	Physical mixture	131.1
	37°C dried film	–
	70°C dried film	–
	Freeze-dried	–

As in the case of pure BCD, the DSC curve of HPBCD shows a broad endotherm, between 50 and 150°C, owing to its dehydration [15], a glass-transition at 225°C and decomposition above 300°C. The main difference from the β-cyclodextrin/Carbopol mixtures was that, in the HPBCD/Carbopol systems, a glass-transition around the T_g of Carbopol was only recorded for the physical mixture. Both films and freeze-dried systems neither presented any T_g nor decomposition peaks (Fig. 3). These observations indicate that a stronger interaction in water occurs between HPBCD and Carbopol and that the complexes show a high thermal stability.

Further information was obtained from the analysis of the FTIR spectra of the films and the freeze-dried systems (Fig. 4). Cyclodextrins show the characteristic saccharide peaks around 1000–1200 cm^{-1} and the bent hydroxyl groups at water at 1635 cm^{-1} [16–18]. The broad band of Carbopol carboxyl groups at 1700 cm^{-1} is attrib-

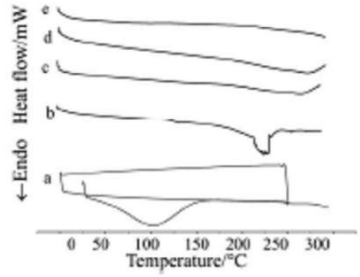


Fig. 3 DSC curves of a – HPBCD; b – physical mixture Carbopol+HPBCD; c – Carbopol -HPBCD blends dried under different conditions: oven at 37°C; d – oven at 70°C and e – freeze-drying

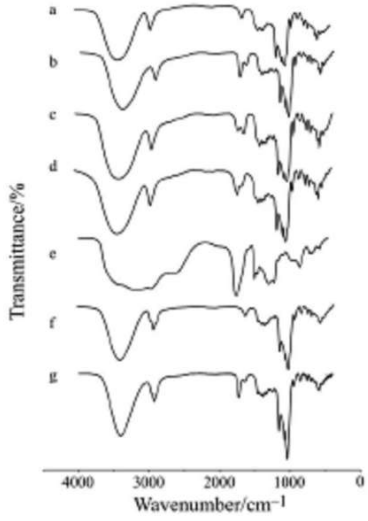


Fig. 4 FTIR spectra of a – BCD; b – Carbopo-BCD freeze-dried; c – film of Carbopol+ BCD dried at 37°C; d – film of Carbopol+BCD dried at 70°C; e – pure Carbopol film dried at 70°C; f – HPBCD and g – Carbopol-HPBCD freeze-dried

uted to the existence of two carbonyl populations; one corresponding to the intra- and intermolecular hydrogen bonding and another due to free carbonyl groups [8, 19].

The Carbopol carbonyl band moves to a higher vibration frequency (1715–1726 cm^{-1}) in the presence of cyclodextrins, indicating a diminution of the internal hydrogen bonding of Carbopol and the formation of new bonds with the cyclodextrins (Fig. 5). This shift is more intense in the FTIR spectra of blends containing HPBCD (1726 cm^{-1}) than in the β-cyclodextrin ones (1715–1721 cm^{-1}). The shift was a function of the desiccation procedure only in the case of BCD/Carbopol blends. As

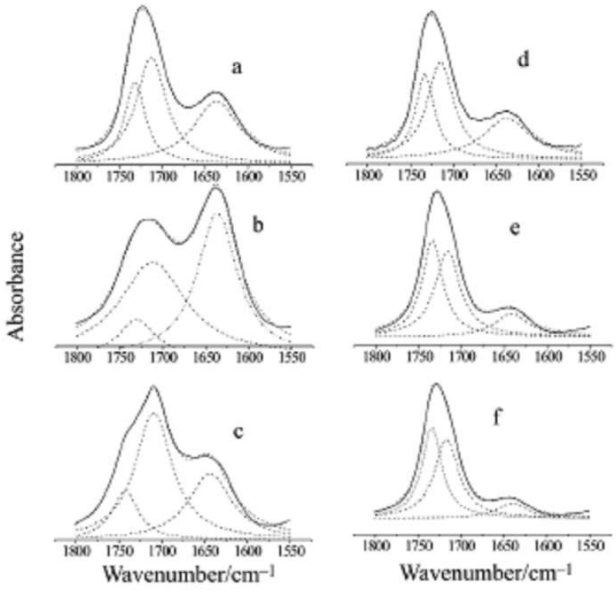


Fig. 5 Lorentzian curve-fitting of peaks between 1800 and 1600 cm^{-1} of FTIR spectra: a – Carbopol-BCD freeze-dried blend; b – films of Carbopol+BCD dried at 37°C; and c – at 70°C; d – Carbopol-HPBCD freeze-dried blend and films of e – Carbopol+HPBCD dried at 37°C; and f – at 70°C. The continuous line represents the absorbance observed; the dashed line the absorbance simulated for the Carbopol/cyclodextrin system; and the fine dashed lines, the simulated absorbances at 1700, 1730, 1636 cm^{-1}

found before in the DSC curves, the interaction in these blends is stronger in the freeze-dried systems (1721 cm^{-1}) than in the films (1715 cm^{-1}). It has been widely reported that hydrogen-bonding interactions between complementary polymers are promoted during freeze-drying [20]. A similar effect is expected to occur for the cyclodextrin/Carbopol systems.

Table 2 The percentage (H) of Carbopol carboxyl groups bound to the hydroxyl groups of cyclodextrins, estimated from Lorentzian multi-peak deconvolution of the FTIR spectrum bands between 1800–1600 cm^{-1}[9]

Systems		H%
BCD : Carbopol	37°C dried film	17.3
	70°C dried film	21.5
	Freeze-dried	34.3
HPBCD : Carbopol	37°C dried film	47.9
	70°C dried film	48.7
	Freeze-dried	38.2

To estimate the percentage of hydrogen bonding with cyclodextrins, the overlapped bands of Carbopol carbonyl groups and cyclodextrin water bending were deconvoluted into three peaks by Lorentzian curve-fitting. The ratio of the areas of the carbonyl bands (Table 2) indicates that, although hydrogen bonding occurs with both cyclodextrins, the interactions are notably more intense with HPBCD, especially in the films, than with BCD. For BCD, the application of the freeze-drying technique considerably enhances the hydrogen bonds with Carbopol.

Conclusions

The results obtained from the analysis of Carbopol/cyclodextrin systems by DSC and FTIR techniques indicate that Carbopol interacts with both cyclodextrins in aqueous medium, especially with HPBCD, probably because it has a greater content of pendant hydroxyl groups, that are more accessible for establishing hydrogen bonds. Therefore, HPBCD/Carbopol blends can show different properties to those of each component separately. For BCD, the use of a freeze-drying procedure seems to be necessary for such interactions to be detected. The results obtained also draw attention to the importance of careful selection of the DSC experimental conditions to elucidate the interactions.

* * *

This work was supported by Xunta de Galicia (PGIDT 01PX1203014IF, PGIDT 02BTF20302PR). The authors also express their gratitude to BFGoodrich Europe for providing free samples of Carbopol®, and to Roquette-Laisa España and Janssen Pharmaceutische for the generous donation of β-cyclodextrin and hydroxypropyl-β-cyclodextrin, respectively.

References

1 T. Loftsson and M. Brewster, J. Pharm. Sci., 85 (1996) 1017.
2 D. C. Bibby, N. M. Davies and I. G. Tucker, Int. J. Pharm., 197 (2000) 1.
3 B. Pose-Vilarnovo, C. Rodríguez-Tenreiro, J. F. Rosa dos Santos, J. Vázquez Doval, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo and J. J. Torres-Labandeira, J. Cont. Rel., 94 (2004) 351.
4 H. Blanco-Fuente, B. Esteban-Fernández, J. Blanco-Méndez and F. J. Otero-Espinar, Chem. Pharm. Bull., 50 (2002) 40.
5 T. Loftsson, H. Friðriksdóttir, A. M. Sigurðardóttir and H. Ueda, Int. J. Pharm., 110 (1994) 169.
6 T. Loftsson, M. Másson and M. Brewster, J. Pharm. Sci., 93 (2004) 1091.
7 J. C. Pillai, A. Babar and F. M. Plakogiannis, Pharm. Acta. Helv., 63 (1988) 46.
8 R. Barreiro-Iglesias, C. Álvarez-Lorenzo and A. Concheiro, J. Therm. Anal. Cal., 68 (2002) 479.
9 H. A. Schneider, J. Therm. Anal. Cal., 56 (1999) 983.
10 T. Ozeki, H. Yuasa and Y. Kanaya, J. Cont. Rel., 63 (2000) 287.
11 G. Bettinetti, Cs. Novák and M. Sorrenti, J. Therm. Anal. Cal., 68 (2002) 517.
12 Cs. Novák, G. Pokol and J. Sztatisz, Anal. Chim. Acta, 282 (1993) 313.
13 L. A. Kanis, F. C. Viel, J. S. Crespo, J. R. Bertolino, A. T. N. Pires and V. Soldi, Polymer, 41 (2000) 3303.
14 V. T. Yilmaz, A. Karadag and H. İçbudak, Thermochim. Acta, 261 (1995) 107.

15 G. Granero and M. Longhi, Pharm. Dev. Technol., 73 (2002) 381.
16 J. R. Moyano, M. J. Arias, J. M. Ginés, J. L. Pérez-Martínez, P. Muñoz and F. Giordano, J. Therm. Anal. Cal., 51 (1998) 1001.
17 Cs. Novák, M. Fodor, G. Pokol, V. Izvekov, J. Sztatisz, M. J. Arias and J. M. Ginés, J. Therm. Anal. Cal., 51 (1998) 1039.
18 M. Valero, B. I. Pérez-Revuelta and L. J. Rodríguez, Int. J. Pharm., 253 (2003) 97.
19 B. Pérez-Marcos, R. Martínez-Pacheco, J. L. Gómez-Amoza, C. Souto, A. Concheiro and R. C. Rowe, Int. J. Pharm., 100 (1993) 207.
20 M. V. Risbud, A. A. Hardikar, S. V. Bhat and R. R. Bonde, J. Cont. Rel., 68 (2000) 23.

PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE HIDROGELES DE CICLODEXTRINAS CON GLICIDILÉTERES, LAS COMPOSICIONES OBTENIDAS Y SUS APLICACIONES

P 2005 00556

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
31 de Agosto de 2006 (31.08.2006)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2006/089993 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes: Sin clasificar

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2006/000096

(22) Fecha de presentación internacional:
15 de Febrero de 2006 (15.02.2006)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P 2005 00556
25 de Febrero de 2005 (25.02.2005) ES

(71) Solicitante *(para todos los Estados designados salvo US)*: **UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA** [ES/ES]; Edificio CACTUS - Campus sur, E-15782 Santiago de Compostela (ES).

(72) Inventores; e
(75) Inventores/Solicitantes *(para US solamente)*: **ALVAREZ LORENZO, Carmen** [ES/ES]; Edificio CACTUS - Campus sur, E-15782 Santiago de Compostela (ES). **RODRÍGUEZ-TENREIRO SÁNCHEZ, Carmen** [ES/ES]; Edificio CACTUS - Campus sur, E-15782 Santiago de Compostela (ES). **TORRES LABANDEIRA, Juan José** [ES/ES]; Edificio CACTUS - Campus sur, E-15782 Santiago de Compostela (ES). **CONCHEIRO NINE, Angel** [ES/ES]; Edificio CACTUS - Campus sur, E-15782 Santiago de Compostela (ES).

(81) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:
— *sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe*

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: METHOD OF OBTAINING HYDROGELS OF CYCLODEXTRINS WITH GLYCIDYL ETHERS, COMPOSITIONS THUS OBTAINED AND APPLICATIONS THEREOF

(54) Título: PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE HIDROGELES DE CICLODEXTRINAS CON GLICIDILÉTERES, LAS COMPOSICIONES OBTENIDAS Y SUS APLICACIONES

(57) Abstract: The invention relates to a method of obtaining hydrogels based on (i) cyclodextrins, (ii) cyclodextrins and cellulose ethers or (iii) cyclodextrins and guar gum or the derivatives of same, using molecules containing two or more glycidyl ether groups in the structure thereof as a cross-linking agent. The invention also relates to the compositions thus obtained, which can include active substances and pharmaceuticals and which form inclusion complexes with cyclodextrins. The invention further relates to the use of same as components of controlled-release devices, such as transdermal pharmaceutical forms, vaginal, otic, ocular, rectal, oral or buccal transmucosal forms and parenteral implants, which are designed to administer active substances or pharmaceuticals to humans, animals or plants, or as components of cosmetic formulations. In addition, the invention relates to the use of said compositions as chelating agents in the extraction of biological or toxic molecules from living organisms or contaminating substances from water.

(57) Resumen: Procedimiento de obtención de hidrogeles a base de ciclodextrinas, de ciclodextrinas y éteres de celulosa, o de ciclodextrinas y goma guar o sus derivados, utilizando como agente reticulante moléculas que contienen dos o más grupos glicidiléter en su estructura; las composiciones obtenidas capaces de incorporar fármacos y sustancias activas, que forman complejos de inclusión con ciclodextrinas; su uso como componentes de dispositivos de liberación controlada, tales como formas farmacéuticas transdérmicas, formas transmucosales bucales, orales, rectales, oculares, óticas o vaginales, e implantes parenterales, destinadas a administrar fármacos o sustancias activas a humanos, animales o plantas, o como componentes de preparados cosméticos; y el uso de las composiciones como secuestrantes, en la extracción de moléculas tóxicas o biológicas en organismos vivos o de sustancias contaminantes en aguas.

WO 2006/089993 A2

WO 2006/089993 PCT/ES2006/000096

Procedimiento de obtención de hidrogeles de ciclodextrinas con glicidiléteres, las composiciones obtenidas y sus aplicaciones.

Sector de la técnica

Procedimiento de obtención de hidrogeles constituídos por: i. ciclodextrinas o sus derivados; o ii. ciclodextrinas o sus derivados, y éteres de celulosa o sus derivados; o iii. ciclodextrinas o sus derivados, y gomas guar o sus derivados; iv. y, además, empleando como agente reticulante: moléculas que contienen en su estructura dos o más grupos glicidiléter; las composiciones obtenidas por este procedimiento; y el uso y aplicaciones de las composiciones en la preparación de formas farmacéuticas, medicamentos, productos fitosanitarios, agentes secuestrantes y produetos cosméticos.

Estado de la técnica

En las últimas décadas, junto con la contínua mejora de las formas farmacéuticas convencionales de liberación inmediata, se ha manifestado un creciente interés por el desarrollo de formulaciones más complejas capaces de prolongar el proceso de cesión del fármaco, manteniendo niveles terapéuticos durante largos periodos de tiempo (primera generación de sistemas de cesión controlada), de precisar el momento en que debe iniciarse la cesión (segunda generación de sistemas de cesión controlada) o, incluso, de proporcionar una velocidad de cesión regulada por la presencia de una determinada sustancia, cuya concentración es función del grado de afectación del órgano o el tejido (tercera generación de sistemas de cesión controlada) (Chien y Lin, *Clin. Pharmacokinet.* 41: 1267-1299, 2002). La concepción actual de forma farmacéutica segura y eficaz también incluye, en ciertas circunstancias, la necesidad de que libere el fármaco en el tejido o en el órgano más adecuado. Acudiendo a estas aproximaciones se consigue optimizar el efecto farmacológico, reducir los efectos secundarios, simplificar los tratamientos y mejorar el cumplimiento terapéutico.

La materialización práctica de estas formas de dosificación de fármacos ha podido hacerse realidad gracias al desarrollo de nuevos materiales poliméricos, algunos de los cuales son capaces de modificar su conformación como respuesta a cambios en las características biológicas o físico-químicas del medio, por lo que se denominan materiales "inteligentes". La incorporación de estos materiales poliméricos a algunas formas de dosificación clásicas –geles, partículas, comprimidos- las dota de nuevas funcionalidades, ampliando notablemente su potencial de aplicación en el campo de la biomedicina (Yuk y Bae, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 16: 385-423, 1999).

La elevada afinidad por el agua y la versatilidad de los procedimientos de obtención que conducen a la formación de la estructura tridimensional que caracteriza a los hidrogeles reticulados por procedimientos físicos o químicos, los hacen muy útiles para diseñar formulaciones con propiedades mecánicas y de cesión de fármaco adecuadas a los requerimientos de la práctica totalidad de las vías de administración. El enorme potencial de los hidrogeles en el campo de la tecnología farmacéutica se pone de manifiesto por sus numerosas aplicaciones en el tratamiento de patologías oculares y en la administración de fármacos por vía oral, transdérmica, ocular, nasal, rectal o vaginal, tanto en medicina humana como veterinaria (Peppas et al., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50: 27-46, 2000; Rathbone et al., *Controlled Release Veterinary Drug Delivery*, Elsevier, Amsterdam, 2000). Los hidrogeles encuentran también interesantes aplicaciones como componentes de sistemas de liberación de sustancias activas y de nutrientes para plantas (Osada y Kajiwara, *Gels Handbook*, vol. 3, Chapter 5, Academic Press, San Diego, 2001, pp. 259-285), como sistemas trampa para captar sustancias tóxicas o moléculas biológicas en organismos vivos (Sellergren et al., *Chem. Mater.* 10: 4037-4046, 1998) y como secuestrantes de sustancias contaminantes en el tratamiento de aguas (Sanbe et al., *Analyt. Sci.* 19: 715-719, 2003).

Las propiedades de los co-monómeros y de los polímeros utilizados en la síntesis de los hidrogeles, junto con su proporción relativa y el grado de reticulación, son factores determinantes de las propiedades del sistema resultante. Por lo tanto, para cada aplicación concreta, se deben delimitar cuidadosamente estas variables críticas (Eichembaum et al., *Macromolecules* 32: 4867-4878, 1999).

Una aproximación muy interesante para promover la incorporación del fármaco y modular su cesión, consiste en optimizar la afinidad de alguno de los componentes del entramado polimérico por el fármaco. De esta manera, se consigue que el sistema incorpore la dosis necesaria y que la cesión se controle por los cambios en la afinidad del fármaco por los grupos químicos que están implicados en su incorporación al hidrogel. Los cambios se inducen por las alteraciones en las características fisicoquímicas del medio o por la unión competitiva de una sustancia fisiológica. Estas aproximaciones constituyen un recurso muy útil para conseguir que la liberación se produzca en lugares específicos o para regular la velocidad de cesión por mecanismos de retroalimentación. Recientemente, se ha descrito un sistema de estas características basado en hidrogeles de N-isopropilacrilamida (Alvarez-Lorenzo y Concheiro, *J. Controlled Rel.* 80: 247–257, 2002).

La utilidad terapéutica de los polímeros "inteligentes" se puede ver considerablemente incrementada si se promueve la creación, en su estructura interna, de receptores que reconozcan moléculas específicas (Alvarez-Lorenzo et al., *Macromolecules* 33: 8693-8697, 2000; Alvarez-Lorenzo y Concheiro, *op. cited* 2002). La dificultad que encierra la preparación de polímeros que presenten una buena capacidad de reconocimiento molecular en medio acuoso supone un serio inconveniente para aplicar esta aproximación en el campo de la biomedicina, dado que en un entorno acuoso las interacciones de tipo electrostático o por puentes de hidrógeno son menos intensas y las interacciones de carácter hidrofóbico menos selectivas que en un medio orgánico. Para paliar estas limitaciones, se han desarrollado procedimientos dirigidos a incorporar ciclodextrinas a la estructura de los hidrogeles, bien por simple mezcla física o formando parte de derivados monoméricos covalentemente unidos (Asanuma et al., *Adv. Mater.* 12: 1019-1030, 2000).

Las ciclodextrinas son oligómeros cíclicos, de forma toroidal, constituidos por unidades de glucopiranosa, que presentan carácter hidrofóbico en su parte interior e hidrofílico en su superficie externa. Para denotar el número de unidades α-D-glucosa que contiene una ciclodextrina se utilizan letras griegas; por ejemplo, α– (6 unidades), β– (7 unidades) ó γ–ciclodextrina (8 unidades). Este sistema de notación se utiliza también para designar a otras ciclodextrinas compuestas por más de ocho unidades de α–1,4-glucopiranosa, conocidas como grandes ciclodextrinas. Las ciclodextrinas naturales presentan un número variable de grupos hidroxilo a través de los cuales se pueden incorporar diferentes grupos funcionales para dar lugar a una gran variedad de derivados (Dûchene y Wouessidjewe, *Pharm. Technol.* 14: 22-30, 1990). Estos nuevos grupos proporcionan, a su vez, lugares de unión característicos y modifican sus propiedades fisico-químicas, dotándolas de funcionalidades específicas. Para preparar derivados sustituidos de ciclodextrinas se pueden utilizar moléculas con grupos epóxido, como por ejemplo el 1,4-butanodioldiglicidileter para ontener trihidroxi-dioxadodecil-beta-ciclodextrina u óxido de propileno para obtener hidroxipropil-beta-ciclodextrina (Patentes US 4,596,795 y US 4,727,064; Pitha y Pitha, *J. Pharm. Sci.* 74: 987-990, 1985).

Una de las propiedades más interesantes y con mayor trascendencia práctica de las ciclodextrinas es su capacidad para formar complejos de inclusión con una amplia variedad de moléculas. Para que puedan formarse estos complejos, las moléculas además de ser menos polares que el agua, deben ser capaces de introducirse parcial o totalmente en la cavidad de la ciclodextrina (Uekama, *Chem. Pharm. Bull.* 52: 900-915, 2004). El

estado energético de las moléculas de agua ubicadas en el interior de la cavidad es desfavorable, como consecuencia de las repulsiones que se establecen entre sus grupos polares y los grupos apolares de la ciclodextrina. La sustitución de las moléculas de agua por moléculas, o por partes de moléculas, de otras sustancias menos polares conduce a la formación de un complejo de inclusión (Szejtli, Cyclodextrin inclusion complexes. En *Cyclodextrin Technology* (Szejtli, Ed.) Kluwer Academic Publishers, Budapest, 1988, p. 85). Como consecuencia de la variedad de los diámetros de sus cavidades, las ciclodextrinas pueden formar complejos de inclusión con una amplia gama de moléculas con tamaños muy diversos (Fundueanu et al., *J. Chromatogr. B* 791: 407-419, 2003). La formación de los complejos es un proceso dinámico en el que no se originan enlaces permanentes (covalentes o iónicos) entre el huesped y el hospedador, y en el que sólo intervienen fuerzas de interacción de carácter hidrofóbico o tipo van der Waals. Tanto la formación como la disociación de los complejos transcurre con una gran rapidez. Como consecuencia de ello, aunque habitualmente se representen como una única especie, son sistemas dinámicos en los que la ciclodextrina y el principio activo libre coexisten en disolución con el propio complejo (Uekama, *opus cited* 2004). La formación de los complejos se puede poner de manifiesto por diferentes técnicas instrumentales, relativamente sencillas, como la espectrofotometría ultravioleta-visible (Fundueanu et al., *J. Chromatogr. B* 791: 407-419, 2003), la espectroscopía Raman (Iliescu et al., *Eur. J. Pharm. Sci.* 22: 487-495, 2004), de rayos X y de resonancia magnética nuclear (RMN), o técnicas calorimétricas.

El tamaño y la forma de la molécula huesped son determinantes para que llegue a formarse un complejo con una determinada ciclodextrina. La adecuación de las dimensiones de la molécula huésped a las de la cavidad de la ciclodextrina condiciona el valor de la constante de formación del complejo, indicando los valores elevados de esta constante que la interacción entre las dos especies es intensa (Perlovich et al., *Eur. J. Pharm. Sci.* 20: 197-200, 2003). La relación estequiométrica fármaco:ciclodextrina 1:1 es la más frecuente, aunque también se han descrito complejos con relaciones 1:2, 1:3, 2:3 ó incluso 3:2 (Endo et al., *Chem. Pharm. Bull.* 45: 1856-1859, 1997). Si la molécula huésped es muy voluminosa, como ocurre por ejemplo en el caso de las hormonas esteroídicas, las vitaminas liposolubles o los glucósidos cardiotónicos, la formación del complejo de inclusión puede requerir más de una molécula de ciclodextrina por cada molécula de fármaco. La polaridad de la molécula huesped también afecta al proceso de complejación, condicionando su afinidad por la cavidad y la orientación dentro de ella. En

general, la disposición que adopta el fármaco es la que proporciona el máximo contacto posible entre su parte hidrofóbica y la superficie interior de la cavidad. Para dimensiones moleculares similares, la afinidad por la cavidad es mayor cuanto más hidrofóbico es el fármaco (Saenger, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 92: 343-361, 1980).

Las modificaciones en las propiedades fisicoquímicas de los fármacos (solubilidad, estabilidad y volatilidad) que se derivan de su incorporación a los complejos de inclusión con ciclodextrinas, sirven de base para numerosas aplicaciones farmacéuticas (Nakai et al. *Chem. Pharm. Bull.* 31:3745-3747, 1983; Loftsson y Brewster, *J. Pharm. Sci.* 85:1017-1025, 1996; Loftsson et al. *Am. J. Drug Del.* 2: 261-275, 2004). Las ciclodextrinas también se usan como portadores funcionales de fármacos para controlar su velocidad de cesión a partir de distintas formas farmacéuticas (Uekama, *op. cited* 2004). Las variedades más hidrofílicas son adecuadas para acelerar la velocidad de cesión de fármacos liposolubles a partir de formas sólidas y mejorar su biodisponibilidad. Por esta razón, resultan muy útiles como excipientes de formas de liberación inmediata.

Un procedimiento para obtener formas sólidas con ciclodextrinas para liberación acelerada de principios activos, se describe en la patente Nº de solicitud europea 00916925.1 (Patente ES 2187457 de Berndl et al.). Las ciclodextrinas hidrofóbicas pueden servir como portadores de fármacos hidrosolubles, por ejemplo péptidos y proteinas, en formas de cesión prolongada. Ciertas ciclodextrinas entéricas, como la O-carboximetil-O-etil-β-ciclodextrina, resultan útiles para elaborar sistemas de cesión retardada. La combinación de diferentes ciclodextrinas y/o aditivos farmacéuticos permite conseguir formulaciones que combinan una adecuada biodisponibilidad oral con unos efectos terapéuticos prolongados (Bibby et al., *Int. J. Pharm.* 197: 1-11, 2000).

La incorporación de ciclodextrinas a sistemas que contienen elevadas proporciones de polímeros (matrices poliméricas), en las que las cadenas están libres (entrelazadas físicamente o no reticuladas) o covalentemente unidas (químicamente reticuladas) permite modificar el mecanismo de liberación del fármaco. Cuando las ciclodextrinas se adicionan como componentes libres, se consigue modificar la solubilidad y la difusividad del fármaco, facilitar la hidratación de la matríz y promover la erosión (Bibby et al., *Int. J. Pharm.* 197: 1-11, 2000; Pose-Vilarnovo et al. *J. Controlled Rel.*, 94, 351-363, 2004). La interacción de la ciclodextrina con el polímero que forma la matriz, puede alterar de manera importante su capacidad para formar complejos de inclusión con fármacos. En general, la presencia en el medio de polímeros hidrofílicos en bajas proporciones facilita el proceso (Loftsson et al., *Int. J. Pharm.* 110: 169-177, 1995). La solubilidad del complejo y

su capacidad para difundir hacia el exterior de la matríz son factores determinantes de la velocidad de cesión de los fármacos en este tipo de sistemas. Las propias ciclodextrinas pueden comportarse como agentes reticulantes, actuando como huéspedes de porciones de las cadenas de ciertos polímeros anfifílicos, por ejemplo polímeros tribloque del tipo A-B-A donde A es poli (óxido de etileno) y B es poli (3-hidroxibutirato), tal como se describe en la patente WO2004009664 de Xu y Xiping.

Para fijar las ciclodextrinas, como componentes químicamente unidos, a los hidrogeles se pueden utilizar derivados monoméricos (vinílicos, acrílicos, metacrílicos) de ciclodextrina durante la etapa de síntesis (Lee et al., *J. Appl. Polym. Sci.* 80: 438-446, 2001). Los materiales obtenidos por estos procedimientos encuentran numerosas aplicaciones en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica (Friedman, *Biotechnol. Food Ingredients,* 327-347, 1991). La capacidad de las unidades de ciclodextrina para formar complejos de inclusión no se ve afectada por su fijación en los hidrogeles, siempre que sus cavidades no resulten obstruidas. Al estar inmovilizadas las ciclodextrinas en el interior de la matriz polimérica, la velocidad de cesión del fármaco huésped depende de su afinidad por la cavidad y también del coeficiente de difusión del fármaco libre a través de la matríz (Liu et al., *Macromol. Biosci.* 4: 729-736, 2004).

Las ciclodextrinas también se pueden unir covalentemente a una estructura polimérica formada previamente o dar lugar, por sí mismas, a sistemas reticulados. Se han descrito procedimientos para polimerizar o reticular las ciclodextrinas, en presencia o en ausencia de polímeros diversos, utilizando epiclorohidrina (Fundueanu et al., *J. Chromatogr. B* 791: 407-419, 2003) o derivados de isocianatos (Hishiya et al., *Macromolecules* 32: 2265-2269, 1999) como agentes reticulantes.

Las matrices poliméricas que incorporan ciclodextrinas, covalentemente unidas entre sí o a las cadenas de los componentes poliméricos, presentan un gran interés potencial como base para la creación de materiales poliméricos con capacidad de reconocimiento de moléculas específicas, aplicando técnicas de impresión molecular designadas por la expresión inglesa "molecular imprinting" (Asanuma et al., *Anal. Chim. Acta* 435: 25-33, 2001; Alvarez-Lorenzo y Concheiro, *J. Chromatogr. B* 804: 231–245, 2004). Los materiales resultantes, conocidos como materiales con impresión molecular o "imprinted", presentan una distribución espacial adecuada para que cada unidad de ciclodextrina pueda interaccionar específicamente con una parte de la molécula de fármaco, haciendo posible la formación de receptores capaces de reconocerlo con un alto grado de selectividad. Utilizando este procedimiento se han podido sintetizar entramados

poliméricos con una afinidad por fármacos peptídicos y antibióticos de estructura compleja muy superior a la de los geles convencionales (Asanuma et al., *Anal. Chim. Acta* 435: 25-33, 2001).

Los éteres de celulosa constituyen un grupo de polímeros solubles en agua y/o en disolventes orgánicos con muy diversas aplicaciones en la industria farmacéutica (Doelker, Water swollen cellulose derivatives in pharmacy. En Hydrogels in Medicine and Pharmacy, Vol. 2 (Peppas, ed.), CRC Boca Raton, Florida, 1987, pp. 115-160; Doelker, *Adv. Polym. Sci.* 107: 200-265, 1993). Estructuralmente, son modificaciones alquílicas de la celulosa, que resultan de sustituir parte de los átomos de hidrógeno de los grupos hidroxilo de las unidades de glucosa anhidra por grupos alquílicos. Cada derivado se caracteriza por su grado de sustitución (DS), y su sustitución molar (SM). El DS indica el número medio de grupos hidroxilo sustituidos en la unidad de glucosa anhidra. Si los sustituyentes son grupos hidroxialquilo que a su vez sufren reacciones de sustitución, se pueden formar cadenas laterales. El valor de SM informa del número medio de moléculas de reactivo alquilante que han reaccionado con cada unidad de anhidroglucopiranosa. La relación SM/DS aporta una medida de la longitud de las cadenas laterales. La naturaleza, el número y la distribución de los sustituyentes condiciona, en gran medida, la solubilidad y la capacidad viscosizante de los éteres de celulosa. La introducción de un grupo sustituyente polar (carboxilo o hidroxilo) en la glucopiranosa aumenta su solubilidad en agua, que disminuye, por el contrario, cuando predominan los grupos éter hidrofóbicos.

En el mercado se encuentran disponibles numerosas variedades de éteres de celulosa. Estas variedades presentan diferentes DS, pesos moleculares y viscosidades nominales y distintas propiedades físicas. Ciertos éteres de celulosa, como la metilcelulosa, la hidroxipropilcelulosa, la hidroxipropilmetilcelulosa o la carboximetilcelulosa, se comercializan con una pureza adecuada para usos farmacéuticos y están reconocidos como productos generalmente seguros ("generally recognized as safe", GRAS) por la Food and Drug Administration (FDA) (Savage, Ethers. En *Cellulose and Cellulose Derivatives* (Bikales y Segal, Eds.) Wiley-Interscience, Londres, 1971, pp. 785-809). La United States Pharmacopeia 27/ National Formulary 22 (2004) y la Real Farmacopea Española 2ª edición (2002) contienen monografías dedicadas a estos productos. Estos éteres de celulosa se usan para preparar una gran variedad de formas de dosificación, como suspensiones, emulsiones, geles, pellets o comprimidos (Alderman, *Int. J. Pharm. Tech. & Prod. Mfr.* 5: 1-9, 1984; Vázquez et al., *Drug Dev. Ind. Pharm.* 18: 1355-1375, 1992).

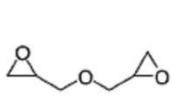
Las gomas guar se extraen del endosperma de las semillas de ciertas plantas de la familia de las leguminosas, como la *Cyamopsis tetragonolobus*. Son galactomananos resultantes del encadenamiento lineal de unidades de β-D-manosa unidas en (1-4), con ramificaciones constituidas por una sola α-D galactosa unida en α (1-6). Las gomas guar se dispersan fácilmente en agua, fría o caliente. Junto con las distintas variedades de goma guar, están disponibles en el mercado derivados como la hidroxipropilgoma guar o la carboximetil hidroxipropil goma guar, que se obtienen por procesos de semisíntesis química o por depolimerización (Freeland et al., *Cosmet. Toilet.* 99: 83-87, 1984).

La reticulación química de los éteres de celulosa o de las gomas guar permite obtener hidrogeles que cuentan con aplicaciones muy diversas. El grado de hinchamiento de algunos de estos hidrogeles puede experimentar cambios muy bruscos en función de la composición o de la temperatura del medio, lo que los dota de un considerable interés para desarrollar sistemas sensibles a estímulos o capaces de liberar sustancias activas en lugares específicos (Anbergen y Oppermann, *Polymer* 31: 1854-1858, 1990; Rodríguez et al., *J. Controlled Rel.* 86: 253-265, 2003).

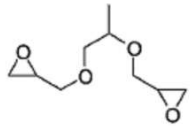
Se han propuesto diversos agentes reticulantes para preparar hidrogeles a partir de polisacáridos: el trimetafosfato trisódico se ha utilizado para preparar hidrogeles de almidón o goma guar (Gliko-Kabir et al., *J. Controlled Rel.* 63: 129-134, 2000); el borax permite obtener, en medio básico, hidrogeles de goma guar o de hidroxipropilcelulosa (Shao et al., *Macromolecules* 33: 19-25, 2000); y la divinilsulfona se ha utilizado para reticular éteres de celulosa catiónicos (Sjöstrom y Piculell, *Langmuir* 14: 3836-3843, 2001). Para caracterizar el proceso de reticulación se utiliza el parámetro "tiempo de gelificación", que se define como el tiempo necesario para que el valor del módulo de almacenamiento supere al valor del módulo de pérdida. El tiempo necesario para completar el proceso de reticulación se estima como aquel a partir del cual los valores de los módulos de almacenamiento y de pérdida se mantienen constantes. Recientemente, se ha puesto a punto por técnicas reométricas un procedimiento de reticulación de éteres de celulosa catiónicos y de gomas guar catiónicamente modificadas utilizando etilenglicoldiglicidileter. Los hidrogeles preparados por este último procedimiento se han mostrado muy útiles para incorporar y ceder de manera controlada antiinflamatorios no esteroídicos (Rodríguez et al., *op. cited* 2003).

Con respecto a otros agentes reticulantes como el borax o la divinilsulfona, los glicidiléteres cuentan con la ventaja de que presentan una toxicidad muy baja. Sus amplios márgenes de seguridad, junto con la ausencia de efectos a nivel repoductivo y endocrino y

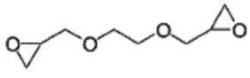
de efectos carcinogénicos, los hacen adecuados como componentes de envases que se mantiene en contacto prolongado con alimentos (Poole et al., *Food Additives & Contaminants* 21: 905-919, 2004). Los agentes reticulantes con grupos glicidiléter (conocidos también por epóxidos, oxiranos u óxidos de alqueno; Allinger et al., Química Orgánica, 2ª Ed. Reverté SA, Barcelona, 1988, p. 639), permiten obtener hidrogeles de éteres de celulosa o de gomas guar sin necesidad de formar previamente derivados de estos polímeros que cuenten con grupos polimerizables ni de modificar previamente la estructura del éter de celulosa o de la goma guar (Rodríguez et al., *op. cited* 2003). A continuación, se muestran algunos ejemplos de sustancias con dos o más grupos glicidiléter en su estructura.



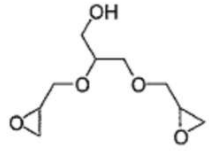
Diglicidiléter



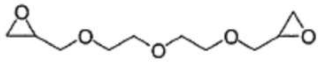
Propilenglicol diglicidiléter



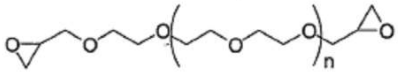
Etilenglicol diglicidiléter



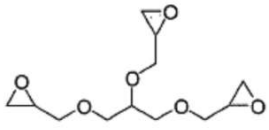
Glicerol diglicidiléter



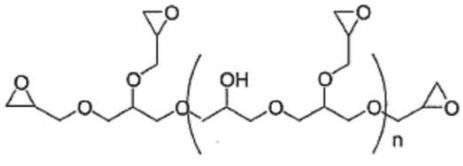
Dietilenglicol diglicidiléter



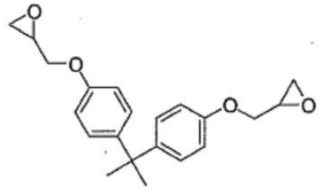
Polietilenglicol diglicidiléter



Glicerol triglicidiléter



Poliglicerol poliglicidiléter



Bisfenol A diglicidiléter

También se han descrito algunos procedimientos que utilizan epóxidos para obtener derivados poliméricos de ciclodextrinas. En la Patente US 3,420,788 se describe un procedimiento de obtención de resinas de inclusión insolubles a base de ciclodextrinas y polímeros insolubles en agua, entre los que se incluyen derivados de celulosa insolubles en agua, para ser utilizadas en forma de polvo en separaciones cromatográficas. En la Patente JP63012490B se describe un procedimiento de preparación de partículas de ciclodextrinas para relleno cromatográfico, a partir de ciclodextrinas previamente polimerizadas utilizando distintos agentes reticulantes entre ellos 1,4-butanodiol diglicidiléter, que se dispersan en un disolvente orgánico con el fin de obtener las partículas tras un segundo proceso de reticulación. En la Patente US 4,357,468 se recoge un procedimiento de unión de unidades individualizadas de ciclodextrinas a cadenas de celulosa, usando entre otros agentes diepóxidos, para obtener materiales absorbentes no reticulados, útiles como filtros de cigarrillos, en la purificación de agua o para separación molecular. En la Patente US 4,535,152 se describe un procedimiento en el que se utilizan epóxidos con grupos ionizables en su estructura, para preparar cadenas no reticuladas y solubles en agua constituidas por 2-10 unidades de ciclodextrina, que cuentan con grupos iónicos, con vistas a su utilización en la estabilización de coloides o en cromatografía de intercambio iónico. En la Patente GB 2,224,507 se recoge un procedimiento para la preparación de copolímeros de gelatina y ciclodextrina, utilizando como agente de polimerización epiclorhidrina o butileno diglicidileter. En la Patente US 6,048,736 se describe un procedimiento para unir covalentemente fármacos a unidades de ciclodextrina individualizadas o incorporadas a estructuras poliméricas. Las uniones fármaco-ciclodextrina y las uniones de las ciclodextrinas entre sí se establecen utilizando agentes reticulantes que dan lugar a enlaces biodegradables. La cesión del fármaco se produce específicamente en los lugares en los que tiene lugar la ruptura de estos enlaces. En la Patente US2001/0021703 se describe un procedimiento de reticulación de micelas de ciclodextrinas anfifílicas, formadas a partir de dímeros, trímeros y polímeros de ciclodextrinas utilizando diglicidil y triglicildéteres. La incorporación del fármaco se lleva a cabo antes de la formación de las micelas y su cesión sólo tiene lugar una vez que las uniones entre las unidades de ciclodextrinas se degradan, actuando el agente reticulando como responsable del control de la cesión. En la Patente EP 0,387,681 se describe un procedimiento de preparación de sales amónicas de policiclodextrinas, solubles en agua, para ser usadas como agentes hipocolesterolémicos. El procedimiento incluye la

reticulación de ciclodextrinas utilizando distintos agentes reticulantes y la posterior esterificación de las ciclodextrinas reticuladas para obtener la sal amónica.

Descripción de la invención

El procedimiento de obtención de hidrogeles a base de ciclodextrinas, de ciclodextrinas y éteres de celulosa, o de ciclodextrinas y gomas guar, reticulados con moléculas que contienen dos o más grupos glicidiléter, no requiere la obtención previa de un monómero o de un derivado de ciclodextrina que cuente con grupos polimerizables ni, tampoco, la modificación previa de la estructura del éter de celulosa o de la goma guar.

Para la realización del procedimiento se parte de ciclodextrinas, de ciclodextrinas y éteres de celulosa, o de ciclodextrinas y gomas guar. También se pueden utilizar derivados de ciclodextrinas, de éteres de celulosa o de gomas guar. Como agentes reticulantes se usan moléculas que cuentan con dos o más grupos glicidiléter en su estructura, por ejemplo, el diglicidileter, el etilenglicoldiglicidileter, el dietilenglicoldiglicidileter, el polietilenglicoldiglicidileter, el poliglicerolpoliglicidileter, el propilenglicoldiglicidileter, el gliceroldiglicidileter, el gliceroltriglicidileter, o bisfenol A diglicidileter, que son capaces de reaccionar simultáneamente con los grupos hidroxilo, amino o carboxilo de dos o más moléculas de ciclodextrina, o de una ciclodextrina y un éter de celulosa, o de una ciclodextrina y una goma guar. Los materiales resultantes presentan una estructura tridimensional tipo hidrogel y son capaces de incorporar, sin disolverse, elevadas proporciones de agua dando lugar a sistemas viscoelásticos.

Para el procedimiento, se utiliza cualquier ciclodextrina o cualquiera de sus derivados. Son ejemplos de ciclodextrinas las ciclodextrinas naturales, la α-, β- y γ-ciclodextrina, y otras ciclodextrinas compuestas por más de ocho unidades de α–1,4-glucopiranosa, conocidas como grandes ciclodextrinas, así como sus derivados, algunos de los cuales se recogen en la Tabla 1.

Tipo de derivado	α-Ciclodextrina	β-Ciclodextrina	γ-Ciclodextrina
Alquilado	Metil- Butil-	Metil- Etil- Butil-	Metil- Butil- Pentil-
Hidroxialquilado	2-hidroxipropil-	Hidroxietil- 2-hidroxipropil- 2-hidroxibutil-	Hidroxietil- 2-hidroxipropil-
Esterificado	Acetil- Succinil-	Acetil- Propionil- Butiril- Succinil- Benzoil-	Acetil- Succinil-

		Palmitil- Toluensulfonil-	
Esterificado y alquilado		Acetil metil- Acetil butil-	
Ramificado	Glucosil- Maltosil-	Glucosil- Maltosil-	Glucosil- Maltosil-
Iónico	Carboximetil eter- Fosfato éster-	Carboximetil eter- Carboximetil etil- Fosfato éster- 3-trimetilamoniun- 2-hidroxipropil eter- Sulfobutil éter-	Carboximetil eter- Fosfato éster-
Polimerizado	Polímeros simples Carboximetil-	Polímeros simples Carboximetil-	Polímeros simples Carboximetil-

Tabla 1.- Ejemplos de derivados de α-, β- y γ- ciclodextrina.

Por éter de celulosa se entiende cualquier éter de celulosa iónico o no iónico. Son ejemplos de éteres de celulosa: metilcelulosa (MC), hidroxietilmetilcelulosa (HEMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxietilcelulosa (HEC), etilhidroxietilcelulosa (EHEC), carboximetilcelulosa sódica (CMCNa), sales de amonio cuaternario de hidroxietilcelulosa con sustituyente trimetilamonio (Polyquaternium 10), copolímeros de hidroxietil celulosa y cloruro de dimetil dialil amonio (Polyquaternium 4). Para el procedimiento es apropiada cualquier variedad de goma guar, cualquier goma guar modificada o cualquiera de sus derivados. Son ejemplos de derivados de goma guar, sus éteres hidroxipropilados o carboxihidroxipropilados, sus derivados catiónicos (Ecopol) y los productos resultantes de la depolimerización de las gomas guar.

Para llevar a cabo el procedimiento se prepara, en primer lugar, la disolución de ciclodextrina en agua o en medio hidroalcohólico y se añade el volumen de una disolución de HCl o de otro agente acidificante, o de NaOH o de otro agente alcalinizante, que sea necesario para conseguir ajustar el pH a un valor adecuado para que transcurra el proceso de reticulación (ya sea ácido, neutro o alcalino). También se puede disolver la ciclodextrina directamente en un medio con el pH adecuado. Para preparar hidrogeles de ciclodextrinas y éteres de celulosa, o de ciclodextrinas y gomas guar, la incorporación del éter de celulosa o de la goma guar al agua o al medio hidroalcohólico, puede hacerse antes o después de disolver la ciclodextrina. En cualquiera de los dos casos, la disolución resultante se homogeneiza utilizando un agitador mecánico o magnético y, si es necesario, aplicando ultrasonidos. A continuación, se incorpora, con agitación, la cantidad adecuada de agente reticulante, en estado sólido o líquido, o en disolución.

Para obtener hidrogeles de ciclodextrinas o sus derivados, la proporcion de ciclodextrina o del derivado de ciclodextrina puede estar comprendida entre el 1 y el 95% del total de los componentes del hidrogel excluida el agua, siendo valores típicos los comprendidos entre el 4% (p/p) y el 70% (p/p), y la proporción del agente reticulante está comprendida entre el 99% y el 5%, del total de los componentes del hidrogel excluida el agua, siendo valores típicos los comprendidos entre el 96% (p/p) y el 30% (p/p).

Para obtener hidrogeles de ciclodextrinas o sus derivados y éteres de celulosas o sus derivados, la proporción de ciclodextrina o del derivado de ciclodextrina está comprendida entre el 1% y el 95% del total de los componentes del hidrogel excluida el agua, siendo valores típicos los comprendidos entre el 4% (p/p) y el 70% (p/p); la proporción de éter de celulosa o del derivado de éter de celulosa está comprendida entre el 0.05% y el 95% del total de los componentes del hidrogel excluida el agua, siendo valores típicos los comprendidos entre el 0.1 % (p/p) y el 20 % (p/p); y la proporción del agente reticulante está comprendida entre 98.95% y el 4% del total de los componentes del hidrogel excluida el agua, siendo valores típicos los comprendidos entre el 96 % (p/p) y el 30 % (p/p).

Para obtener hidrogeles de ciclodextrinas o sus derivados y gomas guar o sus derivados, la proporción de ciclodextrina o del derivado de ciclodextrina está comprendida entre el 1% y el 95% del total de los componentes del hidrogel excluida el agua, siendo valores típicos los comprendidos entre el 4 % (p/p) y el 70 % (p/p); la proporción de goma guar o del derivado de goma guar puede estar comprendida entre el 0.05% y el 95% del total de los componentes del hidrogel excluida el agua, siendo valores típicos los comprendidos entre el 0.1 % (p/p) y el 20 % (p/p); y la proporción del agente reticulante está comprendida entre 98.95% y el 4% del total de los componentes del hidrogel, excluida el agua, siendo valores típicos los comprendidos entre el 96 % (p/p) y el 30 % (p/p).

La disolución obtenida se homogeneiza, se transfiere a un molde adecuado y se deja en reposo, a temperatura controlada entre 0 y 100ºC, durante el tiempo necesario para que se complete la reticulación. Para establecer el tiempo necesario para conseguir la formación del hidrogel, se puede aplicar la reometría de cizalla oscilatoria utilizando muestras de las disoluciones de ciclodextrinas y agente reticulante, de ciclodextrinas, éteres de celulosa y agente reticulante, o de ciclodextrinas, gomas guar y agente reticulante. Esta técnica permite estimar el tiempo de gelificación y el tiempo necesario para completar el proceso de reticulación (Figura 1). El valor del parámetro tiempo de

gelificación puede estar comprendido entre 1 segundo y 12 horas, siendo valores típicos entre 10 minutos y 2 horas. El tiempo necesario para completar la reticulación puede estar comprendido entre 3 segundos y 24 horas, siendo valores típicos entre 10 minutos y 6 horas.

El hidrogel, una vez formado, se retira del molde y se sumerge, para su lavado, en un recipiente con medio acuoso o hidroalcoholico, hasta eliminar las sustancias que no hayan reaccionado. El proceso de lavado se da por finalizado cuando la absorbancia del medio de lavado es menor que 0.001 en la totalidad del intervalo de longitudes de onda comprendido entre 190 y 800 nm. Los tiempos de lavado suelen estar comprendidos entre 1 hora y 3 días.

Una vez lavados, los hidrogeles se dividen en porciones de forma y tamaño adecuados y se utilizan tal como se encuentran al extraerlos del líquido de lavado o después de someterlos a desecación. Para desecarlos se puede utilizar una estufa de vacio o con corriente de aire, a temperatura comprendida entre 30 y 80ºC. Los hidrogeles también se pueden desecar por liofilización.

A continuación, se puede incorporar el fármaco o la sustancia activa al hidrogel por inmersión directa en una disolución o en una suspensión del fármaco o de la sustancia activa, a temperatura comprendida entre 0 y 100ºC y a la presión atmosférica, con ayuda o no de ultrasonidos. La incorporación también se puede llevar a cabo en autoclave a temperatura comprendida entre 100 y 130ºC.

Las composiciones obtenidas, con o sin fármacos o sustancias activas incorporados, se pueden usar como tales o como componentes base de formas farmacéuticas, medicamentos y productos fitosanitarios para el tratamiento de estados patológicos o fisiológicos en humanos, animales y plantas, tales como formas transdérmicas, formas transmucosales, como por ejemplo, las formas de dosificación bucales, orales, rectales, oculares, nasales, óticas o vaginales, e implantes parenterales. También se pueden utilizar como agentes secuestrantes de sustancias biológicas o tóxicas en organismos vivos, por ejemplo colesterol, glucosa o ácidos biliares, o en el medio ambiente. La invención también cubre su uso en cosmética.

Ventajas y mejoras sobre procedimientos y materiales ya existentes

El procedimiento objeto de la invención conduce a la obtención de composiciones con una estructura tridimensional tipo hidrogel con una alta afinidad por el agua, pero que no se disuelven, y que están dotadas de una alta capacidad de incorporación de fármacos, sustancias activas, moléculas biológicas o tóxicos con estructuras y propiedades fisico-

químicas muy diversas, formando complejos de inclusión con las ciclodextrinas que forman parte de su estructura. La capacidad de incorporación de fármaco o de sustancia activa de las composiciones que contienen ciclodextrinas y éteres de celulosa o sus derivados, o ciclodextrinas y gomas guar o sus derivados está comprendida entre el 50 y el 5000% (p/p) de la que presentan hidrogeles obtenidos, en las mismas condiciones, con éteres de celulosa o sus derivados, o gomas guar o sus derivados, sin ciclodextrinas. Por lo tanto, en estas nuevas composiciones, la capacidad de incorporación de sustancias está fuertemente potenciada con respecto a los hidrogeles preparados exclusivamente con éteres de celulosa o sus derivados, o gomas guar o sus derivados. Ello supone una mejora muy importante para el uso de las composiciones como portadores de fármacos o de sustancias activas en humanos, animales o plantas, o como sistemas "trampa" de sustancias biológicas o tóxicas en organismos vivos o de contaminantes en aguas.

Las composiciones presentan, en el estado hidratado, propiedades viscoelásticas.

Las composiciones son también muy adecuadas para controlar la cesión de fármacos o de sustancias activas, que se incorporan por inmersión, en sus disoluciones o en sus suspensiones, del hidrogel una vez sintetizado, por difusión o formación de complejos de inclusión y/o uniones de naturaleza no covalente. Las composiciones proporcionan diferentes velocidades de cesión dependiendo de su composición cuali- y cuatitativa, y de las propiedades fisicoquímicas del fármaco, especialmente de su hidrosolubilidad y de su afinidad por la cavidad de la ciclodextrina. Para un fármaco o una sustancia activa hidrosoluble con constante de afinidad por hidroxipropil-beta-ciclodextrina igual a 115 M^{-1}, son valores típicos de porcentaje cedido 50% al cabo de 2 horas, 80% al cabo de 4 horas y 100% al cabo de 8 horas. Para un fármaco o una sustancia activa lipofílica con constante de afinidad por hidroxipropil-beta-ciclodextrina igual a 17000 M^{-1}, son valores típicos de porcentaje cedido 20% al cabo de 2 horas, 50% al cabo de 8 horas y 70% al cabo de 48 horas.

También pueden servir para dirigir fármacos hacia zonas específicas en seres vivos, mediante cambios asociados a las condiciones del entorno, en el grado de hinchamiento del hidrogel o en la afinidad del fármaco por los componentes del hidrogel. Todas estas características se pueden modular a través de una adecuada selección de la variedad y/o de la proporción de ciclodextrina/s y de los éteres de celulosa o sus derivados, o gomas guar o sus derivados que la/s acompañe/n. La baja o nula toxicidad de las ciclodextrinas, los éteres de celulosa, las gomas guar y sus derivados, y los agentes reticulantes glicidiléter hacen que las composiciones resultantes puedan ser utilizadas

como componentes de formas farmacéuticas, de preparados cosméticos o sistemas "trampa" para captar moléculas de organismos vivos o del ambiente, sin plantear problemas de biocompatibilidad o de impacto ambiental. Además, el procedimiento transcurre en condiciones que no comprometen, en general, la estabilidad de los fármacos o las sustancias activas, y no genera residuos que impliquen riesgos de contaminación ambiental.

Aplicaciones comerciales

Las composiciones pueden ser utilizadas en campos muy diversos, como el desarrollo de formas farmacéuticas y sistemas de liberación de fármacos y sustancias activas de cesión inmediata o capaces de controlar la cesión o de dirigir el fármaco hacia zonas específicas, preparados cosméticos o sistemas de liberación de sustancias activas o productos fitosanitarios, para ser utilizados en humanos, animales y plantas. También se pueden utilizar para desarrollar sistemas capaces de secuestrar, en el entorno biológico, sustancias tóxicas o moléculas producidas por organismos vivos. También pueden aplicarse en la extracción de contaminantes de aguas u otros medios líquidos.

Ejemplos de la invención

A continuación, se incluyen algunos ejemplos que muestran la obtención de hidrogeles utilizando ciclodextrinas o sus derivados, ciclodextrinas o sus derivados y éteres de celulosa o sus derivados, ciclodextrinas o sus derivados y gomas guar y sus derivados. También se incluyen ejemplos de la monitorización del proceso de formación de algunos hidrogeles mediante técnicas de reometría oscilatoria. También se incluyen ejemplos de la preparación de composiciones que incorporan fármacos y controlan su cesión. También se incluye un ejemplo en el que se prueba la formación de complejos de inclusión de un fármaco con las unidades de ciclodextrina incorporadas al hidrogel.

Ejemplo 1. Procedimiento de obtención de un hidrogel a base de γ-ciclodextrina

Se prepararó una disolución de γ-ciclodextrina, al 20% (p/p), en NaOH 0.2M. A continuación, a 5 mL de esta disolución se le adicionaron 2 mL de una disolución de etilenglicoldiglicidileter al 50% (p/p) en agua, de manera que la concentración final de agente reticulante fue del 14.28%. La mezcla se sometió a agitación durante 1 minuto para conseguir su completa homogeneización. A continuación, se transfirió a un tubo de ensayo de 0.8 cm de diámetro interno, y se dejó en reposo a 50ºC durante 12 horas, para completar la formación del hidrogel. Transcurrido este tiempo, el hidrogel se extrajo del molde y se lavó por inmersión en HCl 0.01M y agua destilada, permaneciendo en cada medio 12 horas. La proporción de γ-ciclodextrina en el hidrogel es del 58.34 % (p/p) y la

proporción del agente reticulante es del 41.66 % (p/p) del total de los componentes del hidrogel excluida el agua.

Ejemplo 2. Procedimiento de obtención de un hidrogel a base de γ-ciclodextrina e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y monitorización del proceso.

Se prepararó una disolución de γ-ciclodextrina, al 20% (p/p), en NaOH 0.2M, y se le incorporó hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) de viscosidad nominal 4000 cPs, en la cantidad necesaria para alcanzar una concentración final de éter de celulosa del 0.4% (p/p). A continuación, a 5 mL de esta disolución se le adicionaron 2 mL de una disolución de etilenglicoldiglicidileter al 50% (p/p) en agua, de manera que la concentración final de agente reticulante fue del 14.28%. La mezcla se sometió a agitación durante 1 minuto para conseguir su completa homogeneización. Inmediatamente, una muestra de la mezcla se transfirió al plato Peltier de un reómetro de torsión de esfuerzo controlado y se ensayó a 50ºC en modo oscilatorio, aplicando una fuerza de cizalla de 0.1Pa a una frecuencia de 0.1 rad/s, para registrar la evolución en el tiempo de los módulos de almacenamiento y de pérdida (Figura 2). El tiempo de gelificación fue de, aproximadamente, 15 minutos y el tiempo necesario para completar el proceso de reticulación fue de aproximadamente 45 minutos. El resto de la mezcla se transfirió a un tubo de ensayo de 0.8 cm de diámetro interno y se dejó en reposo a 50ºC durante 12 horas. Transcurrido este tiempo, el hidrogel se extrajo del molde y se lavó por inmersión en HCl 0.01M y agua destilada, permaneciendo en cada medio 12 horas. La proporción de γ-ciclodextrina en el hidrogel es del 57.67% (p/p), la proporción de HPMC es del 1.15 % (p/p) y la proporción del agente reticulante es del 41.66 % (p/p) del total de los componentes del hidrogel excluida el agua.

Ejemplo 3. Procedimiento de obtención de un hidrogel a base de hidroxipropil-β-ciclodextrina y carboximetilcelulosa sódica (CMCNa), y monitorización del proceso.

Se prepararon disoluciones de hidroxipropil-β-ciclodextrina, al 20% (p/p), en NaOH 0.2M o en KOH 0.2M. A alícuotas de 5 mL de estas disoluciones se le incorporó carboximetilcelulosa sódica de viscosidad nominal 400-800 cps, en las cantidades necesarias para alcanzar una concentración final del éter de celulosa del 0.4% (p/p) ó del 0.8% (p/p). A continuación, se adicionaron a cada disolución 2 mL de una disolución de etilenglicoldiglicidileter al 50% (p/p) en agua (concentración final 14.28%). Las mezclas se sometieron a agitación durante 1 minuto para conseguir su completa homogeneización. Inmediatamente, se tomaron muestras de cada mezcla, se transfirieron al plato Peltier de un reómetro de torsión de esfuerzo controlado y se ensayaron a 50ºC en modo oscilatorio, aplicando una fuerza de cizalla de 0.1Pa a una frecuencia de 1 rad/s, para registrar la

evolución en el tiempo de los módulos de almacenamiento y de pérdida (Figura 3). El tiempo de gelificación fue, en todos los casos, inferior a 1 hora y el tiempo necesario para completar el proceso de reticulación fue de 6 horas cuando se utilizó NaOH y de 12 horas cuando se utilizó KOH como agente alcalinizante.

Las porciones restantes de las mezclas se transfirieron a tubos de ensayo de 0.8 cm de diámetro interno y se dejaron en reposo a 50ºC durante 12 horas. Transcurrido este tiempo, los hidrogeles se extrajeron de los moldes y se lavaron por inmersión en HCl 0.01M y agua destilada, permaneciendo en cada medio 12 horas. La proporción de hidroxipropil-β-ciclodextrina en estos hidrogeles está comprendida entre el 57.0% y el 57.7% (p/p), la proporción de carboximetilcelulosa sódica está comprendida entre el 1.15 % y el 2.29 % (p/p) y la proporción del agente reticulante está comprendida entre el 41.18 % y el 40.71% (p/p) del total de los componentes del hidrogel excluida el agua.

Un incremento en la concentración de carboximetilcelulosa sódica o la utilización de NaOH, en lugar de KOH como agente alcalinizante, permitió incrementar los valores de ambos módulos, reduciendo el tiempo de gelificación y dando lugar a hidrogeles más viscoelásticos.

Ejemplo 4. Procedimiento de obtención de un hidrogel a base de metil-β-ciclodextrina cristalina e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), y monitorización del proceso.

Se prepararó una disolución de metil-β-ciclodextrina (CRISMEB), al 15% (p/p), en HCl 0.1M, y se le incorporó hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) de viscosidad nominal 4000 cPs, en la cantidad necesaria para alcanzar una concentración final de éter de celulosa del 0.4% (p/p). A continuación, a 10 mL de esta disolución se le adicionaron 2 mL de una disolución de etilenglicoldiglicidileter al 50% (p/p) en agua, de manera que la concentración final de agente reticulante fue del 14.28%. La mezcla se sometió a agitación durante 1 minuto para conseguir su completa homogeneización. Inmediatamente, se transfirió una muestra de la mezcla al plato Peltier de un reómetro de torsión de esfuerzo controlado y se ensayó a 50ºC en modo oscilatorio, aplicando una fuerza de cizalla de 0.1Pa a una frecuencia de 0.1 rad/s, para registrar la evolución en el tiempo de los módulos de almacenamiento y de pérdida (Figura 4). El tiempo de gelificación fue de, aproximadamente, 20 minutos y el tiempo necesario para completar el proceso de reticulación fue de, aproximadamente, 45 minutos. El resto de la mezcla se transfirió a un tubo de ensayo de 0.8 cm de diámetro interno y se dejó en reposo a 50ºC durante 12 horas. Transcurrido este tiempo, el hidrogel se extrajo del molde y se lavó por inmersión en

NaOH 0.01M y agua destilada, permaneciendo en cada medio 12 horas. La proporción de metil-β-ciclodextrina en el hidrogel es del 50.54% (p/p), la proporción de HPMC es del 1.35 % (p/p) y la proporción del agente reticulante es del 48.11% (p/p) del total de los componentes del hidrogel excluida el agua.

Ejemplo 5. Procedimiento de obtención de un hidrogel a base de hidroxipropil-β-ciclodextrina y goma guar catiónicamente modificada, y monitorización del proceso. Se prepararon disoluciones de hidroxipropil-β-ciclodextrina, al 20% (p/p), en NaOH 0.2M o en KOH 0.2M. A alícuotas de 5 mL de estas disoluciones se le incorporó goma guar catiónicamente modificada (Ecopol E-261-S) de peso molecular 200000 Da, en las cantidades necesarias para alcanzar una concentración final de goma guar del 0.4% (p/p) o del 0.8% (p/p). A continuación, se adicionaron a cada mezcla 2 mL de una disolución de etilenglicoldiglicidileter al 50% (p/p) en agua, de manera que la concentración final de agente reticulante fue, en todos los casos, del 14.28%. Las mezclas se sometieron a agitación magnética durante 1 minuto para conseguir su completa homogeneización. Inmediatamente, se tomaron muestras de cada mezcla, se transfirieron al plato Peltier de un reómetro de torsión de esfuerzo controlado y se ensayaron a 50ºC en modo oscilatorio, aplicando una fuerza de cizalla de 0.1Pa a una frecuencia de 1 rad/s, para registrar la evolución en el tiempo de los módulos de almacenamiento y de pérdida (Figura 5). El tiempo de gelificación fue, en todos los casos, inferior a 1 hora y el tiempo necesario para completar el proceso de reticulación fue de 6 horas.

Las porciones restantes de las mezclas se transfirieron a tubos de ensayo de 0.8 cm de diámetro interno y se dejaron en reposo a 50ºC durante 12 horas. Transcurrido este tiempo, los hidrogeles se extrajeron de los moldes y se lavaron por inmersión en HCl 0.01M y agua destilada, permaneciendo en cada medio 12 horas. La proporción de hidroxipropil-β-ciclodextrina en estos hidrogeles está comprendida entre el 57.0% y el 57.7% (p/p), la proporción de goma guar catiónicamente modificada está comprendida entre el 1.15 % y el 2.29 % (p/p) y la proporción del agente reticulante está comprendida entre el 41.18 % y el 40.71% (p/p) del total de los componentes del hidrogel excluida el agua. Un incremento en la concentración de goma guar catiónicamente modificada permitió incrementar los valores de ambos módulos, reduciendo el tiempo de gelificación y dando lugar a hidrogeles más viscoelásticos.

Ejemplo 6. Procedimiento de obtención de una composición a base de hidroxipropil-β-ciclodextrina y de una composición a base de hidroxipropil-β-ciclodextrina e

hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), que incorporan diclofenaco sódico y lo ceden de manera controlada.

Se preparó una disolución de hidroxipropil-β-ciclodextrina, al 20% (p/p), en NaOH 0.2M. A alícuotas de 5 mL de esta disolución se le adicionaron cantidades de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) de viscosidad nominal 4000 cPs, necesarias para alcanzar concentraciones de éter de celulosa comprendidas entre el 0.2% (p/p) y el 1.0% (p/p). A cada una de las disoluciones resultantes se le adicionaron 2 mL de una disolución de etilenglicoldiglicidileter en agua al 50% (p/p), de manera que la concentración final de agente reticulante fue en todos los casos 14.28%. Las mezclas se homogeneizaron utilizando un agitador magnético, se transfirieron a tubos de ensayo de 0.8 cm de diámetro interno, y se dejaron en reposo a 50ºC durante 12 horas, para completar la formación del hidrogel. Transcurrido este tiempo, los hidrogeles se extrajeron de los moldes y se sumergieron en agua destilada. Al cabo de 12 horas, se transfirieron a recipientes con HCl 0.01M, donde se mantuvieron durante otras 12 horas. Por último, se sumergieron 12 horas más en agua destilada. Cada hidrogel se dividió en porciones, con forma de disco, de 8 mm de diámetro y 5 mm de espesor. Tres discos de hidrogel se colocaron directamente en viales con 10 mL de disolución de diclofenaco al 0.1% (p/p) o al 0.5% (p/p) durante dos días. Otros tres discos de hidrogel se sometieron a desecación en estufa a 40ºC antes de introducirlos en los viales con la disolución de diclofenaco.

Para determinar la cantidad de diclofenaco incorporada a cada disco de hidrogel, se midió la absorbancia del medio a 276 nm, antes y una vez completado el proceso de incorporación. En la Tabla 2, se muestran a modo de ejemplo los contenidos en diclofenaco de discos de hidrogel de diferente composición, a los que se incorporó el fármaco después de someterlos a desecación en estufa.

Disoluciones de partida		**Composición del hidrogel**			**Cantidad de diclofenaco incorporado (mg /g hidrogel seco)**	
HPβCD (%, p/p)	**HPMC (%, p/p)**	**HPβCD (%, p/p)**	**HPMC (%, p/p)**	**EGDE (%, p/p)**	**Hidrogeles sumergidos en disolución de fármaco al 0.1%**	**Hidrogeles sumergidos en disolución de fármaco al 0.5%**
20	0	58.34	0	41.66	11.08	424.13
20	0.2	58.00	0.58	41.42	10.31	285.54
20	0.4	57.67	1.15	41.18	8.95	120.96
20	0.6	57.34	1.72	40.94	14.23	132.72
20	0.8	57.01	2.28	40.71	16.97	120.85

20	1	56.69	2.83	40.48	14.94	169.51

Tabla 2. Cantidad de diclofenaco incorporada por hidrogeles de hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD) o por hidrogeles de hidroxipropil-β-ciclodextrina e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), reticulados con etilenglicoldiglicidiléter (EGDE).

Tras la incorporación del diclofenaco, los hidrogeles se desecaron en estufa de aire a 40ºC. Sus espectros Raman se registraron en un espectrofotómetro IR con transformada de Fourier. En la Figura 6 se muestran los espectros IR, en los que se observan desplazamientos de aproximadamente 2 cm^{-1} hacia valores más bajos de número de ondas y cambios en la intensidad de las bandas situadas entre 1500 y 1650 cm^{-1}, que son característicos de la formación de un complejo entre el fármaco y la ciclodextrina (Iliescu et al., *Eur. J. Pharm. Sci.* 22: 487-495, 2004). Estos hechos confirman que el fármaco está incorporado al hidrogel formando complejos de inclusión con sus unidades de ciclodextrina.

En las Figuras 7 y 8 se muestran los perfiles de cesión de diclofenaco a partir de hidrogeles preparados con hidroxipropil-β-ciclodextrina, sin hidroxipropilmetilcelulosa o con un 0.4% (p/p) de hidroxipropilmetilcelulosa, respectivamente. El ensayo se llevó a cabo utilizando 25 mL de agua sin agitación. Todas las composiciones controlaron el proceso de liberación hasta un máximo de 8 horas.

Ejemplo 7. Procedimiento de obtención de composiciones a base de hidroxipropil-β-ciclodextrina e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), que incorporan estradiol y lo ceden de manera controlada.

Se prepararon disoluciones de hidroxipropil-β-ciclodextrina, al 15%, 20% y 25% (p/p), en NaOH 0.2M. A cada una de ellas, se le incorporó la cantidad necesaria de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) de viscosidad nominal 4000 cPs, para alcanzar una concentración final de éter de celulosa del 0.4% (p/p), y el volumen de disolución de etilenglicoldiglicidileter en agua al 50% (p/p) necesario para conseguir una concentración final de agente reticulante del 14.28% (p/p). Las mezclas se homogeneizaron utilizando un agitador magnético, se transfirieron a tubos de ensayo de 0.8 cm de diámetro interno, y se dejaron en reposo a 50ºC durante 12 horas, para completar la formación del hidrogel. Transcurrido este tiempo, los hidrogeles se extrajeron de los moldes y se sumergieron en agua destilada. Al cabo de 12 horas, se transfirieron a recipientes con HCl 0.01M, donde se mantuvieron durante otras 12 horas. Por último, se sumergieron 12 horas más en agua destilada y se mantuvieron en este medio hasta el momento de la incorporación del

estradiol. Cada hidrogel se dividió en porciones, con forma de disco, de 8 mm de diámetro y 5 mm de espesor. La proporción de hidroxipropil-β-ciclodextrina en estos hidrogeles está comprendida entre el 50.54% y el 63.00% (p/p), la proporción de HPMC está comprendida entre el 1.35% y el 1.00% (p/p) y la proporción del agente reticulante está comprendida entre el 48.11% y el 35.99% (p/p) del total de los componentes del hidrogel excluida el agua.

El estradiol se incorporó a cada una de estas porciones sumergiéndolas, en recipientes adecuados, en 10 mL de una suspensión de fármaco al 0.2% (p/p). Los recipientes se cerraron y se llevaron a un autoclave donde se sometieron a un ciclo de calentamiento (121ºC, 16 minutos), manteniéndolos, a continuación, durante siete días en una cámara termostatizada a 25ºC. La cantidad de estradiol incorporada se determinó sumergiendo los hidrogeles en 15 mL de una disolución acuosa de dodecilsulfato sódico al 0.3% (p/p), durante 14 días, y valorando por espectrofotometría directa la cantidad de fármaco cedida al medio, que resultó estar comprendida entre 550 y 700 microgramos de estradiol por disco de hidrogel.

Los hidrogeles con el estradiol incorporado se sumergieron en 15 mL de una disolución acuosa de dodecilsulfato sódico al 0.3% (p/p) y se valoró, por espectrofotometría ultravioleta a 280 nm, la cantidad de fármaco cedida a distintos tiempos (Figura 9). Los perfiles de cesión obtenidos muestran que las composiciones controlan el proceso de cesión durante más de una semana.

Relación de Figuras

Figura 1. Evolución en el tiempo de los valores de módulo de almacenamiento (●) y pérdida (○) durante la reticulación de hidroxipropil-β-ciclodextrina (20%, p/p) e hidroxipropilmetilcelulosa (0.4% p/p) con etilenglicoldiglicidileter (14.28%, p/p) a 50ºC.

Figura 2. Evolución en el tiempo de los valores de módulo almacenamiento (●) y pérdida (○) durante la reticulación de γ-ciclodextrina (20%, p/p) e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) (0.4%, p/p) en NaOH 0.2 M con etilenglicoldiglicidileter (14.28%, p/p) a 50ºC.

Figura 3. Evolución en el tiempo de los valores de módulo almacenamiento (●, ▲) y pérdida (○, Δ) durante la reticulación de hidroxipropil-beta-ciclodextrina (20%, p/p) con carboximetilcelulosa (0.4%, p/p) y etilenglicoldiglicidileter (14.28%, p/p) en NaOH 0.2M (●, ○) o en KOH 0.2M (▲,Δ) a 50ºC.

Figura 4. Evolución en el tiempo de los valores de módulo almacenamiento (●) y pérdida (○) durante la reticulación de metil-β-ciclodextrina (20%, p/p) e

hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) (0.4%, p/p) en HCl 0.1M con etilenglicoldiglicidileter (14.28%, p/p) a 50ºC.

Figura 5. Evolución en el tiempo de los valores de módulo almacenamiento (●, ▲) y pérdida (○, Δ) durante la reticulación de hidroxipropil-beta-ciclodextrina (20%, p/p) y goma guar catiónicamente modificada (0.4%, p/p) en NaOH 0.2 M (●, ○) o al 0.8% (p/p) en KOH 0.2M (▲,Δ) con etilenglicoldiglicidileter (14:28%, p/p) a 50ºC.

Figura 6. Espectros FT-Raman en la región 1550-1630 cm^{-1} de (a) diclofenaco, (b) hidrogel desecado de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) (0.4%, p/p) e hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HPβCD) (20%, p/p) con diclofenaco incorporado por inmersión en disolución de fármaco al 0.5% (p/p), (c) hidrogel desecado de HPβCD (20%, p/p) con diclofenaco incorporado por inmersión en disolución de fármaco al 0.5% (p/p), (d) hidrogel desecado de HPMC (0.4%, p/p) y HPβCD, (e) hidrogel desecado de HPβCD (20% (p/p), (f) HPMC, (g) HPβCD.

Figura 7. Perfiles de cesión de diclofenaco a partir de las composiciones a base de hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HPβCD) (20%, p/p) a las que se les incorporó el fármaco por inmersión en una disolución de diclofenaco sódico al 0.1% (p/p) (Tabla 2). Las composiciones se introdujeron en el medio de cesión directamente (●) o después de desecarlas en estufa a 40ºC (○). Los ensayos se llevaron a cabo en 25 mL de agua, sin agitación.

Figura 8. Perfiles de cesión de diclofenaco sódico a partir de las composiciones a base de hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HPβCD) (20%, p/p) e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) (0.4%, p/p), a las que se les incorporó el fármaco por inmersión en una disolución de diclofenaco sódico al 0.1% (p/p) (Tabla 2). Las composiciones se introdujeron en el medio de cesión directamente (●) o después de desecarlas en estufa a 40ºC (○). Los ensayos se llevaron a cabo en 25 mL de agua, sin agitación.

Figura 9. Perfiles de cesión de estradiol a partir de las composiciones a base de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) al 0.4% (p/p) e hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HPβCD) al 15% (p/p) (●), al 20% (p/p) (○) y al 25% (p/p) (■), con etilenglicoldiglicidileter (14.28% p/p), a las que se les incorporó el fármaco por inmersión en una supensión de estradiol, autoclavado a 121ºC durante 16 minutos y almacenamiento, durante siete días, en una cámara termostatizada a 25ºC. Los ensayos se llevaron a cabo en 15 mL de disolución acuosa de dodecilsulfato sódico al 0.3% (p/p), sin agitación.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de hidrogeles caracterizado por que los hidrogeles están constituídos por:

i. ciclodextrinas o sus derivados; o

ii. ciclodextrinas o sus derivados, y éteres de celulosa o sus derivados; o

iii. ciclodextrinas o sus derivados, y gomas guar o sus derivados;

iv. y, además, empleando como agente reticulante: moléculas que contienen en su estructura dos o más grupos glicidiléter.

2. Procedimiento de obtención de hidrogeles, según la reivindicación 1, caracterizado porque en el caso i) comprende las siguientes etapas: a) disolución de la ciclodextrina o de un derivado de ciclodextrina en agua o medio hidroalcohólico; b) ajuste del pH de la disolución; c) incorporación del agente reticulante y homogeneización de la mezcla; d) transferencia a un molde; e) mantenimiento en cámara termostatizada a temperatura comprendida entre 0 y 100ºC; f) extracción del molde; g) lavado del hidrogel; h) división en porciones de forma y tamaño adecuados.

3. Procedimiento de obtención de hidrogeles, según la reivindicación 1 y 2, caracterizado porque en el caso ii) comprende las siguientes etapas: a) disolución de la ciclodextrina o de un derivado de ciclodextrina, y del éter de celulosa o de un derivado del éter de celulosa en agua o medio hidroalcohólico; y a continuación las etapas b) a h) de la reivindicación 2.

4. Procedimiento de obtención de hidrogeles, según la reivindicación 1 y 2, caracterizado porque en el caso iii) comprende las siguientes etapas: a) disolución de la ciclodextrina o de un derivado de ciclodextrina, y de la goma guar o de un derivado de goma guar en agua o medio hidroalcohólico; y a continuación las etapas b) a h) de la reivindicación 2.

5. Procedimiento de obtención de hidrogeles, según las reivindicaciones 1, 2, 3 y 4, caracterizado porque en las etapas a) y b) el medio de reacción es agua o medio hidroalcohólico y presenta un pH ácido, neutro o alcalino.

6. Procedimiento de obtención de hidrogeles, según las reivindicaciones 1, 2, 3, 4 y 5, que incluye una etapa de secado de los hidrogeles en estufa de vacio o con corriente de aire, o por liofilización, entre las etapas g) y h) o después de la h).

7. Procedimiento de obtención de hidrogeles, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las ciclodextrinas o sus derivados son las α-, β- y γ- ciclodextrinas, las ciclodextrinas compuestas por más de ocho unidades de α–1,4-glucopiranosa, y los

derivados metil-, etil-, butil-, hidroxietil-, 2-hidroxipropil-, 2-hidroxibutil-, acetil-, propionil-, butiril-, succinil-, benzoil-, palmitil-, toluensulfonil-, acetilmetil-, acetil butil-, glucosil-, maltosil-, carboximetil eter-, carboximetil etil-, fosfato éster-, 3-trimetilamoniun-, sulfobutil éter- ciclodextrina, y los polímeros de ciclodextrina.

8. Procedimiento de obtención de hidrogeles, según las reivindicaciones 1 y 3, caracterizado porque los éteres de celulosa o sus derivados son éteres iónicos o no iónicos, tales como metilcelulosa (MC), hidroxietilmetilcelulosa (HEMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxietilcelulosa (HEC), etilhidroxietilcelulosa (EHEC), carboximetilcelulosa sódica (CMCNa), las sales de amonio cuaternario de hidroxietilcelulosa con sustituyente trimetilamonio y los copolímeros de hidroxietil celulosa y cloruro de dimetil dialilamonio.

9. Procedimiento de obtención de hidrogeles, según las reivindicaciones 1 y 4, caracterizado porque las gomas guar o sus derivados son cualquier goma guar, cualquier goma guar modificada o cualquier derivado de goma guar, como cualquier éter hidroxipropilado o carboxihidroxipropilado, cualquier derivado catiónico o cualquier producto resultante de su depolimerización.

10. Procedimiento de obtención de hidrogeles, según las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el agente reticulante es una sustancia que contiene en su estructura dos o más grupos glicidiléter; entendiéndose por glicidiléter: oxirano, epóxido, u óxido de alqueno; tales como: diglicidiléter, etilenglicoldiglicidileter, dietilenglicoldiglicidileter, propilenglicoldiglicidiléter, polietilenglicolpoliglicidileter, gliceroldiglicidiléter, gliceroltriglicidileter, poliglicerolpoliglicidileter y bisfenol A diglicidileter.

11. Procedimiento de obtención de hidrogeles, según las reivindicaciones 1, 2, 7 y 10, caracterizado porque la proporción de ciclodextrina o del derivado de ciclodextrina está comprendida entre el 1 y el 95% del total de los componentes del hidrogel, y la proporción del agente reticulante está comprendida entre el 99% y el 5%.

12. Procedimiento de obtención de hidrogeles, según las reivindicaciones 1, 3, 8 y 10, caracterizado porque la proporción de ciclodextrina o del derivado de ciclodextrina está comprendida entre el 1% y el 95%; la proporción de éter de celulosa o del derivado de éter de celulosa está comprendida entre el 0.05% y el 95%; y la proporción del agente reticulante está comprendida entre 98.95% y el 4% del total de los componentes del hidrogel.

13. Procedimiento de obtención de hidrogeles, según las reivindicaciones 1, 4, 9 y 10, caracterizado porque la proporción de ciclodextrina o del derivado de ciclodextrina

está comprendida entre el 1% y el 95%: la proporción de goma guar o del derivado de goma guar está comprendida entre el 0.05% y el 95%; y la proporción del agente reticulante está comprendida entre 98.95% y el 4% del total de los componentes del hidrogel.

14. Procedimiento de obtención de hidrogeles, según las reivindicaciones anteriores, que incluye una etapa de incorporación de fármaco o de sustancia activa por inmersión del hidrogel, húmedo o previamente desecado, en una disolución o en una suspensión del fármaco o de la sustancia activa, a temperatura comprendida entre 0 y 100ºC y a la presión atmosférica, con ayuda o no de ultrasonidos. La incorporación también se puede llevar a cabo en autoclave a temperatura comprendida entre 100 y 130ºC

15. Composiciones obtenidas según las reivindicaciones anteriores.

16. Composiciones, según las reivindicaciones anteriores, que incorporan a los hidrogeles, fármacos, sustancias activas o nutrientes para su liberación controlada.

17. Composiciones, según las reivindicaciones anteriores, caracterizadas porque, en organismos vivos o en el medioambiente, capturan sustancias biológicas o tóxicas actúando como agentes secuestrantes.

18. Uso de las composiciones, según las reivindicaciones anteriores, para la elaboración de un medicamento o un producto fitosanitario para el tratamiento de estados patológicos o fisiológicos en humanos, animales y plantas.

19.- Uso de las composiciones, según la reivindicación 18, para la elaboración de un medicamento para administrar por vía transdérmica, transmucosal, bucal, oral, rectal, ocular, nasal, ótica o vaginal, o como implante parenteral.

20.- Uso de las composiciones, según las reivindicaciones 1 a 16, para la preparación de cosméticos.

21. Uso de las composiciones, según la reivindicación 17, para la elaboración de un agente secuestrante de sustancias biológicas o tóxicas para actuar en organismos vivos o en el medioambiente.

Figura 1

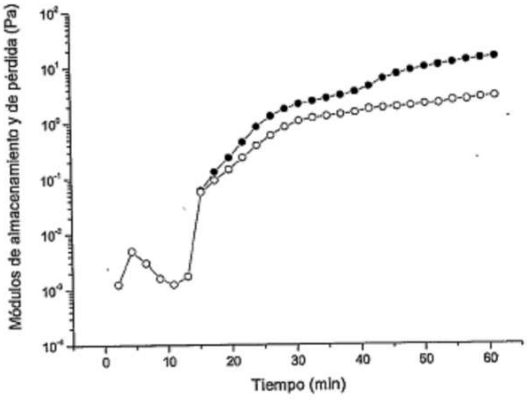


Figura 2

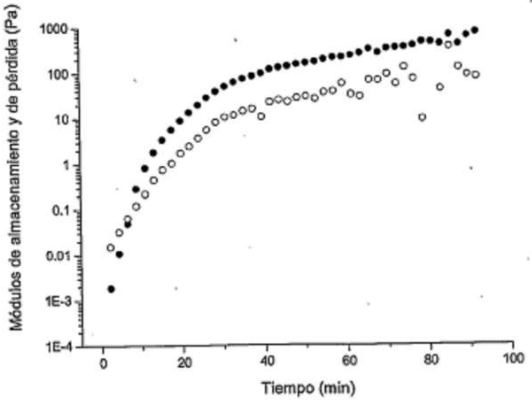


Figura 3

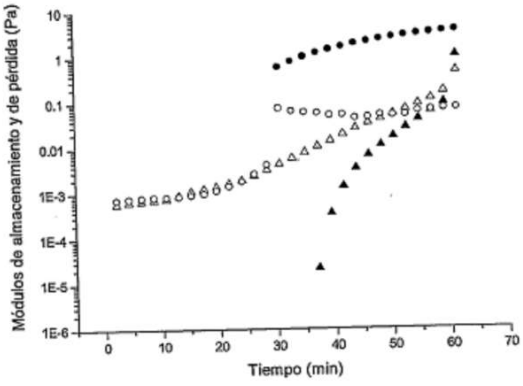


Figura 4

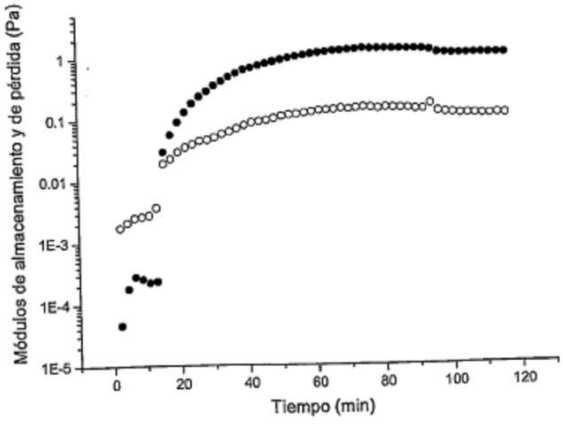


Figura 5

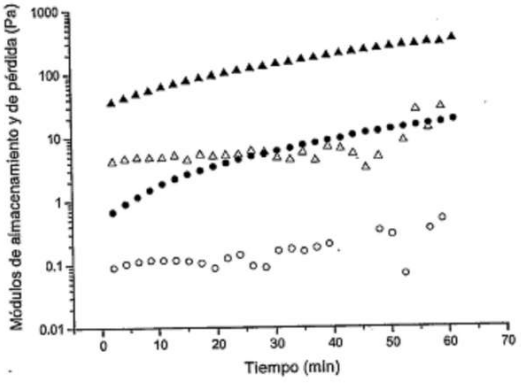


Figura 6

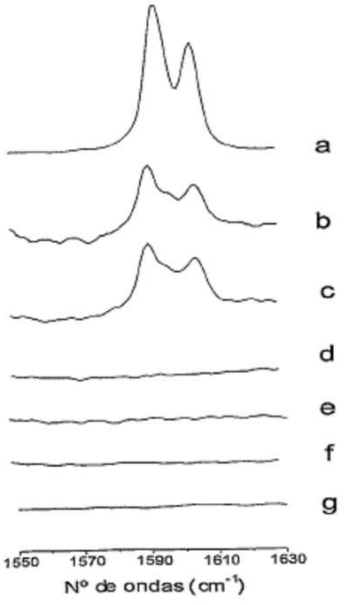


Figura 7

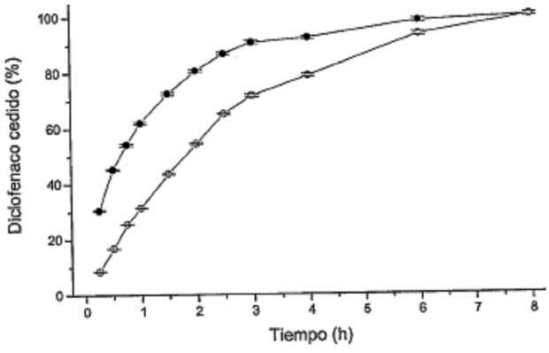


Figura 8

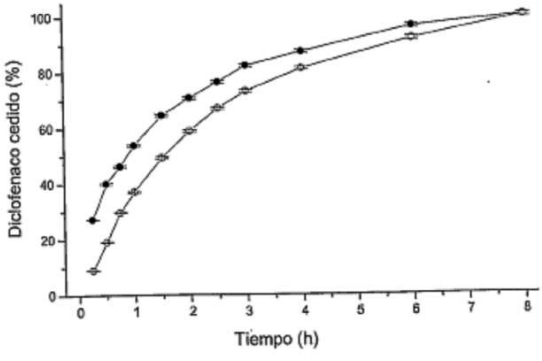
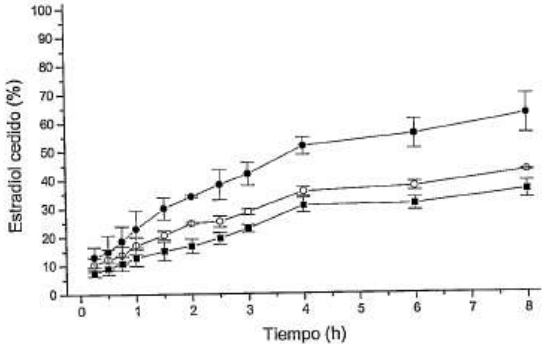


Figura 9


Estradiol cedido (%)
Tiempo (h)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
0
1
2
3
4
5
6
7
8

NEW CYCLODEXTRIN HYDROGELS CROSS-LINKED WITH DIGLYCIDYLETHERS WITH A HIGH DRUG LOADING AND CONTROLLED RELEASE ABILITY

Pharmaceutical Research 23 (1) (2006)121-130

Pharmaceutical Research, Vol. 23, No. 1, January 2006 (© 2006)
DOI: 10.1007/s11095-005-8924-y

Research Paper

New Cyclodextrin Hydrogels Cross-Linked with Diglycidylethers with a High Drug Loading and Controlled Release Ability*

Carmen Rodriguez-Tenreiro,[1] Carmen Alvarez-Lorenzo,[1] Ana Rodriguez-Perez,[1] Angel Concheiro,[1] and Juan J. Torres-Labandeira[1,2]

Received July 11, 2005; accepted October 3, 2005

Purpose. The goal of the study is to develop new hydrogels based on cyclodextrins cross-linked with ethyleneglycol diglycidylether (EGDE) under mild conditions, to be used as carriers of amphiphilic drugs. Also, it aims to characterize the cross-linking and the drug loading and release processes.
Methods. The cross-linking of hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPβCD) with EGDE, in the absence or presence of hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) Methocel® K4M, was optimized applying oscillatory rheometry and Fourier transform infrared. Hydrogels were characterized regarding swelling in water, ability to load diclofenac, and release after different drying treatments.
Results. Solutions of HPβCD (14.28%), without or with HPMC (0.2–1.0%), provided firm and transparent hydrogels after cross-linking with EGDE (14.28%), in which around two thirds of the OH groups were cross-linked. The incorporation of HPMC progressively reduced the gel time and the swelling degree of hydrogels. HPβCD hydrogels efficiently loaded diclofenac and sustained the release for several hours. The presence of HPMC slowed the release from swollen hydrogels, but promoted it from hydrogels dried before the loading and also before the release.
Conclusions. HPβCD hydrogels with good mechanical properties and tunable loading and release ability can be obtained by direct cross-linking with EGDE.

KEY WORDS: amphiphilic drugs; cross-linking; ethyleneglycol diglycidylether (EGDE); hydrogels; hydroxypropylmethylcellulose (HPMC); hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPβCD); rheology.

INTRODUCTION

Hydrogels are particularly suitable materials for developing efficient and safe new drug delivery systems for both conventional and new biotechnological drugs, mostly because of (1) their high content in water, which allows a fast diffusion of small molecules, (2) the easiness with which it is possible to combine enough mechanical strength to resist handling and physiological stress, with a flexibility that prevents mechanical damage to the tissues, and (3) the versatility of the techniques used for preparing them (1,2). Nevertheless, hydrogels have two important limitations: their exiguous capacity to load poorly water-soluble drugs, which have low affinity for hydrophilic networks, and their poor ability to sustain, once activated, the release of hydrophilic drugs, which diffuse through the hydrogel as freely as in pure water (3). Some of the most recent approaches to solve these drawbacks involve the inclusion of the drug in vesicles such as micelles or liposomes (4–6) or the application of molecular imprinting technology (7–9). In addition, the incorporation of cyclodextrins by different means to the polymer network also seems very promising. Cyclodextrins can be found in hydrated polymer-based matrices as free molecules that can delay drug release; the great hydrodynamic size of the drug–cyclodextrin complexes makes the diffusion through the network difficult (10,11). Additionally, if the mesh of the network is small and only the free drug molecules can diffuse out, the affinity of the drug for the cyclodextrin may regulate the release rate. The presence of a hydrophilic polymer can enhance this affinity, whereas the competition of the components of the environment can prompt dissociation and release (12,13). On the other hand, cyclodextrins can act themselves as cross-linking agents by complexation of hydrophobic chains of amphiphilic polymers, which leads to the formation of supramolecular hydrogels (14,15).

Cyclodextrins can also form hydrogels through covalent bonds among themselves and/or with other compounds. These chemically cross-linked materials make the formulation of hydrophobic drugs in hydrophilic media possible, combining the versatility of the hydrogels and the complexation capability of cyclodextrins (16–20). This type of hydrogel has been shown useful in developing drug delivery systems to administer the drug by different routes, e.g., oral, buccal, or transdermal, minimizing adverse side effects and improving the pharmacological effects (21). Compared to other approaches that require the use of organic solvents and

*The work described in this paper is the subject of patent applications filed by the University of Santiago de Compostela.

[1] Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain.
[2] To whom correspondence should be addressed. (e-mail: ffjuant@usc.es)

0724-8741/06/0100-0121/0 © 2006 Springer Science + Business Media, Inc.

sophisticated carriers, the preparation of cyclodextrin hydrogels involves simpler technological processes, which are foreseeable to be easy to scale-up, and more biocompatible and stable materials (20,21).

To chemically attach the cyclodextrins, vinyl or acrylic monomers of cyclodextrins able to copolymerize with other monomers can be used (18,21–24). In this way, hydrogels of *N*-isopropylacrylamide and a maleic derivative of β-cyclodextrin (βCD) with an enhanced loading of a hydrophobic drug, chlorambucil, have been prepared. These hydrogels showed a pH-dependent release rate, which is given by the maleic groups of the βCD monomer (17). Cyclodextrin hydrogels can be also obtained by using cross-linking agents able to react with their hydroxyl groups (20,24,25). Unmodified βCD and poly(vinyl alcohol) were cross-linked with epichlorohydrin to obtain hydrogels able to load and sustain the release of salicylic acid (25). Interpenetrated networks of poly-βCD (produced by reaction with epichlorohydrin) and cross-linked *N*-isopropylacrylamide have shown a more sustained release of ibuprofen than hydrogels that only contain *N*-isopropylacrylamide (24). The affinity of the cyclodextrin for the drugs is not expected to be decreased when incorporated to the hydrogel. In fact, linear cyclodextrin polymers obtained by polycondensation with epichlorohydrin do not only maintain but also notably increase the affinity of the cyclodextrin for the guest molecules, making it possible to significantly improve the solubilizing effect of cyclodextrins in cosmetic and pharmaceutical formulations (26).

This work is focused on the development of new biocompatible cyclodextrin-based hydrogels, made with cyclodextrins alone or combining them with cellulosic derivatives, to be used as the main components of drug delivery systems and biomedical devices. This paper reports on a new cyclodextrin cross-linking procedure, carried out in water, under mild conditions, and uses ethyleneglycol diglycidylether (EGDE) as cross-linker, which has two epoxy groups in its structure, both of similar reactivity and able to react simultaneously with the hydroxyl groups of cyclodextrins. EGDE has been shown to be an adequate cross-linker of polysaccharides and of DNA (27–29), and its low toxicity makes its use in the preparation of protective coatings inside food and drink cans common (30,31). This cross-linking method does not require any modification in the cyclodextrin structure, thereby avoiding the use of acrylic or vinyl monomers in the preparation in which the number and the position of the polymerizable groups are hardly foreseeable (32). Compared to the already developed hydrogels based on cyclodextrin monomers, this new approach allows a step to obtain the hydrogel in a fast and predictable way. The unreacted substances, if any, are nontoxic, and therefore, although washing is recommended before use, it may not be mandatory. The cross-linking can be rheologically monitored to optimize the conditions to prepare the hydrogels. Several hydrogels were prepared with hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPβCD) or with HPβCD and hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), and the influence of HPMC proportion on the physical properties of the hydrogels and on their capacity to load diclofenac and to control its release was evaluated. Diclofenac is a suitable candidate for formulation in sustained delivery systems for different routes (33,34). It contains two strong hydrophobic rings and a hydrophilic carboxylic acid group (35; Fig. 1), which provides it with an amphiphilic character that makes it challenging to achieve a thermodynamic stabilization of its hydrophobic groups in water and, at the same time, to avoid a burst release once administered. The inclusion of the hydrophobic rings of diclofenac in the HPβCD is thermodynamically favorable and can be enhanced in the presence of HPMC (11). Therefore, it is expected that the hydrogels can load this drug significantly and sustain its release efficiently.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Hydroxypropyl-β-cyclodextrin (D.S. 4.6) was a gift from Janssen Pharmaceutische (Geel, Belgium); HPMC Methocel® K4M (batch MM87050902K) was provided by Dow Stade GmbH (Stade, Germany); ethyleneglycol diglycidylether (EGDE) (50% w/w in water) was from Fluka Chemie GmbH (Deisenhofen, Germany); diclofenac sodium was from Analema (Vigo, Spain). Water purified by reverse osmosis (MilliQ®, Millipore, Madrid, Spain) with a resistivity above 18.2 MΩ cm^{-1} was used.

Rheological Characterization of the Cross-Linking Process

A 20% w/w HPβCD solution in 0.2 M NaOH (code #20-0) was prepared under stirring. Different amounts of HPMC were added to 5-ml portions of this solution to have final HPMC concentrations of 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, and 1.0% w/w. The resulting systems thereafter were denoted by codes #20-

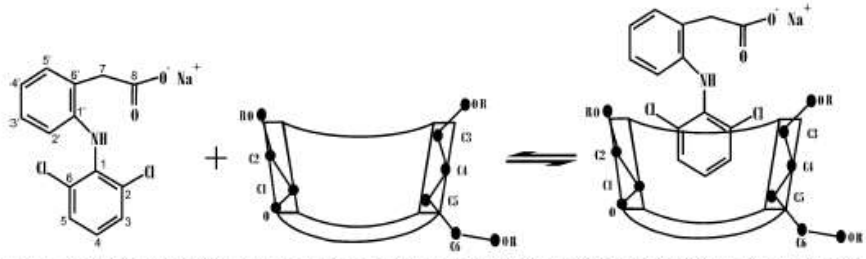


Fig. 1. Structure of diclofenac sodium, a cross-section of hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPβCD), and a schematic drawing of the 1:1 inclusion complex (R: –H; $–CH_2–CHOH–CH_3$).

0.2, #20-0.4, #20-0.6, #20-0.8, and #20-1, respectively. A control solution was prepared without HPβCD having a 1.0% w/w HPMC (code #0-1). Once homogenized, EGDE (2 ml of the 50% w/w in water solution) was added to each dispersion and stirred for 2 min at 20°C. Immediately, portions of the dispersions were transferred to the Peltier plate of a Rheolyst AR-1000N rheometer (TA Instruments, Newcastle, UK) equipped with an AR2500 data analyzer and a cone plate (2°, 6-cm diameter) measuring geometry. Liquid paraffin was put around the gap of the sample to prevent solvent evaporation. The rheological behavior of the dispersions was evaluated at 50°C in duplicate. The evolution in time of the storage and loss moduli (G' and G'', respectively) and of tan δ ($=G''/G'$) was recorded for an angular frequency of 0.1 rad/s by measuring these parameters for the first 120–600 min of the gelation process. The gelation time (t_{gel}) was estimated as the time at which G' and G'' crossover (tan δ = 1) (29).

Synthesis of HPβCD and HPβCD-*co*-HPMC Hydrogels

Solutions of HPβCD, HPβCD–HPMC, and HPMC prepared as for the rheological analysis were transferred to test tubes (8.6-mm internal diameter), hermetically closed, and kept at 50°C for 12 h to obtain the HPβCD, HPβCD-*co*-HPMC, and HPMC hydrogels, respectively. After cooling down, the hydrogels were carefully removed from the glass and were immersed in ultrapure water for 12 h to swell. The hydrogels were then transferred to 10 mM HCl solution for 12 h to neutralize the alkaline medium and were finally immersed in water for 1 week. Cylindrical pieces of each gel (4- to 5-mm thickness) were cut and maintained in water.

Characterization of Hydrogels

Infrared and Raman Spectroscopy

Samples of hydrogels were oven-dried at 40°C until they reached constant weight and were powdered in a mortar. Infrared (IR) spectra were recorded over the range 400–4000 cm^{-1} in a Bruker IFS 66V Fourier transform (FT)–IR spectrophotometer (Bruker, Ettlinger, Germany) using the potassium bromide pellet technique. Raman spectra were recorded at room temperature with a FT-Raman Bruker spectrometer (Bruker) equipped with a FRA 106 Raman module. Radiation of 1064 nm from a Nd:YAG laser was used for excitation. The acquired spectra were the result of 150 scans, and the spectral resolution was 1 cm^{-1}.

Swelling Studies

The amount of water absorbed by the hydrogels was estimated by the difference between the weight of the fully swollen hydrogel (W), after careful wiping of the surface with a soft tissue, and the weight of the hydrogel after being dried (W_0) at 40°C until equilibrium, and referred to the weight of the dried hydrogel:

$$Q = (W - W_0)/W_0 \quad (1)$$

To study the swelling process, dry samples of hydrogels (about 30 mg, 5-mm diameter and 1.5-mm thickness) were immersed in 10 ml of water and were weighed at preestablished time intervals. The kinetics of water uptake was characterized by fitting the data obtained up to 60% of the content in water to the following empirical equation (36):

$$W_t/W_\infty = K_w t^{0.5} \quad (2)$$

where W_t is the amount of water absorbed at time W_∞ is the amount of water absorbed at equilibrium, and K_w is a rate constant.

Diclofenac Loading by the Hydrogels

Cylindrical pieces of the hydrogels (8.6-mm diameter × 4- to 5-mm thickness) were placed, directly or after oven-drying at 40°C, in aqueous solutions of diclofenac sodium (10 ml of 0.1 or 0.5 wt.%) for 1 week at room temperature. Diclofenac remaining in the loading solution was determined spectrophotometrically (λ = 276.5 nm), and the amount loaded was estimated by subtracting it from the initial content.

Characterization of Diclofenac-Loaded Hydrogels

Diclofenac–Cyclodextrin Interactions

Raman spectra of dried loaded hydrogels were recorded as described above. Lorentzian deconvolution (Origin 7.0, OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) was used to separate the unresolved bands in the 1500- to 1650-cm^{-1} region into the three characteristic peaks of diclofenac (1579, 1582, and 1603 cm^{-1}). These peaks are related to its carboxylic group and the dichlorophenyl and phenyl acetate rings and can be altered by inclusion complex formation (37). Diclofenac–HPβCD and diclofenac–HPβCD–HPMC inclusion complexes were used as references. To prepare these inclusion complexes, equimolar amounts of drug and cyclodextrin were dissolved in water. To a portion of this solution, HPMC was added to obtain a final concentration of 0.4% (w/v). The systems were left to stand for 24 h at 4°C and were then freeze-dried in a Labconco Lyph-lock 6 apparatus (Kansas City, MO, USA) (−34°C, 48 h) after being frozen by immersion in liquid nitrogen. Loaded hydrogels were oven-dried at 40°C or were freeze-dried under the same conditions as the complexes before the Raman analysis. Spectra of the drug as supplied and after dissolution in water and oven-drying or freeze-drying were also recorded and used as controls.

Diclofenac Release

Loaded hydrogels (about 30-mg dried weight) were rinsed with water and immersed, directly or after a drying step in an oven at 40°C, in 25-ml water at room temperature, under sink conditions (drug solubility about 9 mg/ml) (35). The amount of diclofenac sodium released was measured spectrophotometrically (λ = 276.5 nm) in periodically taken samples and again was placed in the same vessel so that the liquid volume was kept constant. The experiments were carried out in triplicate.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of the Cross-Linking Process

The cross-linking of HPβCD with EGDE was carried out in NaOH 0.2 M. The OH^- ions catalyze the ring opening of the oxacyclopropane of the EGDE to react with hydroxyl groups, such as those of the cyclodextrin glucopyranoses (38). Heating is required for the reaction to proceed; whereas at room temperature, no cross-linking is observed, at 50°C, the reaction rate is fast enough to finish the cross-linking process in a few hours. Because at this temperature both the cyclodextrins and the cellulose ethers remain stable, these conditions were chosen to carry out the process (29).

Firstly, several HPβCD and EGDE concentrations were assayed to elucidate those at which hydrogels can be formed. Once EGDE was added to the HPβCD solutions, a sample of each resultant solution was immediately transferred to the Peltier plate of the rheometer and the rest of the solution to a test tube of 8.6-mm internal diameter. The tubes were kept at 50°C, and the rheological analyses were carried out at the same temperature. We observed, both visually and rheologically, that under the chosen reaction conditions, minimum concentrations of 10% w/w of HPβCD and of 14.28% w/w of EGDE are required in the final solution to obtain hydrogels. Therefore, as a basis to prepare the hydrogels, 5 ml of 20% HPβCD solutions was mixed with 2 ml of EGDE commercial solution (50% w/w in water) to have a final concentration of 14.28% of HPβCD and 14.28% of EGDE. This EGDE concentration is enough to react with 1.64 mol/l of hydroxyl groups. Taking into account that the concentration of HPβCD is 0.11 mol/l and that each molecule of this cyclodextrin possesses 21 hydroxyl groups, the EGDE added can react with 71% of the total hydroxyl groups of HPβCD. In the truncated cone structure of cyclodextrins, the OH-2 and OH-3 groups are located on the wider side of the torus, whereas the OH-6 is positioned on the narrower side and is directed away from the cavity (39). The reactivity of these OH groups is as follows: OH-6 > OH-2 > OH-3 (40). The OH-6 is more basic than the secondary OH groups, and therefore, it can react easily in strong alkaline solutions. By contrast, the reactivity of OH-2 is favored in weak alkaline solutions. The limited reactivity of the OH-3 groups is attributed to the steric hindrance and to hydrogen bonding between this hydroxyl and the ring oxygen of an adjacent glucopyranose (41). Therefore, in the HPβCD solution used to prepare the gels, there are 1.54 mol/l of the most reactive OH-6 and OH-2 groups. The mean degree of substitution of the HPβCD was of 4.6 hydroxypropyl groups per molecule of cyclodextrin. The OH groups of the hydroxypropyl substituents are as reactive as the OH-6 and can also participate in the cross-linking process. Consequently, a decrease in the number of reactive OH groups is not expected because of the substitution process. In summary, the amount of EGDE incorporated as a cross-linker is enough to react with at least two thirds of the OH groups of HPβCD and to obtain consistent hydrogels.

In a second step, hydrogels were prepared from solutions containing HPMC, HPβCD, and EGDE to evaluate the effects of the cellulose ether. HPMC, a linear polymer constituted by glycopyranose units similar to those of HPβCD, should participate in the cross-linking process to form HPβCD-*co*-HPMC hydrogels. HPMC, with a content in methoxyl groups of 22.4% and in hydroxypropoxyl groups of 8.3% (total degree of substitution of 1.65) (42) and a mean molecular weight of 84,200 Da, was used, and its influence on the kinetics of the cross-linking reaction was evaluated. As in the case of HPβCD, the reactivity of the OH groups of the HPMC ranks in the following order: OH-6 > OH-2 > OH-3.

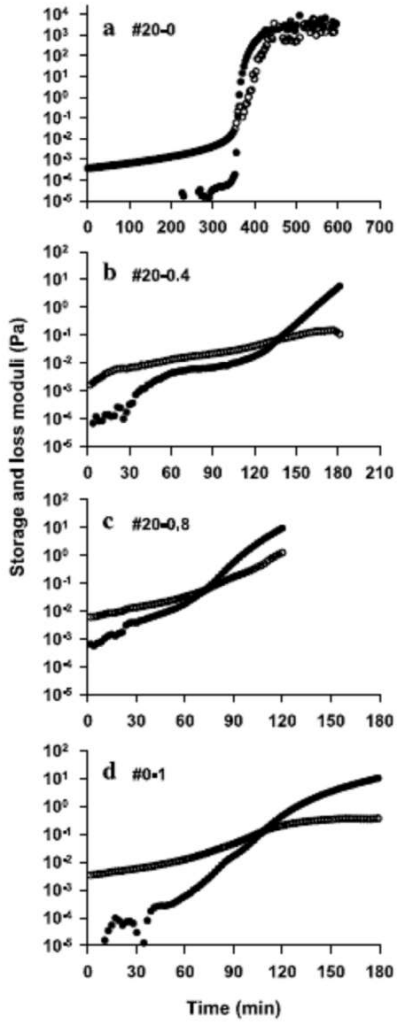


Fig. 2. Time dependence of the storage (G', •) and loss (G'', ○) moduli for systems prepared from 20% HPβCD solutions without hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) (#20-0), from 20% HPβCD solutions containing 0.4% (#20-0.4) or 0.8% (#20-0.8) HPMC, and from 1.0% HPMC solutions without HPβCD (#0-1). In all cases, the final ethyleneglycol diglycidylether (EGDE) proportion in the solutions was 14.28%.

Then, in a 1.0% aqueous dispersion of this HPMC, around 0.1 mol/l of OH groups is available for cross-linking.

HPMC concentration range was chosen to be above the critical overlap concentration ($c^* = 1/[\eta]$) but below its entanglement concentration ($c_{ent} = 10/[\eta]$). In this way, intra- and intermolecular junctions of the cellulose ether themselves are minimized (29,43), and, consequently, the likelihood of having an even distribution of HPβCD and HPMC in the hydrogel is increased. The intrinsic viscosity of HPMC in water is 7.31 dl/g at 298 K, and its critical overlap concentration is 0.137% (44). The lowest HPMC concentration evaluated (0.2% in the HPβCD solution, equivalent to 0.143% in the final mixture with EGDE) was just above this value. The greatest HPMC concentration (1.0% in the HPβCD solution or 0.714% in the final mixture) was well below the entanglement concentration (1.37%). Even at this HPMC concentration, the low viscosity of the solutions makes them easy to handle. As can be seen in Fig. 2, at time zero (i.e., when the cross-linking has not occurred yet), the G'' values of HPβCD–HPMC solutions were only one order-of-magnitude greater (10^{-2} Pa) than those of HPβCD solutions without HPMC (10^{-3} Pa), which clearly indicates that the contribution of HPMC itself to the consistency of the non-cross-linked systems is of little relevance compared with that caused by the cross-linking process (five to six orders of magnitude). In fact, in the absence of EGDE, all HPβCD and HPβCD–HPMC solutions showed a rheological behavior typical of diluted polymer dispersions, with low G'' and negligible G' values.

The angular frequency (0.1 rad/s) at which the studies were carried out allowed the monitoring of the cross-linking process because all dispersions show before reaction with EGDE a mainly viscous behavior. Under this condition, a number of G' and G'' data points were recorded without distorting the forming network. The time-sweep experiments at this angular frequency showed that, when EGDE was absent, G' and G'' values remained practically constant in time. The addition of EGDE caused at 50°C a relatively fast increase in both moduli; G' was initially lower than G'', but it increased faster, being greater than G'' after a time, and finally reaching a plateau region (Fig. 2). The gel time, i.e., the time at which the crossover of G' and G'' occurs ($\tan \delta = 1$) (28), decreased as follows: #20-0 (360 min) > #20-0.2 (240 min) > #20-0.4 (138 min) > #0-1 (109 min) > #20-0.6 (80 min) > #20-0.8 (72 min) > #20-1 (15 min). Therefore, in the presence of HPMC, the gelation process was faster and the final values of G' and G'' were greater. This can be explained by the greater content in reactive hydroxyl groups and also because the long HPMC chains favor the cross-linking process in the growing network.

In summary, HPβCD and HPβCD-*co*-HPMC hydrogels can be prepared under mild conditions by this one-step procedure. The rheological results indicate that, in 6 h, consistent networks were formed. To insure the end of the reaction, the preparation of hydrogels went on for 12 h.

Structural Characterization of the Hydrogels

Hydrogels, once removed from the tubes, were transparent and easy to handle (firm but flexible). After immersion in water, their diameter increased from 8.6 mm up to around 12 mm, showing a smooth and continuous surface. These observations are characteristic of a homogeneously cross-linked hydrogel that does not lose material by disentanglement of the polymer chains (43).

The degree of the cross-linking was determined by the changes observed in the region of the ether bond signals of the IR spectra of dried hydrogels using HPβCD and HPMC powders as references (Fig. 3). In the 1120- to 1050-cm^{-1} range, HPβCD has a lower absorbance at 1082 cm^{-1} than at 1033 cm^{-1} ($A_{1082}/A_{1033} = 0.73$), and HPMC shows less intense peaks at 1117 cm^{-1} than at 1066 cm^{-1} ($A_{1117}/A_{1066} = 0.95$), which is characteristic of the predominance of primary alcohols in the structure of these substances

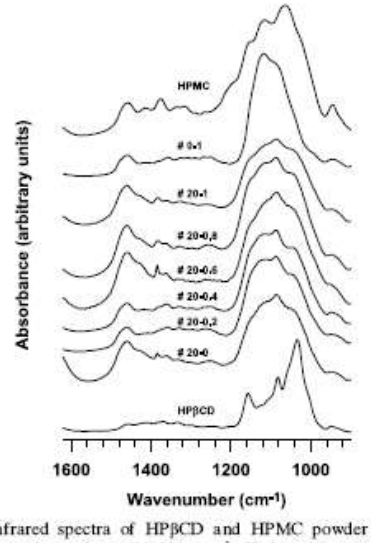


Fig. 3. Infrared spectra of HPβCD and HPMC powder and dry hydrogels in the region 1600–800 cm^{-1}. Hydrogels were prepared from 20% HPβCD solutions without HPMC (#20-0) or with 0.2% (#20-0.2), 0.4% (#20-0.4), 0.6% (#20-0.6), 0.8% (#20-0.8), or 1.0% (#20-1) HPMC, and from 1.0% HPMC solutions without HPβCD (#0-1).

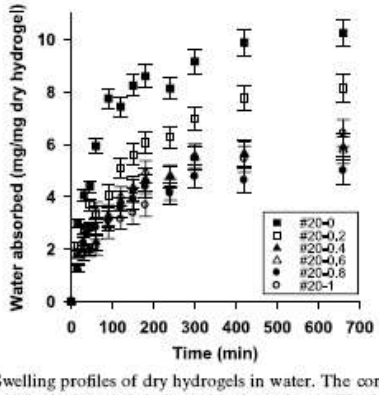


Fig. 4. Swelling profiles of dry hydrogels in water. The composition of the hydrogels is indicated by legend as in Fig. 3.

(29,45). By contrast, in the hydrogel, a remarkable increase in these ratios was observed: the A_{1082}/A_{1033} is in the range 1.03–1.13, and the A_{1117}/A_{1066} is in the range 1.01–1.13. This means an increase of about 60% of the A_{1082}/A_{1033} ratio in the HPβCD and of about 10% for the A_{1117}/A_{1066} ratio in the HPMC. These results indicate that around 60% of the primary OH of HPβCD have been transformed into secondary OH to form cross-linking junctions, which agrees with the expected two thirds of hydroxyl groups of HPβCD cross-linked by EGDE in the hydrogel. The 10% cross-linking of the OH groups of HPMC, observed both in the presence and in the absence of HPβCD, was similar to the one previously reported for other cellulose derivatives when the cross-linking process was finished (29). No signal appeared at 1250 cm^{-1}, confirming that no unreacted EGDE remains in the hydrogels.

The high affinity of the dried hydrogels for water was reflected in the profiles of swelling degree vs. time (Fig. 4). Although all swelled relatively fast, their final degree of swelling was notably dependent on the proportion of HPMC. The hydrogel prepared only with HPβCD (#20-0) was able to uptake ten times its dry weight in water, whereas the HPβCD-*co*-HPMC hydrogel prepared with the highest HPMC proportion (#20-1) increased only up to four times its weight. The dried hydrogel prepared only with HPMC (#0-1) looked like a film and was more difficult to handle. The degree to which it swelled after remaining in water for 12 h was 5.6 mg water/mg gel. The lower swelling degree of HPβCD-*co*-HPMC hydrogels is explained by the attainment of a higher cross-linker density; the long chains of this cellulose ether acted as bridge points among several cyclodextrins.

The amount of sorbed water depended linearly on $t^{1/2}$ ($r^2 > 0.99$) for all the hydrogels studied; that is, Fickian behavior was maintained in spite of the swelling of the network (36). All hydrogels showed a similar rate of swelling around 0.050–0.069 $min^{-0.5}$, except those prepared with HPβCD and the highest HPMC proportion (#20-1) that had a significantly lower slope (about 0.037 $min^{-0.5}$). The latter value is similar to those previously found for hydrogels prepared with other cellulose ethers in the absence of cyclodextrins (29). In any case, water sorption rates indicate that water molecules easily penetrate the structure of the networks.

Diclofenac Loading and Release

In general, loading and release from hydrogels mainly depend on (1) the easiness with which the drug molecules diffuse into the hydrogel, which is determined by the degree of cross-linking and the affinity of water for the network, and (2) the affinity of the drug for the components of the network (2,3,7,46). As mentioned above, the mesh size of all HPβCD and HPβCD-*co*-HPMC hydrogels prepared is enough to allow the exchange of the water and small size molecules. However, there are compositional and structural differences among the hydrogels that can affect their loading and release behavior. It was macroscopically observed that HPβCD-*co*-HPMC hydrogels with a slightly greater degree of cross-linking have a lower affinity for water (Fig. 4) than HPβCD hydrogel (#20-0). This can hinder the diffusion of drug molecules. The presence of the overlapped HPMC chains may also contribute to this effect. Therefore, when the hydrogel is loaded by immersion in a suitable drug solution, it is expected that the penetration of the drug inside HPβCD-*co*-HPMC hydrogels should occur in a much slower way, and, in the absence of other factors, the amount loaded may be less.

Table I shows the amounts of diclofenac loaded by each hydrogel. Loading was similar when disregarding the discs that were added to the drug solution in the swollen state or previously dried, which can be explained by the fast swelling of the dried hydrogels and by their ability to completely recover their initial form after the drying process.

The amount loaded by just a simple equilibrium between the aqueous phase of the network and the loading solution, which leads the drug concentration within the hydrogel to be equal to that of the loading solution, can be estimated using the following equation proposed by Kim *et al.* (46):

$$Loading\ (aqueous\ phase) = \left(V_s/W_p\right) \times C_0 \qquad (3)$$

where V_s is the volume of water sorbed by the hydrogel, W_p is the dried hydrogel weight, and C_0 is the concentration of the drug in the loading solution. If we consider the data of swelling shown in Fig. 4, when a 0.1% diclofenac solution is used, the mean amounts (standard deviations) loaded for the hydrogels by this mechanism are as follows: #20-0, 9.9 (0.5) mg/g; #20-0.2, 7.8 (0.4) mg/g; #20-0.4, 5.6 (0.3) mg/g; #20-0.6,

Table I. Diclofenac Loaded (mg/g dry hydrogel) by Immersing Dry Hydrogels in 0.1 or 0.5% Diclofenac Solution, and Values of the Partition Coefficient Between the Polymer Network and Drug Loading Solution, Calculated According Eq. (4)

	0.1% Solution		0.5% Solution	
Hydrogel code	Diclofenac loaded (mg/g)	*K*	Diclofenac loaded (mg/g)	*K*
#20-0	27 (1)	17.1 (0.8)	106 (19)	11.3 (0.6)
#20-0.2	20 (3)	12.2 (0.6)	81 (21)	8.4 (0.4)
#20-0.4	17 (2)	11.4 (0.6)	68 (12)	8.0 (0.4)
#20-0.6	16 (2)	10.4 (0.5)	58 (10)	6.0 (0.3)
#20-0.8	15 (1)	10.0 (0.5)	58 (12)	6.6 (0.3)
#20-1	17 (3)	11.6 (0.6)	57 (9)	6.0 (0.3)
#0-1	25 (2)	19.4 (0.9)	97 (23)	13.8 (0.7)

Mean values and, in parentheses, standard deviations. Hydrogel codes as in Fig. 3.

5.6 (0.3) mg/g; #20-0.8, 5.0 (0.2) mg/g; #20-1, 5.4 (0.3) mg/g; #0-1, 5.6 (0.2) mg/g. When a 0.5% diclofenac solution is used, amounts five times greater are estimated. The actual amounts loaded, which are shown in Table I, were 2.1–4.5 times greater. These results clearly indicate that the affinity of diclofenac for the network also plays a role in the loading process.

Because the pK_a of diclofenac is around 4 (35), it is expected that the ionized form predominates in the loading (pH 6.7) and release (pH 6.0) media. Nevertheless, even under these conditions, the solubilized drug could establish hydrophobic interactions with the network and form inclusion complexes with cyclodextrin cavities through its aromatic rings (47). This may explain the difference between the actual loading results and the values predicted using Eq. (3) for HPβCD and HPβCD-*co*-HPMC hydrogels. To gain an insight into the role of the interaction of diclofenac with cyclodextrin units, the partition coefficient K between the polymer network and the drug loading solution was estimated from the following expression (46):

$$Loading\,(total) = \left[(V_s + KV_p)/W_p\right] \times C_0 \qquad (4)$$

where V_p is the volume of dried polymer and the other variables as defined in Eq. (3). The partition coefficient is an index of the affinity of the drug for the network. The values of K (Table I) clearly prove that, despite that diclofenac is ionized and its ability to interact with the cyclodextrin cavities may be reduced (48), the cyclodextrin units play an important role in the loading of the hydrogel.

The high loading of HPMC-alone hydrogel (#0-1) is also explained by the hydrophobic interactions between the anhydroglucose units of the HPMC chains and the aromatic rings of diclofenac. A similar sorption phenomenon has been previously described for the other structurally related nonsteroidal anti-inflammatory drug, ibuprofen, for which a noncooperative association with cellulose ethers was observed in solutions below its critical micellar concentration (49). More than half of the anhydroglucose units were bound to ibuprofen molecules (49). Because diclofenac is more hydrophobic than ibuprofen (50), this type of interaction may be enhanced and contribute strongly to its loading by the HPMC hydrogel. Taking into account the composition of this hydrogel (about 3.27×10^{-4} U g of repeating anhydroglucose per gram of dry hydrogel), the total amount of drug loaded (a mean value of 3.14×10^{-4} mol/g), and the amount of drug that the hydrogel can load by simple equilibrium of its aqueous phase with the 0.5% diclofenac solution (0.91×10^{-4} mol/g), the number of diclofenac molecules bound to each anhydroglucose repeating unit of polymeric network was estimated to be 0.68. In HPβCD hydrogels (which have 3.84×10^{-4} mol of cyclodextrin per gram), the number of diclofenac molecules bound by each anhydroglucose unit is estimated to be in the range 1:4 and 1:5. Because each HPβCD is formed by seven anhydroglucose units and the contribution of the HPMC to the total content in anhydroglucose units is quite low, a drug/cyclodextrin molar ratio close to 0.61 can be assumed. Therefore, in HPβCD hydrogels, the loading seems to be mainly driven by the interaction of diclofenac molecules with the cyclodextrin cavities. The ability of resins made of cross-linked cyclodextrin to load organic compounds (phenol, benzoic acid, aniline, chlorobenzoic acid isomers, and tyrosine) through inclusion complex formation has been previously reported (16). A Langmuir or Freundlich type of isotherm is suitable to relate the amount absorbed by the resins with the concentration of the drug in the loading medium (16). Our findings (Table I) are in agreement with these results and also indicate an important dependence of the total amount loaded on diclofenac concentration in the surrounding solution. Because diclofenac is an amphiphilic drug, some molecules could be also loaded by self-association with those bonded to the network. This phenomenon has been observed to occur in ibuprofen– and diflunisal–cyclodextrin complexes in solution, below their critical micellar concentrations (47).

To gain an insight into the state of the drug in the cyclodextrin hydrogel, the Raman spectra of hydrogel samples were compared with those of diclofenac–HPβCD freeze-dried inclusion complexes. The Raman spectrum of diclofenac presents different bands associated with the phenyl acetate and the dichlorophenyl rings. The interaction of the drug with HPβCD to form an inclusion complex can take place through both rings, but it seems to be stronger through the dichlorophenyl one (11). To study the formation of the complexes, the changes in the Raman spectra of the drug loaded into the hydrogel were analyzed (37). In the region between 1500 and 1650 cm^{-1}, diclofenac shows three bands, and HPβCD and HPMC do not show any specific band that can interfere (Fig. 5). The 1579-cm^{-1} band is assigned to the $O_1C_8O_2$ asymmetric stretching vibration

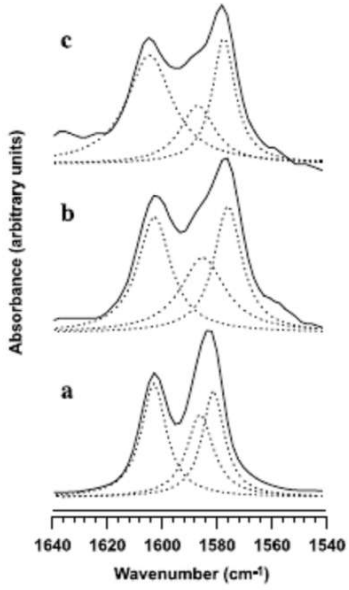


Fig. 5. Fourier transform–Raman spectra of diclofenac sodium (a), #20-0 hydrogel loaded with diclofenac sodium (b), and 1:1 diclofenac sodium HPβCD inclusion complex (c). Lorentzian deconvolution of Raman bands in the 1540- to 1640-cm^{-1} range is also shown as dotted lines.

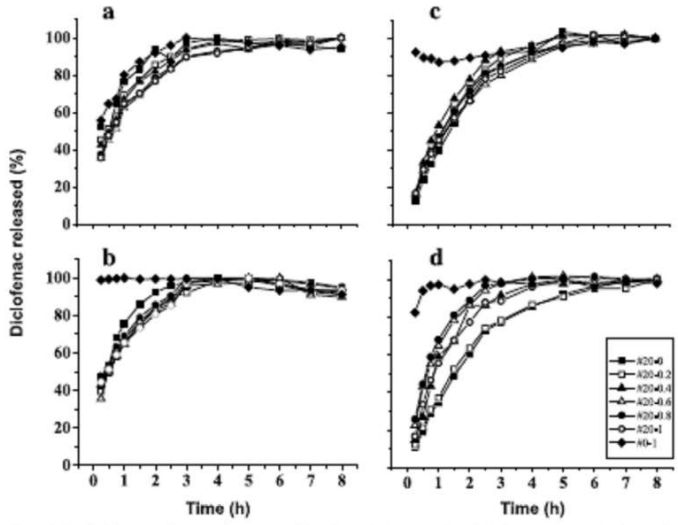


Fig. 6. Diclofenac sodium release profiles from hydrogels loaded in aqueous solutions of 0.5% w/w diclofenac sodium. Hydrogels not subjected to any drying step (a); hydrogels dried before loading and dried again before the release test (b); hydrogels only dried before the release (c); and hydrogels only dried before loading (d). Hydrogel legend as in Fig. 3.

(Fig. 1), whereas the bands at 1582 and 1603 cm^{-1} are related, respectively, with the dichlorophenyl and phenyl acetate ring stretching vibrations. Some of these bands became wider and shifted to greater wave numbers when inclusion complexes were formed by freeze-drying of drug–HPβCD solutions (see below). Similar changes were observed in the spectra of loaded cyclodextrin hydrogels (Fig. 5). Control samples of the drug, processed under the same conditions as the hydrogels and the complexes, did not show any change in their spectra. Therefore, the shifts observed in the complexes with HPβCD and in the loaded hydrogels cannot be attributed to changes on drug structure caused by the simple processing of the samples. Lorentzian deconvolution of this spectral region led to the resolution of the three characteristic peaks of the drug. The widths of diclofenac bands increased when the drug was forming inclusion complexes with HPβCD, and the maxima of the peaks were shifted except for the 1603-cm^{-1} band. This suggests that the interaction between the phenyl acetate ring of the drug with the cyclodextrin cavity is weak. In contrast, the peaks associated with the dichlorophenyl ring were significantly shifted from 1582 to 1588 cm^{-1}. These results, which were similar for all complexes disregarding the presence of HPMC in the preparation medium, indicate that diclofenac–HPβCD complexation is mainly driven by the inclusion of the dichlorophenyl ring in the cyclodextrin cavity. Raman spectra of the loaded HPβCD or HPβCD-*co*-HPMC hydrogels presented shifts similar to those observed for the complexes, with peaks at 1588 cm^{-1} (#20-0) and at 1589 cm^{-1} (#20-0.4). HPMC hydrogel (#0-1) also showed a shift to 1589 cm^{-1}. This confirms the existence of hydrophobic bonding, also in this hydrogel, between the drug and the anhydroglucose units. Because such an interaction with HPβCD is only possible when the drug enters into the cavity (the hydrophilic OH groups are orientated toward the exterior; Fig. 1) (21, 39), we can conclude that the interaction between the drug and the cyclodextrin in the hydrogel is similar to that which occurs in common host–guest complexes.

Figure 6 shows the diclofenac release profiles from hydrogels loaded in 0.5% diclofenac solution, which were very similar to those obtained for hydrogels loaded in 0.1% diclofenac. Some samples were directly assayed, i.e., not dried either before loading or before the release test (wet loaded–wet released). Hydrogels that were dried before loading and also again before the release test (dried loaded–dried released) and hydrogels with intermediate treatments (wet loaded–dried released; dried loaded–wet released) were also evaluated.

The release from the HPMC hydrogel, without incorporating HPβCD (#0-1), was practically immediate disregarding the thermal treatment. In contrast, the HPβCD and HPβCD-*co*-HPMC hydrogels were able to sustain the release for several hours, owing to the ability of cyclodextrins to provide a more hydrophobic environment than that of the linear chains of HPMC. The relatively fast release of a significant fraction of the dose at the beginning of the experiment can be related to drug molecules that were simply loaded by equilibrium of the aqueous phases, without effectively interacting with the network. These results clearly indicate that the cyclodextrin also plays an important role in the control of the release of diclofenac. It has been reported that although the stronger the binding constant, the slower the dissociation kinetics, the release of the drug from common cyclodextrin complexes is practically instantaneous when the complexes are diluted in aqueous fluids (13,48,51). Therefore, in general, cyclodextrin solutions do not provide a sustained release. However, in the case of formulations based on cyclodextrin hydrogels, the dilution phenomena are minimal because the

cyclodextrins are covalently attached to each other, and the volume of water that can enter the hydrogel is limited by its own network. This should provide a microenvironment rich in cavities available to interact with the surrounding drug molecules, and, as a consequence, cyclodextrin hydrogels could serve as platforms of new sustained release devices (17,24).

The effect of the proportion of HPMC was noticeable in the HPβCD-*co*-HPMC hydrogels that were not dried (wet loaded–wet released) or that suffered two drying steps (dried loaded–dried released), but the influence was the opposite. HPMC decreased the release rate in the former hydrogels but promoted the release in the latter ones. HPβCD hydrogels that were not dried (wet loaded–wet released) did not show significant changes in the degree of swelling during the release process, and the binding to the HPβCD plays the main role in the control of the release. The presence of HPMC leads to a greater cross-linking and a lower swelling degree (Fig. 4), which may explain the slightly slower release from HPβCD-*co*-HPMC hydrogels.

HPβCD-*co*-HPMC hydrogels that suffered two drying steps (dried loaded–dried released) showed a faster release as the HPMC proportion in the hydrogel increased. In these hydrogels, two concomitant effects can occur: (1) an enhancement of the drug–HPMC hydrogen bonds and hydrophobic interactions during the drying; and (2) a sweeping of the drug along by water during the swelling. Additionally, the entrance of water toward the hydrogel core and the diffusion of the drug can be facilitated by the salting out of the HPMC by diclofenac (52). These effects together with the affinity of the drug for the HPβCD determine the release rate. As can be seen in Fig. 5b and d, HPβCD hydrogel and HPβCD-*co*-HPMC hydrogel with the lowest proportion of HPMC released the drug at a significantly lower rate, despite their lower degree of cross-linking and greater degree of swelling.

We have previously found that cationic cellulose hydrogels cross-linked with EGDE can load diclofenac by electrostatic interactions and are able to sustain the release in water or pH 8 phosphate buffer for 4 h (29). The new HPβCD and HPβCD-*co*-HPMC hydrogels showed an even greater ability to load and to sustain the release of diclofenac for several hours. Therapeutic doses of diclofenac are in the range of 50–100 mg per day (53), and HPβCD and HPβCD-*co*-HPMC hydrogels can perfectly fulfill this requirement, being potentially useful as a basis of drug delivery systems for different routes (20,33,34). To improve the performance of these hydrogels to uptake and release strong hydrophobic drugs will be the aim of future work.

CONCLUSIONS

Cyclodextrin hydrogels that show good mechanical properties and high ability to load and sustain the release of an amphiphilic drug, diclofenac, can be obtained by direct cross-linking with diglycidylethers under mild conditions. Loading is mainly driven by the affinity of the drug for the cyclodextrin units, which also control the release process. This versatile procedure also allows the incorporation of other structurally related polymers, such as HPMC, to the network, which can contribute to the improvement of the physical properties and to the modulation of the release behavior.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financed by the Xunta de Galicia (PGIDT02BTF20302PR, PGIDIT03PXIC20303PN, and PGIDIT04BTF203011PR) and the Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain (RYC2001-8, SAF2005-01930). The authors are grateful to Janssen Pharmaceutica Products for providing free samples of hydroxypropyl-β-cyclodextrin.

REFERENCES

1. Y. W. Chien and S. S. Lin. Optimisation of treatment by applying programmable rate-controlled drug delivery technology. *Clin. Pharmacokinet.* **41**:1267–1299 (2002).
2. N. A. Peppas, K. M. Wood, and J. O. Blanchette. Hydrogels for oral delivery of therapeutic proteins. *Expert Opin. Biol. Ther.* **4**:881–887 (2004).
3. D. C. Coughlan, F. P. Quilty, and O. I. Corrigan. Effect of drug physicochemical properties on swelling/deswelling kinetics and pulsatile drug release from thermoresponsive poly(*N*-isopropylacrylamide) hydrogels. *J. Control. Release* **98**:97–114 (2004).
4. R. Barreiro-Iglesias, C. Alvarez-Lorenzo, and A. Concheiro. Incorporation of small quantities of surfactants as a way to improve rheological and diffusional behavior of carbopol gels. *J. Control. Release* **77**:59–75 (2001).
5. R. Rodriguez, C. Alvarez-Lorenzo, and A. Concheiro. Interactions of ibuprofen with cationic polysaccharides in aqueous dispersions and hydrogels. Rheological and diffusional implications. *Eur. J. Pharm. Sci.* **20**:429–438 (2003).
6. M. Glavas-Dodov, K. Goracinova, K. Mladenovska, and E. Fredro-Kumbaradzi. Release profile of lidocaine HCl from topical liposomal gel formulation. *Int. J. Pharm.* **242**:381–384 (2002).
7. C. Alvarez-Lorenzo and A. Concheiro. Molecularly imprinted polymers for drug delivery. *J. Chromatogr., B* **804**:231–245 (2004).
8. H. Asanuma, T. Hishiya, and M. Komiyama. Efficient separation of hydrophobic molecules by molecularly imprinted cyclodextrin polymers. *J. Incl. Phenom.* **50**:51–55 (2004).
9. H. Hiratani, Y. Mizutani, and C. Alvarez-Lorenzo. Controlling drug release from imprinted hydrogels by modifying the characteristics of the imprinted cavities. *Macromol. Biosci.* **5**:728–733 (2005).
10. D. C. Bibby, N. M. Davies, and I. G. Tucker. Mechanisms by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems. *Int. J. Pharm.* **197**:1–11 (2000).
11. B. Pose-Vilarnovo, C. Rodriguez-Tenreiro Sánchez, N. Dieguez Moure, J. L. Vila-Jato, and J. J. Torres-Labandeira. Effect of hydroxypropylmethyl cellulose on the complexation of diclofenac with cyclodextrin. *J. Therm. Anal. Calorim.* **73**:661–670 (2003).
12. T. Loftsson, H. Friöriksdóttir, A. M. Sigurdardóttir, T. Guömundsdóttir, and H. Ueda. The effect of water-soluble polymers on drug–cyclodextrin complexation. *Int J. Pharm.* **110**:169–177 (1994).
13. V. Stella and R. A. Rajewski. Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery. *Pharm. Res.* **14**:556–567 (1997).
14. J. Li, X. Ni, and K. W. Leong. Injectable drug-delivery systems based on supramolecular hydrogels formed by poly(ethylene oxide)s and α-cyclodextrin. *J. Biomed. Mater. Res.* **65**:196–202 (2003).
15. K. M. Huh, T. Ooya, W. K. Lee, S. Sasaki, I. C. Kwon, S. Y. Jeong, and N. Yui. Supramolecular-structured hydrogels showing a reversible phase transition by inclusion complexation between poly(ethylene glycol) grafted dextran and alpha-cyclodextrin. *Macromolecules* **34**:8657–8662 (2001).

16. G. Crini and M. Morcellet. Synthesis and applications of adsorbents containing cyclodextrins. *J. Sep. Sci.* **25**:789–813 (2002).
17. Y. Y. Liu, X. D. Fan, H. Hu, and Z. H. Tang. Release of chlorambucil from (Poly(*N*-isopropylacrylamide) hydrogels with β-cyclodextrin moieties. *Macromol. Biosci.* **4**:729–736 (2004).
18. Y. Y. Liu, X. D. Fan, T. Kang, and L. Sun. A cyclodextrin microgel for controlled release driven by inclusion effects. *Macromol. Rapid Commun.* **25**:1912–1916 (2004).
19. K. Uekama. Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation. *Chem. Pharm. Bull.* **52**:900–915 (2004).
20. D. Kanjickal, S. Lopina, M. M. Evancho-Chapman, S. Schmidt, and D. Donovan. Improving delivery of hydrophobic drugs from hydrogels through cyclodextrins. *J. Biomed. Mater. Res.* **74A**:454–460 (2005).
21. M. E. Davis and M. E. Brewster. Cyclodextrin-based pharmaceutics: past, present and future. *Nat. Rev., Drug Discov.* **3**:1023–1035 (2004).
22. F. Quaglia, G. Varricchio, A. Miro, M. I. La Rotonda, D. Larobina, and G. Mensitieri. Modulation of drug release from hydrogels by using cyclodextrins: the case of nicardipine/β-cyclodextrin system in crosslinked polyethyleneglycol. *J. Control. Release* **71**:329–337 (2001).
23. N. Pariot, F. Edwards-Lévy, M. C. Andry, and M. C. Lévy. Cross-linked β-cyclodextrin microcapsules: preparation and properties. *Int. J. Pharm.* **232**:175–181 (2002).
24. J. T. Zhang, S. W. Huang, F. Z. Gao, and R. X. Zhuo. Novel temperature-sensitive, β-cyclodextrin-incorporated poly(*N*-isopropylacrylamide) hydrogels for slow release of drug. *Colloid Polym. Sci.* **283**:461–464 (2005).
25. K. Sreenivasan. On the restriction of the release of water-soluble component from polyvinyl alcohol film by blending β-cyclodextrin. *J. Appl. Polym. Sci.* **65**:1829–1832 (1997).
26. A. M. Layre, N. M. Gosselet, E. Renard, B. Sebille, and C. Amiel. Comparison of the complexation of cosmetical and pharmaceutical compounds with γ-cyclodextrin, 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin and water-soluble β-cyclodextrin-*co*-epichlorohydrin polymers. *J. Incl. Phenom.* **43**:311–317 (2002).
27. T. Amiya and T. Tanaka. Phase transitions in cross-linked gels of natural polymers. *Macromolecules* **20**:1162–1164 (1987).
28. N. Yui, T. Okano, and Y. Sakurai. Inflammation responsive degradation of crosslinked hyaluronic acid gels. *J. Control. Release* **22**:105–116 (1992).
29. R. Rodriguez, C. Alvarez-Lorenzo, and A. Concheiro. Cationic cellulose hydrogels: kinetics of the cross-linking process and characterization as pH-/ion-sensitive drug delivery systems. *J. Control. Release* **86**:253–265 (2003).
30. National Library of Medicine. Bis(1,2-epoxypropylether)ethanediol. http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/jsp/common/ChemFull.jsp (accessed June 2005).
31. A. Poole, P. van Herwijnen, H. Weideli, M. C. Thomas, G. Ransbotyn, and C. Vance. Review of the toxicology, human exposure and safety assessment for bisphenol A diglycidylether (BADGE). *Food Addit. Contam.* **21**:905–919 (2004).
32. L. A. Hussain, S. H. Dickens, and R. L. Bowen. Properties of eight methacrylated beta-cyclodextrin composite formulations. *Dent. Mater.* **21**:210–216 (2005).
33. J. Cassidy, B. Berner, K. Chan, V. John, S. Toon, B. Holt, and M. Rowland. Human transbuccal absorption of diclofenac sodium from a prototype hydrogel delivery device. *Pharm. Res.* **10**:126–129 (1993).
34. M. D. Kurkuri and T. M. Aminabhavi. Poly(vinyl alcohol) and poly(acrylic acid) sequential interpenetrating network pH-sensitive microspheres for the delivery of diclofenac sodium to the intestine. *J. Control. Release* **96**:9–20 (2004).
35. C. M. Adeyeye and P. K. Li. Diclofenac sodium. In K. Florey (ed.), *Analytical Profiles of Drug Substances, Vol. 19*, Academic Press, New York, 1990, pp. 123–144.
36. S. H. Gehrke, D. Biren, and J. J. Hopkins. Evidence for Fickian water transport in initially glassy poly(2-hydroxyethyl methacrylate). *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **6**:375–390 (1994).
37. T. Iliescu, M. Baia, and V. Miclauş. A Raman spectroscopic study of the diclofenac sodium-β-cyclodextrin interaction. *Eur. J. Pharm. Sci.* **22**:487–495 (2004).
38. K. P. C. Vollhardt and N. E. Schore. Further reactions of alcohols and the chemistry of ethers. In K. P. C. Vollhardt (ed.), *Organic Chemistry, Structure and Function*, W.H. Freeman and Company, New York, 2003, pp. 346–350.
39. H. M. Cabral Marques. Applications of cyclodextrins. Thermodynamic aspects of cyclodextrin complexes. *Rev. Port. Farm.* **44**:77–84 (1994).
40. T. Loftsson and M. E. Brewster. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. *J. Pharm. Sci.* **85**:1017–1025 (1996).
41. T. F. Chin, P. H. Chung, and J. L. Lach. Influence of cyclodextrins on ester hydrolysis. *J. Pharm. Sci.* **57**:44, 1968 (1968).
42. C. Alvarez-Lorenzo, R. A. Lorenzo-Ferreira, J. L. Gomez-Amoza, R. Martinez-Pacheco, C. Souto, and A. Concheiro. A comparison of gas–liquid chromatography, NMR spectroscopy and Raman spectroscopy of the substituent content of general non-ionic cellulose ethers. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **20**:373–383 (1999).
43. D. Capitan, M. A. Nobile, G. Mensitieri, A. Sannino, and A. L. Segre. ^{13}C solid state NMR determination of cross-linking degree in superabsorbing cellulose-based networks. *Macromolecules* **33**:430–437 (2000).
44. C. Alvarez-Lorenzo, R. Duro, J. L. Gomez-Amoza, R. Martinez-Pacheco, C. Souto, and A. Concheiro. Influence of polymer structure on the rheological behavior of hydroxypropyl–methylcellulose–sodium carboxymethylcellulose. *Colloid Polym. Sci.* **279**:1045–1057 (2001).
45. F. W. Langkilde and A. Svantesson. Identification of celluloses with Fourier-transform (FT) mid-infrared, FT-Raman and near-infrared spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **13**:409–414 (1995).
46. S. W. Kim, Y. H. Bae, and T. Okano. Hydrogels: swelling, drug loading and release. *Pharm. Res.* **9**:283–290 (1992).
47. A. Magnusdottir, M. Másson, and T. Loftsson. Self association and cyclodextrin solubilization of NSAIDs. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **44**:213–218 (2002).
48. V. J. Stella, V. M. Rao, E. A. Zannou, and V. Zia. Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **36**:3–16 (1999).
49. A. Ridell, H. Evertsson, S. Nilsson, and L. O. Sundelof. Amphiphilic association of ibuprofen and two non-ionic cellulose derivatives in aqueous solution. *J. Pharm. Sci.* **88**:1175–1181 (1999).
50. P. Bustamante, M. A. Peña, and J. Barra. The modified extended Hansen method to determine partial solubility parameters of drugs containing a single hydrogen bonding group and their sodium derivatives: benzoic acid/Na and ibuprofen/Na. *Int. J. Pharm.* **194**:117–124 (2000).
51. K. Uekama, F. Hirayama, and T. Irie. Application of cyclodextrins in pharmaceutical preparations. *Drug Target. Deliv.* **3**:411–456 (1994).
52. C. B. McCrystal, J. L. Ford, and A. R. Rajabi-Siahboomi. Water distribution studies within cellulose ethers using differential scanning calorimetry. 1. Effect of polymer molecular weight and drug addition. *J. Pharm. Sci.* **88**:792–801 (1999).
53. *Martindale. The Complete Drug Reference*. K. Parfitt (ed.). Pharmaceutical Press, Tauton, MA 1999, p 32.

ESTRADIOL SUSTAINED RELEASE FROM HIGH AFFINITY CYCLODEXTRIN HYDROGELS

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics
Article in press

EJPB 9866
11 October 2006 Disk Used
ARTICLE IN PRESS
No. of Pages 8, Model 5+
Suba (CE) / Karthikeyan (TE)

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics xxx (2006) xxx–xxx
European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics
www.elsevier.com/locate/ejpb

Research paper

Estradiol sustained release from high affinity cyclodextrin hydrogels ☆

C. Rodriguez-Tenreiro, C. Alvarez-Lorenzo, A. Rodriguez-Perez, A. Concheiro, J.J. Torres-Labandeira *

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

Received 7 July 2006; accepted in revised form 12 September 2006

Abstract

Hydrogels for loading estradiol and controlling its release were prepared cross-linking various cyclodextrins with ethyleneglycol diglycidylether. To select the more adequate cyclodextrins, estradiol solubility diagrams in water with β-cyclodextrin (βCD), methyl-β-cyclodextrin (MβCD), hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPβCD), and sulfobutyl-β-cyclodextrin (SBβCD) were made in absence and presence of hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) applying or not autoclaving. Although all cyclodextrins showed enough complexation capability, the low solubility of βCD and the high anionic character of SBβCD hindered the cross-linking process, and these cyclodextrins were discarded for preparing hydrogels. Hydrogels prepared with MβCD (20%, 25%) or HPβCD (20%, 25%, and 30%), with or without HPMC 0.25%, absorbed 4–10 times their weight in water and loaded up to 24 mg estradiol per gram, which is 500 times greater than the amount of drug that can be dissolved in their aqueous phase. Positive linear correlation was found between the stability constant and the network/water partition coefficients of drug. The hydrogels sustained the release up to one week; the affinity of estradiol for the cyclodextrin units controlling the process, as shown by the negative correlation with the release rate constants. These results highlight the potential of cyclodextrin complexation for the development of hydrogels useful in loading hydrophobic drugs and controlling their release.
© 2006 Published by Elsevier B.V.

Keywords: Hydroxypropyl-β-cyclodextrin; Methyl-β-cyclodextrin; Sulfobutyl-β-cyclodextrin; Inclusion complexes; Hydrophobic drugs; Chemically cross-linked hydrogels; Controlled release

1. Introduction

Estradiol is the most potent natural estrogenic hormone and its main clinical use is in post-climacteric replacement therapy. For this purpose, a variety of oral, transdermal, subcutaneous, and intravaginal dosage forms have been developed [1,2]. Oral therapy is limited by the poor water solubility of this drug, its low stability in the upper part of the gastrointestinal tract, and its intensive first pass hepatic metabolism [3]. Therefore, in order to maintain a long term effective blood concentration, the delivered doses of estradiol must exceed several times those administered by other routes, which enhances the risks of adverse reactions and non-compliance by the patients [4]. Transdermal formulations, such as matricial or reservoir patches, can avoid these drawbacks, but usually require an oily or alcoholic medium to dissolve the drug [5–7]. Buccal and vaginal mucosa are also adequate for the absorption of steroids when administered as inserts, films or rings [1,4,8,9].

Aqueous physical gels containing drug-loaded vesicles (liposomes, niosomes, micelles, and microemulsions) have been extensively evaluated as topical and transdermal estradiol delivery systems [1,10–12]. Chemically cross-linked hydrogels may also offer interesting possibilities as estradiol dosage forms, administered by almost any route [13], if their limited ability for the direct loading of this poorly water-soluble drug is overcome. Attempts to load hydrogels involved a synthesis in the presence of estradiol, previously dissolved in ethanol [14], or its incorporation to

☆ The work described in this paper is the subject of patent applications filed by the University of Santiago de Compostela.

* Corresponding author. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain. Tel.: +34 981563100; fax: +34 981547148.
E-mail address: ffjuant@usc.es (J.J. Torres-Labandeira).

0939-6411/$ - see front matter © 2006 Published by Elsevier B.V.
doi:10.1016/j.ejpb.2006.09.003

Please cite this article in press as: C. Rodriguez-Tenreiro et al., Estradiol sustained release from high affinity cyclodextrin hydrogels, Eur. J. Pharm. Biopharm. (2006), doi:10.1016/j.ejpb.2006.09.003

UNCORRECTED PROOF

EJPB 9866 ARTICLE IN PRESS No. of Pages 8, Model 5+
11 October 2006 Disk Used Suba (CE) / Karthikeyan (TE)

hydrophobic regions of amphiphilic networks [15]. Cross-linked cyclodextrins that enable the combination of the hydrogel versatility with the complexation capability of cyclodextrins could be particularly useful [16–19]. Polymerized cyclodextrins maintain, or even promote, the complexation ability of the free cyclodextrins in solution [19,20].

In general, the stronger the binding constant of the drug–cyclodextrin complexes is, the slower the dissociation kinetics is. However, when solutions of drug–cyclodextrin complexes are diluted in the physiological fluids, the release of the drug is practically instantaneous. As a consequence, cyclodextrin solutions do not provide a sustained release and even a precipitation of drug can occur [21–23]. By contrast, in the case of the cyclodextrin hydrogels, the dilution phenomena are minimal since the cyclodextrin units are covalently attached to each other and the volume of water which can enter the hydrogel is limited by the own network. This should provide a microenvironment rich in cavities available to interact with the surrounding drug molecules. Consequently, delivery systems comprising chemically linked cyclodextrins offer considerable possibilities of achieving sustained release [17,18,24].

Cyclodextrin hydrogels are usually obtained by copolymerization of cyclodextrin monomeric derivatives with other acrylic or vinyl monomers [17–19,24]. In order to avoid the important drawbacks of the chemical modification of cyclodextrins (low reproducibility of the synthesis or residual toxic monomers), we previously developed a direct procedure to obtain HPβCD hydrogels using diglycidylethers as cross-linking agents. This type of cross-linkers is able to react directly with the hydroxyl groups of cyclodextrin under mild conditions. The resultant hydrogels have been shown to be able to efficiently load and control the release of an amphiphilic drug, such as diclofenac [25].

The aim of this work was to prepare hydrogels of different cyclodextrin varieties, cross-linked with ethyleneglycol diglycidylether (EGDE), and to evaluate their loading capability and their potential as estradiol aqueous-based sustained delivery systems. The ability of some cyclodextrins to complexate estradiol and increase its solubility in physiological environments [26–29] suggests that cyclodextrin hydrogels may present a high affinity for this drug. First, the complexation of estradiol with various natural and semi-synthetic cyclodextrins was evaluated in water, in the presence and absence of hydroxypropyl methylcellulose (HPMC), which was chosen as the potential promoter of the affinity. Several hydrogels were prepared and their behavior is discussed on the basis of the cyclodextrin affinity for the drug.

2. Materials and methods

2.1. Materials

β-Cyclodextrin (βCD) and methyl-β-cyclodextrin (MβCD; KLEPTOSE® CRYSMEB; 4 methyl groups per native cyclodextrin molecule, M.S. 0.57) were provided by Laisa-Roquette (Barcelona, Spain); hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPβCD; D.S. 4.6) by Janssen Pharmaceutica Products (Belgium); and sulfobutyl-β-cyclodextrin (SBβCD; hepta-substituted, M.S. 1) by CyDex (Kansas, USA). Hydroxypropyl methylcellulose Methocel® K4M (HPMC, batch MM87050902K) was provided by Dow Stade GmbH (Germany); 17β-estradiol and sodium dodecyl sulfate (SDS) were from Sigma–Aldrich (Spain); ethyleneglycol diglycidylether (EGDE) (50% w/w in water) was from Fluka Chemie GmbH (Germany). Purified water with a resistivity above 18.2 MΩ cm^{-1} was obtained by reverse osmosis (MilliQ®, Millipore Spain). All other reagents were of analytical grade.

2.2. Solubility studies

Suspensions of estradiol were prepared (in quadruplicate) by adding an excess of drug to cyclodextrin or cyclodextrin/0.25% w/v HPMC aqueous solutions. The βCD concentration ranged from 0% to 0.9% (w/v). The concentration of the βCD derivatives was up to 5%. Some of these suspensions (two replicates) were autoclaved (Raypa AES-1219, Spain) at 121 °C for 20 min. The autoclaved and non-autoclaved suspensions were shaken at 25 °C and 50 rpm for 5 days, and then filtered through 0.22 μm cellulose acetate membranes (Millipore®, Ireland). Drug concentration was determined by UV spectrophotometry (Agilent 8453, Germany) at 280 nm ($E_{1\%\ 1\ cm} = 67.59$).

The apparent stability constants of the drug–cyclodextrin 1:1 complexes were estimated from the A_L-type diagrams using the following expression [30]:

$$K_{1:1} = \frac{m}{S_0(1-m)} \quad (1)$$

where m is the slope of the plot and S_0 is estradiol solubility in water [31]. The apparent stability constants from the B_S and A_N type diagrams were also estimated using Eq. (1) by considering only the initial linear section of the plots. The ratio between free and complexated cyclodextrin molecules in solution was directly estimated from the solubility diagrams assuming that the stoichiometry of the complexes is 1:1.

2.3. Synthesis of cyclodextrin hydrogels

HPβCD (20, 25 or 30% w/v) and MβCD (20 or 25% w/v) were dissolved in freshly prepared 0.2 M NaOH solutions. The solutions were divided in 5 ml portions and HPMC was added to some, up to a final concentration of 0.25% w/v. Once homogenized, EGDE (2 ml of 50% w/w water solution) was added to each dispersion and stirred for 2 min at 20 °C. The systems were immediately transferred to test tubes (8.6 mm internal diameter), which were hermetically closed and kept at 50 °C for 12h. After cooling down, the HPβCD, MβCD, HPβCD-co-HPMC, and MβCD-co-HPMC hydrogels were carefully removed from the moulds and immersed in ultrapure water for

UNCORRECTED PROOF

Please cite this article in press as: C. Rodriguez-Tenreiro et al., Estradiol sustained release from high affinity cyclodextrin hydrogels, Eur. J. Pharm. Biopharm. (2006), doi:10.1016/j.ejpb.2006.09.003

EJPB 9866 ARTICLE IN PRESS No. of Pages 8, Model 5+
11 October 2006 Disk Used Suba (CE) / Karthikeyan (TE)
C. Rodriguez-Tenreiro et al. / European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics xxx (2006) xxx–xxx 3

12 h to swell. After, they were transferred to a 10 mM HCl solution for 12 h to neutralize the alkaline medium and, then, immersed in water once again. Finally, cylindrical pieces of each gel (4–5 mm thickness) were cut and maintained in water.

2.4. Characterization of the hydrogels

2.4.1. Swelling studies

Dry samples of each hydrogel (about 58 mg, 5 mm diameter and 1.5 mm thickness) were immersed in 10 ml of water and weighed after pre-established time periods. The total amount of water absorbed was estimated using the expression:

$$Q = (W_\infty - W_0)/W_0 \quad (2)$$

where W_0 is the weight of the hydrogel after being dried at 40 °C and W_∞ is the weight of the fully swollen hydrogel.

The kinetics of water uptake was characterized by fitting the data obtained up to 60% of the final content in water to the following empirical equation [32]:

$$W_t/W_\infty = K_w t^{0.5} \quad (3)$$

where W_t is the amount of water absorbed at time t and K_w is a rate constant.

2.4.2. Estradiol loading

Cylindrical pieces of each hydrogel (4–5 mm thickness) were placed in vials containing aqueous suspensions of estradiol (15 mg in 10 ml), which were put in a bath at 25 °C and subjected to 50 oscillations per minute for 1 week; some being firstly autoclaved for 20 min at 121 °C. To determine the amount loaded, hydrogels were immersed in 15 ml of 0.3% w/v SDS solutions that were replaced every second day, for approximately 1 week, and the estradiol concentration in the washing medium was determined spectrophotometrically ($\lambda = 280$ nm; Agilent, Germany). The amount of estradiol loaded was estimated as the total estradiol released to the washing medium. Experiments were carried out in quadruplicate.

2.4.3. Estradiol release

Estradiol-loaded hydrogels were rinsed with water and immersed in 15 ml SDS (0.3% w/v) solution at room temperature, under sink conditions. The amount of estradiol released was measured spectrophotometrically ($\lambda = 280$ nm) in periodically taken samples and again placed in the same vessel so that the liquid volume was kept constant. The release profiles in the first 8-h period were characterized by fitting the Higuchi equation [33]:

$$M_t/M_\infty = K_H t^{0.5} \quad (4)$$

where M_t and M_∞ represent the amounts of estradiol released at time t and after infinite time, respectively. The experiments were carried out in quadruplicate.

3. Results and discussion

In order to carry out the study, βCD and its derivatives were chosen since dimensions of the cavity of this cyclodextrin enable effective complexation of estradiol [29]. Using different derivatives, the influence of the substitution characteristics on the estradiol complexation in solution and, thus, on the loading/controlled release performance of the hydrogels can be analyzed. Compared to βCD the main advantage of the derivatives is their greater aqueous solubility, which enables highly soluble complexes to be obtained [23,26]. This is an important issue since the preparation of cyclodextrin concentrated solutions is required to allow the cross-linking agent to efficiently promote intermolecular bonds during hydrogel formation. In addition to the most common hydroxypropylated derivative (HPβCD), the polyanionic SBβCD and a methylated derivative MβCD were used. SBβCD presents sodium sulfonate substituents separated from the hydrophobic cavity by a butyl ether spacer group. This cyclodextrin can form strong complexes with poorly water soluble drugs owing to an extended hydrophobic cavity and an extremely hydrophilic exterior surface [28]. MβCD is a low substituted non-ionic cyclodextrin that shows enhanced water solubility despite its deeper and more hydrophobic cavity compared to βCD. Therefore, it is also particularly adequate to host hydrophobic molecules [34,35]. All these βCD derivatives have been shown to be safe when orally and some parenterally administered, and exhibit a significantly lower nephrotoxicity compared to the parent cyclodextrin [19].

3.1. Cyclodextrin–estradiol complexes in solution

Phase-solubility diagrams obtained in the presence of βCD were Bs type [30] which is indicative of the formation of inclusion complexes with limited water solubility. The 0.2% βCD solutions enhanced estradiol solubility 34-fold. Further increases in the βCD concentration did not significantly enhance the solubility. By contrast, phase solubility diagrams obtained with MβCD, HPβCD and SBβCD were A_L type with a slope lower than 1, which is characteristic of the formation of 1:1 mol–mol complexes (Fig. 1). Estradiol solubility ranked as follows: MβCD > HPβCD > SBβCD; with increments of 158-, 100- and 76-fold, respectively, when cyclodextrin concentration in solution was 1% (Table 1). The stability constants of the complexes (Table 2) were calculated according to Eq. (1) from values of the slope of the phase-solubility diagrams. The close values of the stability constants obtained with βCD, SBβCD and MβCD indicate the similarity of their complexation capacity at low cyclodextrin concentrations.

The complex stability constants also provide information about the proportion of cyclodextrin molecules that remain free in the drug/cyclodextrin solution, which is of great practical interest [31,36]. We found that one out of three molecules of βCD, MβCD or SBβCD in solution forms a water-soluble complex with estradiol; this relation

Please cite this article in press as: C. Rodriguez-Tenreiro et al., Estradiol sustained release from high affinity cyclodextrin hydrogels, Eur. J. Pharm. Biopharm. (2006), doi:10.1016/j.ejpb.2006.09.003

EJPB 9866 | ARTICLE IN PRESS | No. of Pages 8, Model 5+
11 October 2006 Disk Used | Suba (CE) / Karthikeyan (TE)

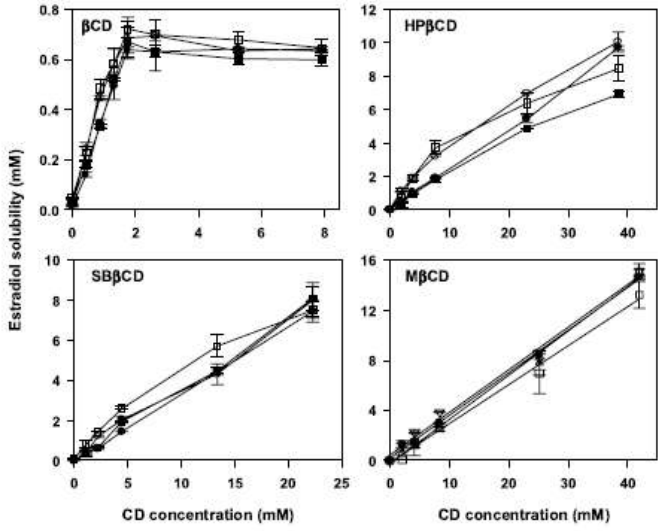


Fig. 1. Solubility diagrams of estradiol in cyclodextrin solutions before (●) and after autoclaving (○), or in cyclodextrin/HPMC (0.25%) solutions before (■) and after autoclaving (□).

Table 1
Solubility of estradiol in cyclodextrin (Sc) or cyclodextrin/0.25% HPMC solutions (Sc-p) at 25 °C

Cyclodextrin	Sc (mM)	Sc* (mM)	Sc-p (mM)	Sc-p* (mM)	Sc*/Sc	Sc-p/Sc	Sc-p*/Sc
βCD (0.2%)	0.64	0.69	0.67	0.72	1.07	1.05	1.13
HPβCD (1%)	1.91	3.23	1.81	3.72	1.69	0.94	1.95
MβCD (1%)	3.01	2.67	2.51	3.86	0.89	0.84	1.28
SBβCD (1%)	1.45	2.07	1.95	2.62	1.43	1.34	1.81

Estradiol solubility in water was determined to be 0.019 mM.
* Autoclaved samples.

Table 2
Apparent stability constants, $K_{1:1}$ (mM^{-1}), of estradiol–cyclodextrin inclusion complexes in solution prepared under different thermal treatments

System	Non-autoclaved	Autoclaved
βCD	32.5 (4.2)	32.2 (7.8)
βCD + HPMC	31.7 (4.5)	31.8 (0.7)
HPβCD	17.4 (0.1)	36.4 (0.1)
HPβCD + HPMC	11.7 (0.4)	50.2 (4.5)
MβCD	27.2 (0.9)	23.1 (0.9)
MβCD + HPMC	28.9 (2.3)	27.9 (0.1)
SBβCD	26.6 (2.0)	27.0 (2.1)
SBβCD + HPMC	29.2 (3.4)	66.2 (2.5)

Mean values and, in brackets, standard deviations ($n = 3$).

decreasing to one out of four cyclodextrins in the case of HPβCD. Therefore, MβCD and SBβCD appear as the most effective estradiol solubilizers and are, *a priori*, more suitable to prepare liquid formulations with a low cyclodextrin proportion.

The enhancement of the complexation capability by the incorporation of hydrophilic polymers and the application of thermal treatments, which has received a great attention over last few years [36], can be particularly relevant for the optimization of the hydrogels. Thus, the effects of adding HPMC (0.25%) and/or applying autoclaving on estradiol solubility were evaluated. Neither the complexation efficiency nor the solubility of estradiol was significantly modified in the βCD or MβCD systems (Table 2). By contrast, complexation with SBβCD was quite susceptible to the combination of both factors; the enhancement in complexation efficiency resulted in an increase in estradiol solubility, with more than half of the total cyclodextrins in solution forming complexes with estradiol. Autoclaving was particularly effective at increasing both the complexation efficiency and the solubility of estradiol in HPβCD solutions, in particular when HPMC was present. In the latter case nearly as many molecules of cyclodextrin as those complexed with estradiol were free.

UNCORRECTED

Please cite this article in press as: C. Rodriguez-Tenreiro et al., Estradiol sustained release from high affinity cyclodextrin hydrogels, Eur. J. Pharm. Biopharm. (2006), doi:10.1016/j.ejpb.2006.09.003

EJPB 9866 ARTICLE IN PRESS No. of Pages 8, Model 5+
11 October 2006 Disk Used Suba (CE) / Karthikeyan (TE)

3.2. Cyclodextrin hydrogels

3.2.1. Preparation and water sorption

The influence of different variables on the synthesis and properties of EDGE cross-linked HPβCD hydrogels has been previously evaluated in detail [25]. According to those studies, alkaline pH and mild temperature are required to form systems with the consistency required for easy handling, but also with enough elasticity to avoid damage to surrounding biological tissues once administered. Similarly to HPβCD hydrogels, the MβCD hydrogels with or without HPMC were formed in less than six hours, but attempts to prepare SBβCD hydrogels following the same protocol failed. This can be explained by the high degree of substitution of this hepta-substituted derivative (few OH groups remain in the cyclodextrin structure available to interact with EDGE) and by the repulsions among the cyclodextrin units owing to the ionized sulfonate groups. Therefore, SBβCD had to be discarded for the following studies.

Once immersed in water, the MβCD, HPβCD, HPβCD-co-HPMC and MβCD-co-HPMC hydrogels swelled from 8.6 up to around 12 mm in diameter, showing a smooth and continuous surface. This behavior is characteristic of a homogeneously cross-linked network which does not lose material by disentanglement of the polymer chains. This was expected taking into account the proportion of EGDE used in the synthesis, which leads to 60% of the hydroxyl groups of the cyclodextrins to participate in the cross-linking bridges [25].

The dried hydrogels behaved as superabsorbing systems, being able to uptake in few hours 6–10 times its weight in water (Fig. 2). The final degree of swelling was slightly lower for HPβCD hydrogels than for those made of MβCD. The lower swelling degree and the brittle character of HPβCD(30%)-co-HPMC(0.25%) hydrogels are explained by the attainment of a higher cross-linking density.

The amount of sorbed water depended linearly on $t^{1/2}$ ($r^2 > 0.99$) for all the hydrogels studied; i.e. Fickian behavior was maintained in spite of the swelling of the network [32]. The swelling rate constants (Table 3) indicate that water molecules, as well as other small size molecules, can easily penetrate the structure of the cyclodextrin network.

3.2.2. Estradiol loading

Table 4 shows the results of the loading experiments. HPβCD hydrogels that underwent autoclaving loaded twice the estradiol that the corresponding non-autoclaved ones did. This effect is in agreement with the results of the solubility study (Fig. 1). As it could be also expected, hydrogels containing MβCD showed, in general, greater complexation capacity, and the autoclaving had modest and random influence (loading only slightly decreased for MβCD hydrogels but increased for MβCD-co-HPMC ones). Considering the high potency of the drug, which is orally administered in doses of 1–2 mg/day or as patches of 2–5 mg/week [4], the weight of a suitable formulation once estradiol is included in the cyclodextrin hydrogel would be in the range of 50–200 mg. The lowest loading yield of the HPβCD(30%)-co-HPMC(0.25%) hydrogel is probably related to its lowest degree of swelling; the low mesh size of this hydrogel hindering drug diffusion through the network.

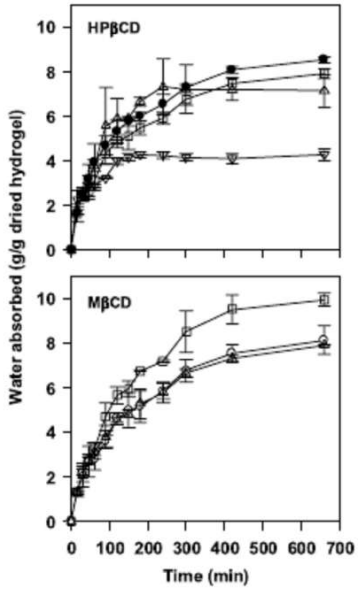


Fig. 2. Swelling profiles in water of dry HPβCD or MβCD hydrogels prepared with 20% cyclodextrin (●), 20% cyclodextrin–0.25% HPMC (□), 25% cyclodextrin–0.25% HPMC (△), and 30% cyclodextrin–0.25% HPMC (▽).

Table 3
Mean values of water sorption constants (K_w) of the hydrogels at 25 °C

Hydrogel		K_w ($min^{-1/2}$)	r
MβCD	20%	0.042	0.989
	20% +HPMC 0.25%	0.043	0.983
	25% +HPMC 0.25%	0.046	0.995
HPβCD	20%	0.050	0.995
	20% +HPMC 0.25%	0.047	0.988
	25% +HPMC 0.25%	0.064	0.995
	30% +HPMC 0.25%	0.093	0.958

The variation coefficients were below 5%, ($n = 3$).

The amount loaded just by a simple equilibrium between the aqueous phase of the network and the loading solution can be estimated using the following equation [37]:

$$\text{Loading (aqueous phase)} = (V_s/W_p) \times C_0 \quad (5)$$

where V_s is the volume of water sorbed by the hydrogel, W_p is the dried hydrogel weight, and C_0 is the concentration of

UNCORRECT

Please cite this article in press as: C. Rodriguez-Tenreiro et al., Estradiol sustained release from high affinity cyclodextrin hydrogels, Eur. J. Pharm. Biopharm. (2006), doi:10.1016/j.ejpb.2006.09.003

EJPB 9866 ARTICLE IN PRESS No. of Pages 8, Model 5+
11 October 2006 Disk Used Suba (CE) / Karthikeyan (TE)

Table 4
Estradiol load (mg/g of dry hydrogel) and hydrogel/water partition coefficient ($K_{N/W}$) obtained when hydrogels were loaded in a drug suspension, and release rate constant (K_H) values in 0.3% SDS solution

Hydrogel	Non-autoclaved				Autoclaved			
	Load (mg/g)	$K_{N/W}$	CD unit: estradiol (molar ratio)	K_H (% $h^{-1/2}$)	Load (mg/g)	$K_{N/W}$	CD unit: estradiol (molar ratio)	K_H (% $h^{-1/2}$)
20% MβCD	17.03 (0.01)	3285	6.7	6.70 (0.25)	13.43 (0.01)	2590	8.6	11.39 (0.29)
20% MβCD + HPMC	18.73 (0.01)	3612	6.1	9.12 (0.60)	18.22 (0.01)	3514	6.4	14.23 (0.12)
25% MβCD + HPMC	16.31 (0.01)	3146	7.1	10.15 (0.33)	24.70 (0.02)	4769	4.7	8.28 (0.12)
20% HPβCD	7.71 (0.01)	1482	13.6	9.89 (0.39)	19.31 (0.01)	3726	5.5	6.24 (0.12)
20% HPβCD + HPMC	10.29 (0.01)	1982	10.2	11.37 (0.42)	22.04 (0.01)	4255	4.8	6.64 (0.16)
25% HPβCD + HPMC	9.61 (0.01)	1852	10.9	11.20 (0.54)	13.37 (0.01)	2579	7.9	8.22 (0.32)
30% HPβCD + HPMC	3.21 (0.01)	616	32.6	16.01 (1.85)	6.33 (0.01)	1220	16.5	9.50 (0.37)

Mean values and, in parentheses, standard deviations ($n = 4$).

drug in the loading solution. Since estradiol solubility is 5.17 mg/l (obviously in the suspension this concentration should remain constant) and the hydrogels can uptake 6–10 times its weight in water (6–10 ml/g), the maximum amount of estradiol that could be loaded in the aqueous phase of the hydrogel should be in the range 0.031–0.051 mg/g. This value is of a mean of 500 times lower than that presented by the hydrogels. Therefore, most drug has to be hosted by the cyclodextrin units. In the hydrogels, cyclodextrin unit–estradiol molar ratio ranged between 4.7 and 13.6, except for HPβCD(30%)-co-HPMC(0.25%) hydrogel (Table 4).

To estimate the affinity of the drug for the network, the partition coefficient, $K_{N/W}$, between the polymer network and the drug loading solution was calculated as follows [37]:

$$\text{Loading (total)} = [(V_s + K_{N/W}V_p)/W_p] \times C_0 \quad (6)$$

where V_p is the volume of dried polymer and the other symbols maintain the meaning of Eq. (5). The values of $K_{N/W}$ (Table 4) clearly prove that all MβCD hydrogels and the autoclaved HPβCD hydrogels present a remarkably high affinity for estradiol. A strong correlation between the $K_{N/W}$ values and the $K_{1:1}$ stability constant was observed (Fig. 3). This finding clearly proves the essential role of the cyclodextrins in the uptake of estradiol.

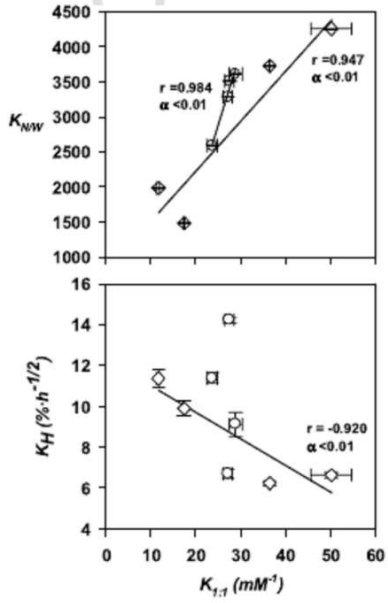


Fig. 3. Dependence of network/water partition coefficient ($K_{N/W}$) and of the release rate constant (K_H) of estradiol for HPβCD- (open diamonds) and MβCD-based hydrogels (open circles) on the estradiol–cyclodextrin stability constants ($K_{1:1}$).

3.2.3. Estradiol release

Fig. 4 shows the estradiol release profiles in SDS 0.3% solution, which is the medium recommended in USP27 for low solubility drugs. Although all hydrogels were able to sustain the release for several days, remarkable differences in the kinetics were observed. In general, hydrogels containing HPMC released the drug faster; the highest release rates being observed for HPβCD hydrogels loaded without applying autoclaving. The release rate constants obtained by fitting Eq. (4) ($r^2 > 0.99$) to the HPβCD hydrogels data showed a strong negative correlation with the estradiol–cyclodextrin stability constants estimated from the solubility diagrams (Fig. 3). That is to say, the greater the affinity, the lower the release rate. MβCD hydrogels showed a lag time of 45–60 min, which is in agreement with the high stability constant values obtained for this cyclodextrin variety. Once the release started, no correlation between the release rate constants and the stability constants was found, because under all conditions tested the stability constant values were similar. The faster estradiol release observed for the autoclaved hydrogel consisting of MβCD(20%)-co-HPMC(0.25%), compared to the hydrogel prepared without HPMC or to the hydrogel consisting of MβCD(25%)-co-HPMC(0.25%), can be explained by its lowest proportion in cyclodextrin by weight unit of dry hydrogel. In summary, these findings highlight that the drug-cyclodextrin complexation determines the affinity of

UNCORRECTED PROOF

Please cite this article in press as: C. Rodriguez-Tenreiro et al., Estradiol sustained release from high affinity cyclodextrin hydrogels, Eur. J. Pharm. Biopharm. (2006), doi:10.1016/j.ejpb.2006.09.003

EJPB 9866 ARTICLE IN PRESS No. of Pages 8, Model 5+
11 October 2006 Disk Used Suba (CE) / Karthikeyan (TE)

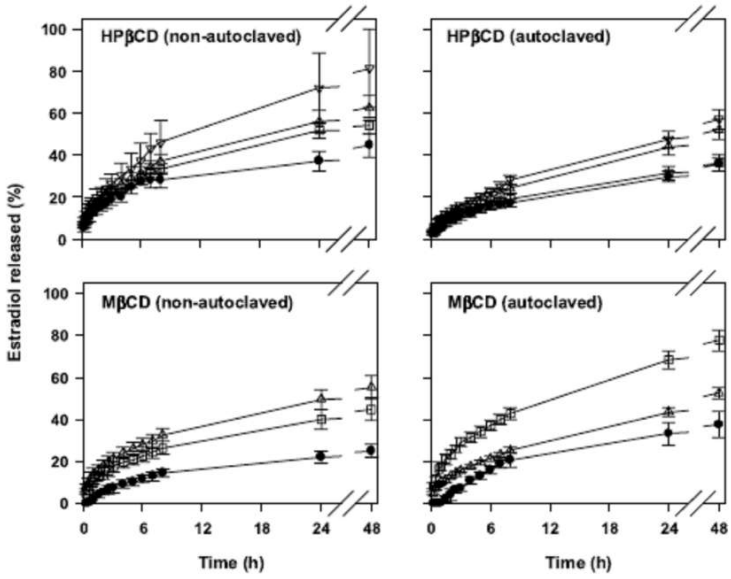


Fig. 4. Estradiol release profiles from HPβCD or MβCD hydrogels prepared with 20% cyclodextrin (●), 20% cyclodextrin–0.25% HPMC (□), 25% cyclodextrin–0.25% HPMC (Δ), and 30% cyclodextrin–0.25% HPMC (▽), which were previously loaded in aqueous suspensions of estradiol.

the drug for the hydrogel and plays the main role in the control of the release.

4. Conclusions

Estradiol presents a higher affinity for βCD, MβCD and SBβCD than for HPβCD. The affinity for this last cyclodextrin is greatly enhanced when HPMC (0.25%) is added to the medium and the system is autoclaved. The application of a one-step cross-linking with EGDE, under mild conditions, enabled the formation of MβCD and HPβCD hydrogels. By contrast, the low solubility of βCD and the high anionic character of SBβCD hindered obtaining hydrogels. Hydrogels can absorb 4–10 times their weight in water, depending on their cyclodextrin content and hydrophilicity. The estradiol loading was driven by the interaction of the drug with the cyclodextrin network, and a positive correlation was found between the stability constant, estimated from the phase solubility diagrams, and the network/water partition coefficients of estradiol. The high loading ability of the hydrogels may make the incorporation of a therapeutic dose of estradiol in a small piece of hydrogel possible, the release being sustained for several days owing to the affinity of the cyclodextrin for the drug.

Acknowledgements

This work was financed by the Xunta de Galicia (PGIDIT03PXIC20303PN, PGIDIT04BTF203011PR) and the Ministerio de Educación y Ciencia and FEDER, Spain (SAF2005-01930; RYC2001-8). The authors are grateful to Janssen Pharmaceutica Products, Laisa-Roquette and CyDex for providing free samples of cyclodextrin.

References

[1] A.D. Woolfson, R.K. Malcolm, R. Gallagher, Drug delivery by the intravaginal route, Crit. Rev. Ther. Drug 17 (2000) 509–555.
[2] I.S. Fraser, D. Mansour, Delivery systems for hormone replacement therapy, Expert Opin. Drug Deliv. 3 (2006) 191–204.
[3] S.C. Sweerman, Martindale: The Complete Drug Reference, 33rd ed., Pharmaceutical Press, London, 2002.
[4] H. Kuhl, Pharmacology of estrogens and progestagens: influence of different routes of administration, Climateric 8 (2005) 3–63.
[5] M.E. Johnson, D. Blankschtein, R. Langer, Permeation of steroids through human skin, J. Pharm. Sci. 84 (1995) 1144–1146.
[6] M.T. Sheu, S.Y. Chen, L.C. Chen, H.O. Ho, Influence of micelle solubilization by tocopheryl polyethylene glycol succinate (TPGS) on solubility enhancement and percutaneous penetration of estradiol, J. Control. Rel. 88 (2003) 355–368.
[7] D. Monti, M. Najarro, R. Chetoni, S. Burgalassi, M.F. Saettone, E. Boldrini, Vehicle and enhancer effects on transdermal permeation of estradiol from gel formulations: evaluation in vitro, J. Drug Deliv. Sci. Technol. 15 (2005) 469–473.
[8] M. Kitano, Y. Maitani, N. Takayama, T. Nagai, Buccal absorption through golden hamster cheek pouch in vitro and in vivo of 17 β-estradiol from hydrogels containing three types of absorption enhancers, Int. J. Pharm. 174 (1998) 19–28.
[9] G. Dezarnaulds, I.S. Fraser, Vaginal ring delivery of hormone replacement therapy – a review, Expert Opin. Pharmacother. 4 (2003) 201–212.

Please cite this article in press as: C. Rodriguez-Tenreiro et al., Estradiol sustained release from high affinity cyclodextrin hydrogels, Eur. J. Pharm. Biopharm. (2006), doi:10.1016/j.ejpb.2006.09.003

EJPB 9866 ARTICLE IN PRESS No. of Pages 8, Model 5+
11 October 2006 Disk Used Suba (CE) / Karthikeyan (TE)

[10] R. Barreiro-Iglesias, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, Controlled release of estradiol solubilized in carbopol/surfactant aggregates, J. Control. Rel. 93 (2003) 319–330.
[11] S. Peltola, P. Saarinen-Savolainen, J. Kiesvaara, T.M. Suhonen, A. Urtti, Microemulsions for topical delivery of estradiol, Int. J. Pharm. 254 (2003) 99–107.
[12] L. Lehman, S. Simes, J.A. Simon, Bio-E-Gel(TM), a transdermal estradiol gel formulation for the treatment of postmenopausal vasomotor symptoms, Menopause 12 (2005) 814.
[13] N.A. Peppas, K.M. Wood, J.O. Blanchette, Hydrogels for oral delivery of therapeutic proteins, Expert Opin. Biol. Ther. 4 (2004) 881–887.
[14] J.A. DiRamio, W.S. Kisaalita, G.F. Majetich, J.M. Shimkus, Poly(ethylene glycol) methacrylate/dimethacrylate hydrogels for controlled release of hydrophobic drugs, Biotechnol. Prog. 21 (2005) 1281–1288.
[15] L. Bromberg, M. Temchenko, T.A. Hatton, Smart microgel studies. Polyelectrolyte and drug-absorbing properties of microgels from polyether-modified poly(acrylic acid), Langmuir 19 (2003) 8675–8684.
[16] Y.Y. Liu, X.D. Fan, H. Hu, Z.H. Tang, Release of chlorambucil from poly(*N*-isopropylacrylamide) hydrogels with β-cyclodextrin moieties, Macromol. Biosci. 4 (2004) 729–736.
[17] YY. Liu, XD. Fan, T. Kang, L. Sun, A cyclodextrin microgel for controlled release driven by inclusion effects, Macromol. Rapid Commun. 25 (2004) 1912–1916.
[18] D. Kanjickal, S. Lopina, M.M. Evancho-Chapman, S. Schmidt, D. Donovan, Improving delivery of hydrophobic drugs from hydrogels through cyclodextrins, J. Biomed. Mater. Res. 74A (2005) 454–460.
[19] K. Uekama, Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation, Chem. Pharm. Bull. 52 (2004) 900–915.
[20] Y.Y. Liu, X.D. Fan, Y.B. Zhao, Synthesis and characterization of a poly(*N*-isopropylacrylamide) with β-cyclodextrin as pendant groups, J. Polym. Sci. A Polym. Chem. 43 (2005) 3516–3524.
[21] V. Stella, R.A. Rajewski, Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery, Pharm. Res. 14 (1997) 556–567.
[22] V.J. Stella, V.M. Rao, E.A. Zannou, V. Zia, Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes, Adv. Drug Deliv. Rev. 36 (1999) 3–16.
[23] K. Uekama, F. Hirayama, T. Irie, Application of cyclodextrins in pharmaceutical preparations, Drug Target. Deliv. 3 (1994) 411–445.
[24] U. Siemoneit, C. Schmitt, C. Alvarez-Lorenzo, A. Luzardo, F. Otero-Espinar, A. Concheiro, J. Blanco-Mendez, Acrylic/cyclodextrin hydrogels with enhanced drug loading and sustained release capability, Int. J. Pharm. 312 (2006) 66–74.
[25] C. Rodriguez-Tenreiro, C. Alvarez-Lorenzo, A. Rodriguez-Perez, A. Concheiro, J.J. Torres-Labandeira, New cyclodextrin hydrogels cross-linked with diglycidylethers with a high drug loading and controlled release ability, Pharm. Res. 23 (2006) 121–130.
[26] T. Loftsson, N. Bodor, Effects of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on the aqueous solubility of drugs and transdermal delivery of 17-beta-estradiol, Acta Pharm. Nord. 1 (1989) 185–194.
[27] H. Fridriksdottir, T. Loftsson, J.A. Gudmundsson, G.J. Bjarnason, M. Kjeld, T. Thorsteinsson, Design and in vivo testing of 17 beta-estradiol-HPbetaCD sublingual tablets, Pharmazie 51 (1996) 39–42.
[28] Y.J. Deng, M.J. Huang, Capillary electrophoretic separation and theoretical study of inclusion complexes of sulfobutyl ether beta-cyclodextrin with estrogens, Int. J. Quantum Chem. 100 (2004) 746–752.
[29] U. Werner, C. Damge, P. Maincent, R. Bodmeier, Properties of in situ gelling nasal inserts containing estradiol/methyl beta-cyclodextrin, J. Drug Deliv. Sci. Technol. 14 (2004) 275–284.
[30] T. Higuchi, K.A. Connors, Phase-solubility techniques, in: C.N. Reilly (Ed.), Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation, vol. 4, Wiley-Interscience, New York, 1965, pp. 117–212.
[31] T. Loftsson, D. Hreinsdóttir, M. Másson, Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs, Int. J. Pharm. 302 (2005) 18–28.
[32] S.H. Gehrke, D. Biren, J.J. Hopkins, Evidence for Fickian water transport in initially glassy poly(2-hydroxyethyl methacrylate), J. Biomater. Sci. Polymer Edn. 6 (1994) 375–390.
[33] W.I. Higuchi, Analysis of data on the medicament release from ointments, J. Pharm. Sci. 51 (1962) 802–804.
[34] J. Nishijo, S. Morjyama, S. Shiota, M. Kamigauchi, M. Sugiura, Interaction of heptakis (2,3,6-tri-*O*-methyl)-beta-cyclodextrin with cholesterol in aqueous solution, Chem. Pharm. Bull. 52 (2004) 1405–1410.
[35] G. Piel, M. Piette, V. Barillaro, D. Castagne, B. Evrard, L. Delattre, Betamethasone-in-cyclodextrin-in-liposome: the effect of cyclodextrins on encapsulation efficiency and release kinetics, Int. J. Pharm. 312 (2006) 75–82.
[36] T. Loftsson, M. Másson, J.F. Sigurjónsdóttir, Methods to enhance the complexation efficiency of cyclodextrins, STP Pharma Sci. 9 (1999) 237–242.
[37] S.W. Kim, Y.H. Bae, T. Okano, Hydrogels: swelling, drug loading and release, Pharm. Res. 9 (1992) 283–290.

UNCORRECTED PROOF

Please cite this article in press as: C. Rodriguez-Tenreiro et al., Estradiol sustained release from high affinity cyclodextrin hydrogels, Eur. J. Pharm. Biopharm. (2006), doi:10.1016/j.ejpb.2006.09.003

INTERPENETRATING CARBOPOL-CYCLODEXTRIN HYDROGELS FOR DRUG DELIVERY

Enviado para su publicación

Interpenetrating Carbopol-Cyclodextrin Hydrogels for Drug Delivery §

*Carmen Rodriguez-Tenreiro, Laura Diez-Bueno, Angel Concheiro, Juan J. Torres-Labandeira and Carmen Alvarez-Lorenzo**

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela, Spain

§ The work described in this paper is the subject of patent applications filed by the University of Santiago de Compostela

RECEIVED DATE (to be automatically inserted after your manuscript is accepted if required according to the journal that you are submitting your paper to)

TITLE RUNNING HEAD. Interpenetrating Carbopol-Cyclodextrin Hydrogels.

CORRESPONDING AUTHOR FOOTNOTE. *Corresponding author. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela, Spain. Address: Phone: 34981563100 (ext. 14876). E-mail: ffrusdog@usc.es.

ABSTRACT

Cross-linking of hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPβCD) with ethyleneglycol diglycidylether (EGDE) in carbopol microgels dispersions enables the synthesis of interpenetrating networks (IPNs) in a single step under mild conditions. The IPNs were characterized regarding their swelling, viscoelasticity, texture, bioadhesion properties, and drug loading and release performance. An increase in carbopol content from 0.2 to 1% caused a decrease of the hardness and compressibility of the IPNs and an increase in the bioadhesion force. The carbopol network also provided the IPNs with pH-responsive swelling behaviour. Estradiol and ketoconazole, which form complexes with HPβCD in solutions containing or not carbopol, were used as representatives of BCS Class 2 drugs for the loading and release studies. IPNs were loaded by immersion in drug suspensions and some of them were autoclaved. The autoclaving enhanced by a 50% the amount taken up by both control HPβCD hydrogel and the IPNs, which is in agreement with the results of the phase diagram solubility. IPNs prepared with 0.8% or 1.0% carbopol dispersions showed the highest loading due to their greater swelling degree and, consequently, mesh size. The total amount of drug loaded by the IPNs greatly exceeded (by up to 200-fold) the amount that can be dissolved in the aqueous phase, which highlights the main role of drug complexation with the cross-linked cyclodextrins. The affinity of the drug for the cyclodextrin also contributed to sustain the release for several days; the process being speeded up as the content in carbopol of the IPNs raised.

Introduction

The active control of the site and the kinetics of drug release and the improvement of the stability prior to delivery to the target are common aims in the design of efficient drug delivery systems. To accomplish these features, every day more sophisticated devices are required, which demand materials able to perform specific functions. The short list of approved excipients usually does not meet the growing demands. Therefore, the functionalization of polymeric excipients, through the modification of their chemical structure, is attracting much attention.[1-3] However, the use of new or chemically-modified materials is limited by biocompatibility and toxicity concerns. Additionally, a specific formulation usually requires several features that can hardly be achieved with a single excipient.

Composites obtained by blending of well-characterized polymers possessing different functionalities may enable the achievement of the required performance, dodging regulatory issues. Interpenetrating networks (IPNs) integrate in a single and physically stable material the functions of different polymers. An IPN is an assembly of two cross-linked polymers, at least one of which is synthesized and cross-linked in the presence of the other. As a difference from the copolymerization, which leads to a new chemical entity and does not ensure the maintenance of the functions of each polymer as when synthesized separately, the interpenetration may provide materials that combine the properties of both components in a tunable way to fulfill specific applications.[4] IPNs made of natural or synthetic polymers have been already shown advantageous for a range of biomedical applications, comprising environmentally-sensitive drug release and extracelular matrices for tissue engineering.[5-7]

Poly(acrylic acid) (PAA) is particularly useful for the development of hydrogels for site-specific or feedback-regulated drug delivery.[5] The presence of carboxylic acid groups (pKa 6.0 ± 0.5) provides these systems with pH-responsiveness and mucoadhesion properties.[8] However, the ability of PAA hydrogels to load poorly-soluble drugs is limited. On the other hand, cross-linked cyclodextrins are particularly suitable to efficiently host a variety of drugs that can form inclusion complexes; the sensitiveness of the network to the environmental conditions being practically null.[9-12] It has been

recently shown that the interpenetration of polycyclodextrin chains in stimuli-responsive networks, such as those based on poly(methacrylic acid)[13] or poly(N-isopropylacrylamide),[14] enables the control of drug release to be driven, not only by the phase-volume transition, but also by the complexation/dissociation process. Nevertheless, the improvements in the loading/release performance are limited and the procedures for preparing the interpenetrating networks are complex.

The present work focuses on the preparation and characterization of interpenetrating hydrogels comprising Carbopol® 71G (i.e. loosely cross-linked PAA microgels) and hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPβCD) networks with the aim of combining in a single composite material the pH-responsiveness and mucoadhesive properties of carbopol[15-17] and the loading capability of cross-linked cyclodextrins,[12,18] achieving an optimized material for drug delivery. Both carbopol and HPβCD belong to Category 1 GRAS (generally recognized as safe) materials, are non-sensitizing and routinely administered in buccal, peroral, ophthalmic, nasal, vaginal, and rectal dosage forms.[15,19] HPβCD is also approved for the parenteral route.[11,20] Estradiol and ketoconazole were used as model of BCS Class II drugs.[21,22] As a first step, the influence of carbopol on the complexation of estradiol or ketoconazole with HPβCD in aqueous solution was elucidated. Then, IPNs were prepared with different carbopol:HPβCD proportions by threading of the growing cyclodextrin network through the preformed carbopol microgels. In this way the cyclodextrin network immobilizes the microgels preventing their leaking from the system, without needing further cross-linking of the acrylic component. Then, their swelling, mechanical and bioadhesive properties and drug loading/release behaviour were evaluated in order to elucidate the potential of the IPNs as platforms for drug delivery.

Materials and Methods

Materials. HPβCD of D.S. 4.6 was from Janssen Pharmaceutische (Belgium); Carbopol® 71 G was supplied by Noveon Inc. (Cleveland OH, USA); 17β-estradiol and sodium dodecylsulfate (SDS) were from Sigma-Aldrich (Spain); ethyleneglycol diglycidylether (EGDE) (50% w/w in water) was from Fluka Chemie GmbH (Germany); ketoconazole was from Guinama (Spain). Purified water with a

resistivity above 18.2 MΩ·cm^{-1} was obtained by reverse osmosis (MilliQ®, Millipore Spain). All other reagents were of analytical grade.

Solubility studies. HPβCD aqueous solutions (5 ml), with or without 0.05% w/v carbopol, were added to ampoules containing 20 mg of estradiol or ketoconazole. For this last drug, carbopol systems previously neutralized with tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS, final pH 8) were also assayed. Some suspensions were autoclaved (Raypa AES-1219, Spain) at 121ºC for 20 min. The autoclaved and non-autoclaved suspensions were shaken at 25ºC and 50 rpm for 5 days, and then filtered through 0.22 μm cellulose acetate membranes (Millipore®, Irlanda). Estradiol concentration was determined by UV spectrophotometry (Agilent 8453, Germany) at 280 nm, and ketoconazole at 226 nm. All experiments were carried out in quadruplicate.

The apparent affinity constants of the 1:1 drug:cyclodextrin complexes were estimated from the slope of the linear part of the diagrams using the expression:[23]

$$K_{11} = \frac{m}{S_0 (1-m)} \qquad \text{Eq. 1}$$

where m is the slope of the plot and S_0 is the drug solubility in water.[24] The ratio between free and complexated cyclodextrin molecules in solution was directly estimated from the solubility diagrams assuming that the stoichiometry of the complexes is 1:1.

Synthesis of cyclodextrin hydrogel and IPNs. HPβCD (20% w/v) solutions were prepared in freshly prepared 0.2M KOH solution. The solutions were divided in 5 ml portions and carbopol was added to some up to a final concentration of 0.2, 0.4, 0.8 or 1.0% w/v. Once homogenized, EGDE (2 ml of 50% w/w water solution) was added to each dispersion and stirred for two minutes at 20ºC. The systems were immediately transferred to test tubes (8.6 mm internal diameter), which were hermetically closed and kept at 50ºC for 12 h. After cooling down, the hydrogels were carefully removed from the moulds and immersed in ultrapure water for 12 h to swell. Then, they were transferred to a 10 mM HCl solution for 12 hours to neutralize the alkaline medium and washed with water. Finally, cylindrical pieces of each gel (4-5 mm thickness) were cut and maintained in water until use.

Hydrogel characterization

Swelling studies. Dry samples of each hydrogel were immersed in 10 ml of water, 0.1M HCl or 0.3% SDS and weighed at pre-established time intervals. The kinetics of medium uptake was characterized by fitting the data obtained, up to 60% of the final content in water, to the following equation:[25]

$$\frac{W_t - W_0}{W_\infty - W_0} = K_w \times t^{0.5} \qquad \text{Eq. 2}$$

where W_0 is the weight of the dried hydrogel, W_t is the weight of the hydrogel at time t after immersion in the swelling medium, W_∞ the weight of the fully swollen hydrogel, and K_w is a rate constant. The equilibrium degree of swelling was estimated as follows:

$$Q = (W_\infty - W_0)/W_0 \qquad \text{Eq. 3}$$

Scanning electron microscopy. Freeze-dried swollen hydrogels (frozen in liquid nitrogen and freeze-dried in a Labconco apparatus for 48 hours) were mounted after transversal cut on double-sided tape on aluminium stubs and sputter-coated with gold/palladium. 1.0% carbopol dispersions were also subjected to the same treatment. Micrographs were taken at appropriate magnification in a SEM (LEO-435VP, Leo Electron Microscopy, Cambridge, UK).

Viscoelasticity. The loss (G´´) and storage (G´) moduli of the hydrogels were evaluated in triplicate in a Rheolyst AR-1000N rheometer (TA Instruments, New Castle DE, USA) equipped with an AR2500 data analyzer, a Peltier plate, and a plate-type geometry (4 cm diameter). The tests were carried out at 25ºC, from 0.05 to 50 rad/s, applying 0.1 Pa shear strength.

Hardness and compressibility. These mechanical properties were determined using a TA-TX Plus Texture Analyzer (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, UK) fitted with a cylindrical aluminum probe (Ref. P/20). A hydrogel disc of 6 mm thickness was placed on the platform and the probe was compressed into the sample at a defined rate of 1 mm/s and to a defined depth (3 mm). Then, the probe was removed at 2 mm/s and the recovery of the sample was also monitored. Four replicate analysis of each sample were performed at room temperature. The hardness was estimated as the maximum

resistance to compression (i.e. the peak value in the force-distance plot), and the compressibility was quantified as the work done in the compression (i.e. the area under the force-distance plot).[26] The modulus of deformability, ED, was estimated from the initial linear portion of the force-distance plot, converting the force to a true stress using the expression:

$$\sigma_T = \frac{F(t)[h_0 - \Delta h]}{A_0 h_0} \qquad \text{Eq. 4}$$

and the distance to Hencky´s strain as follows:

$$\varepsilon_T = \ln\left(\frac{h_0}{h_0 - \Delta h}\right) \qquad \text{Eq. 5}$$

where h_0 is the original height of sample, Δh is the change in height, F(t) the compressive force at time t, and A_0 the original cross-sectional area.[27]

In vitro bioadhesion assay. The bioadhesive properties of each water-swollen hydrogel were evaluated using a TA-TX Plus Texture Analyzer (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, UK). The hydrogel disc was glue (using Loctite® SuperGlue3, Munich, Germany) on the lower face of a cylindrical aluminium probe (Ref. P/20), whilst a piece of goat tanned leather was fixed on the lower platform.[16] The hydrogel disc was allowed to contact the leather surface and a downward force (0.49 N) was applied for 10 min. The probe was the elevated at 5 mm/sec, and the bioadhesion of each formulation was determined as the work involved in the detachment. The experiments were carried out in triplicate.

Drug loading. Cylindrical pieces of each hydrogel (4-5 mm thickness) were placed in vials containing aqueous suspensions of estradiol (15 mg in 10 ml) or ketoconazole (25 mg in 12 ml), which were put in a bath at 25ºC and subjected to 50 oscillations per minute for one week; some being firstly autoclaved for 20 min at 121 ºC. To determine the amount loaded, some hydrogels were immersed in 0.3% w/v SDS solution (15 ml) that were replaced every second day, for approximately one week, and the drug concentration in the washing medium was determined spectrophotometrically at 280 nm for estradiol or 226 nm for ketoconazole. The amount of drug loaded was estimated as the total amount of

drug released to the washing medium. Experiments were carried out in quadruplicate. The amount loaded just by a simple equilibrium between the aqueous phase of the network and the loading solution was estimated using the following equation:[28]

$$Loading\ (aqueous\ phase) = (Vs/Wp)xC_0 \qquad \text{Eq. 6}$$

where Vs is the volume of water sorbed by the hydrogel, Wp the dried hydrogel weight, and C_0 the concentration of drug in the loading solution.

The affinity of the drug for the network was estimated as the partition coefficient, K_{NW}, between the polymeric networks and the drug loading solution, as follows:[28]

$$Loading\ (total) = [(Vs + K_{NW}Vp)/Wp]xC_0 \qquad \text{Eq. 7}$$

where Vp is the volume of dried polymer and the other symbols maintain the meaning of Eq. 6. The density of the dried IPNs was assumed to be 1 g/ml.

Drug release. Drug-loaded hydrogels were rinsed with water and immersed in 0.3% w/v SDS solution at room temperature. The volume of the release medium was 15 ml for estradiol and 50 ml for ketoconazole. The drug concentration was measured spectrophotometrically in periodically taken samples and again placed in the same vessel, so that the liquid volume was kept constant. The release profiles in the first 8-hours period were characterized by fitting the Higuchi equation:[29]

$$M_t/M_\infty = K_H t^{1/2} \qquad \text{Eq. 8}$$

where Mt and M_∞ represent the amounts of drug released at time t and after infinite time, respectively. The experiments were carried out in triplicate.

Results and Discussion

Drug:HPβCD complexes in solution

HPβCD enables effective complexation of estradiol[30] and ketoconazole.[22,31,32] Complexation ability and, consequently, solubilizing efficiency are usually enhanced in the presence of hydrophilic polymers at low concentrations and by the heating treatment of the systems.[33] Since there is no information

regarding the influence of carbopol and/or autoclaving on the complex formation of estradiol or ketoconazole, this task was tackled in first place.

Estradiol solubility diagrams obtained at 25ºC with HPβCD, both in the absence or in the presence of carbopol, were A_L type with a slope lower than 1, which is characteristic of the formation of 1:1 molar ratio complexes (Figure 1A). By contrast, autoclaved systems showed a negative deviation for high HPβCD concentrations, which could be related to the formation of supramolecular structures when the cyclodextrin concentration is above the critical associative value.[34] Autoclaving significantly contributed to solubilize estradiol in HPβCD solutions, enhancing the solubility from 100 to 170-fold in 1% HPβCD solutions. It has been previously reported that the effect of heating is particularly intense for extremely poorly-soluble drugs, owing to a temporal increase in drug solubility that enables drug molecules to occupy the cyclodextrin cavities.[34] In non-autoclaved systems one out of four molecules of HPβCD in solution formed a water-soluble complex with estradiol; this relation increased to one out of three cyclodextrins after autoclaving. The presence of carbopol did not modify, even applying autoclaving, the apparent affinity constants (Table 1).

Ketoconazole solubility diagrams in HPβCD solutions were also A_L type with a slope lower than 1, and autoclaving notably enhanced the solubility (Figure 1B). In the non-autoclaved systems, the presence of 0.05% carbopol caused a slight increase in drug solubility, which could be attributed to the decrease in the pH of the medium (3.9) or to an ionic interaction between the carboxylic acid groups of carbopol and this weak base drug. Ketoconazole has two pKa (6.51 and 2.94)[35] and its solubility strongly increases at pH below 4.[31] Although drug protonization makes complexation with cyclodextrin less favourable,[31] it was previously observed that carboxymethyl-β-cyclodextrin can interact with ketoconazole not only forming inclusion complex, but also through the carboxylic group, which allows uncomplexed drug associate with the complex.[32] The ionic association gains relevance in the pH range at which the carboxylic acid groups are deprotonated and the drug is ionized. A similar effect could occur by interaction with the carboxylic acid groups of carbopol. To elucidate the importance of this mechanism, the pH of the HPβCD/carbopol solution was adjusted with TRIS up to 8.0 to neutralize the

carboxylic acid groups of carbopol. Ketoconazole solubility in the neutralized HPβCD/carbopol solution was similar to that in the HPβCD solution (Figure 1B), which indicates that the contribution of carbopol to the drug solubilization is negligible. Since an acid catalyzed degradation of ketoconazole may occur in the solutions of low pH,[35] only the neutralized HPβCD/carbopol systems were autoclaved. Under these conditions, the ketoconazol solubility profile was superimposable to that obtained with the HPβCD alone solutions.

Therefore, although interactions between carbopol/HPβCD or carbopol/drug cannot be totally discarded,[36] carbopol microgels do not negatively interfere in the complexation of estradiol or ketoconazole with HPβCD.

Cyclodextrin:carbopol IPNs

Composition and Structure. Series of IPNs were prepared with different carbopol proportions (0.2-1%). The hydrosolubility of the cyclodextrin is a critical issue for hydrogel formation, since concentrated solutions are required for an effective intermolecular cross-linking. The range of HPβCD concentration that provide mechanically suitable hydrogels is quite short (14 to 30%); below 14% HPβCD, cross-linked networks are not formed; whilst above 30% the network is too brittle. Therefore, the solutions were prepared with 20% HPβCD. EGDE was chosen as a non-toxic cross-linking agent[37] because it can form ether bonds through its epoxy groups, under mild conditions, with the hydroxyl groups of HPβCD. At acid pH, EGDE could interact with the carboxylic acid groups of carbopol.[38] Since the formation of ether bonds with HPβCD is catalyzed by OH^- ions,[39] alkaline medium was chosen for obtaining HPβCD hydrogels, avoiding the covalent binding of the carbopol microgels. Since dried loosely cross-linked Carbopol® 71G microgels have a size of 2-7 μm, which is significantly enlarged when swelling in medium of pH above the pKa (6.0 ± 0.5), and the molecular weigh of PAA between adjacent cross-links is of hundreds of thousands, it is expected that the growing HPβCD chains can easily thread the microgels. Therefore, in the 0.2M KOH medium and at 50ºC, an IPN should be

formed by interpenetration of the carbopol microgels by the growing cyclodextrin cross-linked network, resulting in a true interpenetrating system from which the microgels cannot diffuse (Figure 2). Taking into account the proportion of EGDE, approximately the 60% of the cyclodextrin hydroxyl groups may participate in the cross-linking bridges;[39] the acrylic acid groups of carbopol microgels remaining unaltered.

Once obtained, the IPNs were washed to eliminate the alkali and the unreacted substances, if any, that could interfere in further experiments, and cut as disc of 4-6 mm thickness. All IPNs showed a smooth and continuous surface that does not lose material by disentanglement of the polymer chains, which suggests an adequate distribution of the components and an effective interpenetration of the networks. SEM images (Figure 3) show that the inner structure of the IPNs is more porous and regular than that of the HPβCD hydrogel. Carbopol microgels may serve as propagation guides for the growing of the HPβCD network; the fibrous structure of the IPNs resembling to some extent that of carbopol microgels.

Swelling behaviour. The swelling of dried IPNs was evaluated in water (pH 5.8), 0.1M HCl (pH 1.2) and 0.3% SDS solution (pH 7.8). Depending on the carbopol proportion, the IPNs exhibited important differences in the degree of swelling (Figure 4). Control HPβCD hydrogels, without carbopol, swelled to nearly the same extent in any of the media evaluated. The slightly greater degree of swelling when immersed in 0.3% SDS solution can be due to the sorption of the surfactant inside the network and to the subsequent increase in osmotic pressure owing to the sodium ions that accompany the surfactant.[40]

The greater the content in carbopol of the IPNs was, the higher the degree of swelling achieved and also the pH-responsiveness exhibited. These increases were especially remarkable for IPNs prepared with 0.8 or 1.0% carbopol. At these concentrations, the carbopol microgels should be very close and can even be themselves entangled. Therefore, the osmotic pressure and the electrostatic repulsion among the carboxylic groups prompt the entry of the outer solution in the IPN (Figure 2). These IPNs behave as superabsorbing systems, being able to uptake in few hours up to 20 or 40 times its weight of water or

SDS solution, respectively (Figure 4). By contrast, the degree of swelling in the strongly acid medium (pH << pKa) was significantly lower. These results confirm that the acrylic acid groups of carbopol microgels remain free, providing the IPNs with the pH-responsiveness.

Regarding the swelling kinetics, all IPNs showed a fast swelling in the first two hours and then the process became progressively slower. The equilibrium degree of swelling was reached at 8 hours. In all cases, the amount of sorbed solution depended linearly on $t^{1/2}$; i.e. Fickian behavior was maintained in spite of the swelling of the network.[25] The swelling rate constants (Table 2) indicate that water molecules, as well as other small size molecules, can easily penetrate the structure of the network.

Viscoelasticity. Once swollen in water, the IPNs showed viscoelastic behaviour with G´ and G´´ values in the range of 0.1 to 300 Pa; being in all cases G´ greater than G´´ as expected for a well-structured network (Figure 5). Similar values were previously found for HPβCD-co-hydroxypropyl methylcellulose hydrogels.[39] Below 1 rad/s, the values of both moduli were independent of the angular frequency, but beyond this frequency, a progressive raise in G´´ was observed. This could be related to a flow-induced change in the network structure. The control HPβCD hydrogel and the IPNs prepared with 0.2 and 0.4% carbopol exhibited the highest G´ and G´´ values in the whole range of angular frequencies evaluated. By contrast, IPNs prepared with 0.8 or 1.0% carbopol had almost one order of magnitude lower G´ and G´´ values, which means that carbopol microgels provide consistent IPNs with a greater flexibility. This effect is a consequence of the lower cross-linking degree of carbopol microgels, which they indeed were not cross-linked by EGDE, compared to that of the cyclodextrin network. Carbopol microgels are constituted by relatively long poly(acrylic acid) chains that can rotate and change their conformation almost freely. Therefore, the microgels can deform easier than the HPβCD network when an external force is applied. In fact the aqueous dispersions of 1% carbopol microgels behave as viscoelastic liquid with G´´ values above those of G´ at low angular frequencies.

Hardness and compressibility. Typical compression plots obtained for the water-swollen HPβCD hydrogel and IPNs are shown in Figure 6. In all systems, the force-distance curve registered when the force was applied was almost superimposable to that obtained during the removal of the probe (i.e. recovery). The hardness and compressibility of the IPN prepared with 0.2% carbopol were similar to that of the HPβCD hydrogel. As the proportion of carbopol increased, the values of both parameters progressively decreased (Table 3). The IPNs are viscoelastic rather than purely elastic and, consequently, the Young's modulus cannot be strictly calculated from the slope of the force-distance plot. Therefore, a modulus of deformability, ED, was estimated using the Hencky model, in which the true stress represents an adjustment of the engineering stress ($F(t)/A_0$) to account for cross-sectional area expansion of the deformed specimen.[41] ED is an index of the specimen stiffness and has been widely used for characterizing hydrogels and soft materials of varied nature.[27] A negative linear correlation was found between ED and the proportion of carbopol in the IPN (Table 3), which should be related to the spongy inner structure that the carbopol microgels provide to the IPNs (Figure 3). In any case, the ED values obtained were in the range of those found for common swollen hydrogels, such as those made of alginate,[42] N-isopropylacrylamide[43] or its copolymers with other acrylic monomers,[44] and acrylic semi-interpenetrating networks.[45] In sum, all HPβCD-carbopol IPNs, even those containing the highest proportion of carbopol, have the consistency required to be easily handled without risk of disintegration, but are also deformable enough to avoid the damage of the biological tissues if used as drug delivery platforms.

Bioadhesion studies. The bioadhesive properties of the IPNs were characterized as the work required to separate the IPN from a piece of tanned leather (Table 3). It has been previously demonstrated that he adhesion work results obtained with this substrate are closely correlated to those obtained with sublingual mucosa.[16] Therefore leather, which is commercially available and easy to handle, was used as a substitute of fresh animal tissue. The bioadhesive ability of the IPNs progressively raised as the content in carbopol increased up to reaching a maximum for the 0.8% carbopol IPN. The values of work

of bioadhesion are in the range of those of recognized mucoadhesive polymers, such as cellulose ethers, chitosan or sodium alginate.[17]

Estradiol loading. Owing to the low water solubility of both estradiol and ketoconazole, drug suspensions were prepared to load by immersion the swollen IPN disks. Some systems were autoclaved before equilibration at 25ºC. Control HPβCD hydrogel that underwent autoclaving loaded 50% more estradiol than the corresponding non-autoclaved one (Table 4). This effect is in agreement with the affinity constants obtained from the solubility diagrams (Figure 1, Table 1). Similarly, the autoclaving also promoted the loading in the IPNs. Those IPNs prepared with 0.2% or 0.4% carbopol dispersions showed a slightly lower loading than the control HPβCD hydrogel, whilst an opposite effect was observed for the IPNs made of 0.8% or 1.0% carbopol. Estradiol can be loaded in the IPNs by equilibrium of their aqueous phase with the surrounding medium or by complexation with the cyclodextrin units. As shown in Figure 4 the swelling degree of the IPNs is greater, but the HPβCD content in the IPNs (49.65-48.31% w/w of dried IPN) is slightly lower than in the control HPβCD hydrogel (50% w/w of dried hydrogel). The amount loaded just by a simple equilibrium between the aqueous phase of the network and the external loading medium was estimated using Eq. (6). Since estradiol solubility at 25ºC is 5.17 mg/l (obviously in the suspension this concentration remains constant) and the control HPβCD hydrogel can uptake 10 times its weight in water (10 ml/g), the maximum amount of estradiol that can be loaded in the aqueous phase of the HPβCD hydrogel is 0.052 mg/g. However, HPβCD hydrogel loaded 145 to 211 times more estradiol. Similar results were obtained for IPNs prepared with 0.2% or 0.4% of carbopol. Finally, IPNs containing 1.0% carbopol can load up to 0.10 mg/g in the aqueous phase, which is 121 to 139 times lower than the observed loading. Therefore, most estradiol is hosted by the cyclodextrin units.

The values of $K_{N/W}$ obtained applying Eq.(7) (Table 4) clearly prove that the IPN prepared with the greatest carbopol proportion can load estradiol with an affinity even greater than the control HPβCD

hydrogel does, disregarding the thermal treatment applied during loading. These results can be indirectly caused by carbopol that opens the mesh of the HPβCD network and enhances the swelling degree and flexibility of the IPNs, which facilitate the diffusion of the drug inside the network. In this way, steric impediments among the cyclodextrins themselves can vanish and each cyclodextrin cavity becomes more accessible to the drug. The remarkable decrease in vacant cyclodextrins in the IPN prepared with 1.0% carbopol supports this hypothesis (Table 4). It is important to notice that saturation was not reached and free cyclodextrin cavities still remain in the IPNs. Considering the high potency of estradiol, which is orally administered in doses of 1-2 mg/day or transdermally as patches of 2-5 mg/week,[21] the weight of a suitable formulation once estradiol is included in the IPN could be in the range of 100-200 mg.

Ketoconazole loading. As observed for estradiol, autoclaving notably enhanced the amounts loaded by the control HPβCD hydrogel and the IPNs (230-561%), and once again the maximum loading was observed for the IPN prepared with 1.0% carbopol (Table 5). The loading in absence of autoclaving was quite poor and most cyclodextrin units remained vacant. Once autoclaved, the number of cyclodextrin units per loaded ketoconazole molecule was of the same order of magnitude of that found for estradiol. Although ionic interactions between the drug and carbopol could play some role in the loading, this should be secondary compared to the main role of the drug-cyclodextrin complexation. The total amount of ketoconazole loaded by the HPβCD hydrogel was 28 times greater than that loaded in the aqueous phase of the HPβCD hydrogel (0.11 mg/g). Once autoclaved, this hydrogel loaded 160 times the amount contained in the aqueous phase. Similar ratios were obtained for IPNs prepared with 0.2% or 0.4% of carbopol. By contrast, IPNs containing 0.8 or 1.0% carbopol loaded 82-to-111-fold (non-autoclaved) and 200-to-286-fold (autoclaved) the amount contained in the aqueous phase, and showed the greatest K_{NW} values.

Drug release experiments. Figures 7 and 8 show the estradiol and ketoconazole release profiles in the 0.3% SDS micellar solution. The high affinity of estradiol for the cyclodextrin units provides both the HPβCD hydrogel and the IPNs with a remarkable ability to sustain the release; one week being required for a complete release of the dose. In the case of estradiol, the effect of applying autoclaving during loading was minor, and the IPNs prepared with the greatest carbopol proportion (i.e. those with the greatest degree of swelling) differentiate from the other IPNs showing the fastest release rate (Table 4).

The non-autoclaved IPNs showed a faster ketoconazole release than those autoclaved, especially those with the greatest carbopol proportion (Figure 8). This may be explained by the notably higher amount of drug that is hosted by the cyclodextrin cavities (Table 5), which makes the drug diffusion out of the network more difficult. In fact, a negative order correlation is observed between the ketoconazole release rates (Table 5) and the ketoconazol: HPβCD apparent affinity constants estimated from the solubility diagrams (Table 1). A similar behaviour was observed for HPβCD-co-hydroxypropylmethyl cellulose hydrogels.[12]

Conclusions

The new one-step method developed for obtaining cyclodextrin:carbopol IPNs comprises the selective cross-linking of HPβCD units by EGDE and the threading of the growing network through the carbopol microgels without altering their chemical structure. Carbopol microgels provide the IPNs with flexibility, bioadhesion, swelling ability and pH-responsiveness, whilst HPβCD network is mainly responsible for the drug loading and the control of the release. The IPNs properties can be modulated through an adequate selection of the proportion of both components, which makes them versatile biomaterials with a great potential as drug delivery systems.

Acknowledgment. This work was financed by the Ministerio de Educación y Ciencia and FEDER (SAF2005-01930), and the Xunta de Galicia (PGIDIT03PXIC20303PN, PGIDIT04BTF203011PR), Spain. Mr. J. Rui Peixoto and Ms. T.S. Leão Páscoa are acknowledged for helping with the ketoconazole experiments, and Prof. J.L. Gomez-Amoza for valuable comments on textural analysis. The authors are grateful to Janssen Pharmaceutische and to Noveon Inc. for providing free samples of cyclodextrins and carbopol, respectively

References

1 Bernkop-Schnurch, A. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2000**, 10, 1357-1366.

2 Signori, F.; Solaro, R.; Chiellini, E.; Lips, P.A.M.; Dijkstra, P.J.; Feijen, J. *Macromol. Symp.* **2003**, 197, 289-301.

3 Twaites, B.; Heras Alarcón, C.; Alexander, C. *J. Mater. Chem.* **2005**, 15, 441–455.

4 Gupta, N.; Srivastava, A.K. *Polym. Int.* **1994**, 35, 109-118.

5 Peppas, N.A.; Leobandung, W. *J. Biomat. Sci.-Polym. E.* **2004**, 15, 125-144.

6 Alvarez-Lorenzo, C.; Concheiro, A.; Dubovik, A.S.; Grinberg, N.V.; Burova, T.V.; Grinberg, V.Y *J. Control. Rel.* **2005**, 102, 629-641.

7 Rowe, S.L.; Stegemann, J.P. *Biomacromolecules* **2006**, 7, 2942-2948.

8 Dubolazov, A.V.; Nurkeeva, Z.S.; Mun, G.A.; Khutoryanskiy, V.V. *Biomacromolecules* **2006**, 7, 1637-1643.

9 Liu, Y.Y.; Fan, X.D.; Hu, H.; Tang, Z.H. *Macromol. Biosci.* **2004**, 4, 729-736.

10 Kanjickal, D.; Lopina, S.; Evancho-Chapman, M.M.; Schmidt, S.; Donovan, D. *J. Biomed. Mater. Res.* **2005**, 74A, 454-460.

11 Uekama, K. *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, 52, 900-915.

12 Rodriguez-Tenreiro, C.; Alvarez-Lorenzo, C.; Rodriguez-Perez, A.; Concheiro, A.; Torres-Labandeira, J.J. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (in press).

13 Liu, Y.Y.; Fan, X.D.; Kang, T.; Sun, L. *Macromol. Rapid Commun.* **2004**, 25 1912-1916.

14 Zhang, J.T.; Huang, S.W.; Gao, F.Z.; Zhuo, R.X. *Colloid Polym. Sci.* **2005**, 283, 461–464.

15 Guo, J.H.. *Drug Del. Technol.* **2003**, 3, 32, 34, 36.

16 Blanco-Fuente, H.; Vila-Dorrio, B.; Anguiano-Igea, S.; Otero-Espinar, F.J.; Blanco-Méndez, J. *Int. J. Pharm.* **1996**, 138, 103-112.

17 Grabovac, V.; Guggi, D.; Bernkop-Schnurch, A. *Adv. Drug Del Rev.* **2005**, 57, 1713-1723.

18 Liu, Y.Y.; Fan, X.D. *Biomaterials* **2005**, 26, 6367-6374.

19 Dittgen, M.; Durrani, M.; Lehmann, K. *S.T.P. Pharm. Sci.* **1997**, 7, 403–437.

20 Stella, V.J.; Rao, V.M.; Zannou, E.A.; Zia, V. *Adv. Drug Del. Rev.* **1999**, 36, 3-16.

21 Kuhl, H. *Climateric* **2005**, 8, 3-63.

22 Taneri, F.; Güneri, T.; Aigner, Z.N.; Kata, M. *J. Incl. Phenom. Macro.* **2003**, 47, 15-23.

23 Higuchi, T.; Connors, K.A. in: Reilly, C.N. (Ed.), Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation, vol. 4, Wiley-Interscience, New York, 1965, pp. 117–212.

24 Loftsson, T.; Hreinsdottir, D.; Masson, M. *Int. J. Pharm.* **2005**, 302, 18–28.

25 Gehrke, S.H.; Biren, D.; Hopkins, J.J. *Biomater. Sci. Polymer Edn.* **1994**, 6, 375–390.

26 Andrews, G.P.; Jones, D.S. *Biomacromolecules* **2006**, 7, 899-906.

27 Konstance, R.P. *J. Dairy Sci.* **1993**, 76, 3317-3326.

28 Kim, S.W.; Bae, Y.H.; Okano, T. *Pharm. Res.* **1992**, 9, 283–290.

29 Higuchi, W.I. *J. Pharm. Sci.* **1962**, 51, 802-804.

30 Werner, U.; Damge, C.; Maincent, P.; Bodmeier, R. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2004**, 14, 275–284.

31 Esclusa-Diaz, M.T.; Guimaraens-Mendez, M.; Perez-Marcos, M.B.; Vila-Jato J.L.; Torres-Labandeira, J.J. *Int. J. Pharm.* **1996**, 143, 203-210.

32 Taraszewska, J.; Kozbial, M. *J. Incl. Phenom. Macro.* **2005**, 53, 155-161.

33 Nakai, Y.; Yamamoto, K.; Terada, K.; Watanabe, D. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, 35, 4609-4615.

34 Loftsson, T.; Brewster, M.E. *J. Pharm. Sci.* **1996**, 85, 1017-1025.

35 Skiba, M.; Skiba-Lahiani, M.; Marchais, H.; Duclos, R.; Arnaud, P. *Int. J. Pharm.* **2000**, 198, 1-6.

36 Rodriguez-Tenreiro, C.; Alvarez-Lorenzo, C.; Concheiro, A.; Torres-Labandeira, J.J. *J. Thermal. Anal. Calor.* **2004**, 77, 403-411.

37 Poole, A.; van Herwijnen, P.; Weideli, H.; Thomas, M.C.; Ransbotyn, G.; Vance, C. *Food Addit. Contam.* **2004**, 21, 905-919.

38 Wu, S.; Jorgensen, J.D.; Skaja, A.D.; Williams, J.P.; Soucek, M.D. *Prog. Org. Coat.* **1999**, 36, 21-33.

39 Rodriguez-Tenreiro, C.; Alvarez-Lorenzo, C.; Rodriguez-Perez, A.; Concheiro, A.; Torres-Labandeira, J.J. *Pharm. Res.* **2006**, 23, 121–130.

40 Barreiro-Iglesias, R.; Alvarez-Lorenzo, C.; Concheiro, A. *Int. J. Pharm.* **2003**, 258, 179-191.

41 Mohsenin, N.N.; Mittal, J.P. *J. Texture Stud.* **1977**, 8, 395-408.

42 Lee, K.Y.; Rowley, J.A.; Eiselt, P.; Moy, E.M.; Bouhadir, K.H.; Mooney, D.J. *Macromolecules* **2000**, 33, 4291-4294.

43 Mounir, A.; Darwish, N.; Shehata, A. *J. Appl. Polym. Sci.* **2004**, 91, 3921-3926.

44 Harmon, M.E.; Kuckling, D.; Frank, C.W. *Langmuir* **2003**, 19, 10660-10665.

45 Siddhantaa, S.K.; Gangopadhyay, R. *Polymer* **2005**, 46, 2993–3000.

Table 1.- Apparent affinity constants, $K_{1:1}$ (mM^{-1}), of estradiol-cyclodextrin and ketoconazole-cyclodextrin inclusion complexes in solution at 25ºC and after autoclaving. Mean values and, in brackets, standard deviations (n=4). Estradiol and ketoconazole solubilities in water were estimated to be 0.019 mM and 0.020 mM.

Drug	Non-autoclaved		Autoclaved	
	HPβCD	HPβCD + Carbopol	HPβCD	HPβCD + Carbopol
Estradiol	17.3 (0.1)	16.6 (0.4)	17.7 (0.1)	17.1 (4.5)
Ketoconazole	4.3 (0.2)	3.3 (0.1)	32.4 (0.2)	33.9 (0.4)

Table 2.- Mean values of water sorption constants (Kw; $min^{-1/2}$) of the IPN systems at 25ºC. The variation coefficients were below 5%. (n=3)

Carbopol	Water		0.3% SDS		0.1M HCl	
(%)	Kw	r	Kw	r	Kw	r
0	0.067	0.972	0.072	0.985	0.071	0.989
0.2	0.059	0.916	0.059	0.981	0.085	0.910
0.4	0.087	0.990	0.061	0.987	0.099	0.999
0.8	0.047	0.866	0.054	0.997	0.072	0.998
1	0.051	0.965	0.059	0.969	0.067	0.974

Table 3. Mechanical and bioadhesive properties of the IPN systems; mean values and standard deviations in brackets (n=4).

Carbopol (%)	**Hardness (N)**	**Compressibility (N·mm)**	**Modulus of deformability (ED; kPa)**	**Bioadhesiveness (N·mm)**
0	2.980 (0.097)	2.933 (0.235)	13.99 (1.36)	0.007 (0.002)
0.2	3.084 (0.045)	2.537 (0.047)	9.64 (0.16)	0.014 (0.002)
0.4	1.745 (0.018)	1.558 (0.049)	7.58 (0.03)	0.033 (0.004)
0.8	1.163 (0.027)	1.037 (0.054)	4.65 (0.04)	0.070 (0.004)
1	0.703 (0.024)	0.555 (0.018)	2.13 (0.03)	0.045 (0.002)

Table 4.- Estradiol loaded (mg/ g dry IPN), IPN/water partition coefficient ($K_{N/W}$), cyclodextrin units available in the IPN per estradiol molecule loaded, and release rate constant (K_H; $h^{-1/2}$) values (r^2>0.99). Mean values and, in parenthesis, standard deviations (n = 4).

Carbopol	**Non-autoclaved**				**Autoclaved**			
(%)	**Load**	$K_{N/W}$	*CD units/ drug molecule*	K_H	**Load (mg/g)**	$K_{N/W}$	*CD units/ drug molecule*	K_H
0	7.3 (0.4)	1443 (58)	14.4	16.5 (0.6)	10.6 (1.5)	2110 (278)	9.9	17.2 (0.5)
0.2	5.6 (1.0)	1120 (178)	18.4	15.4 (0.8)	8.8 (1.6)	1744 (278)	11.8	13.4 (0.4)
0.4	6.9 (0.2)	1368 (18)	14.9	14.9 (0.6)	9.6 (0.7)	1914 (138)	10.7	13.0 (0.3)
0.8	8.4 (1.0)	1659 (172)	12.2	19.6 (1.3)	9.8 (0.8)	1947 (132)	10.4	18.8 (0.8)
1	12.9 (4.0)	2559 (753)	7.8	19.6 (1.9)	14.8 (2.6)	2934 (473)	6.8	21.6 (1.0)

Table 5.- Ketoconazol loaded (mg/ g dry IPN), IPN/water partition coefficient ($K_{N/W}$), cyclodextrin units available in the IPN per ketoconazol molecule loaded by the IPN, and release rate constant (K_H; $h^{-1/2}$) values. Mean values and, in parenthesis, standard deviations (n = 4).

Carbopol	**Non- autoclaved**				**Autoclaved**			
(%)	**Load**	$K_{N/W}$	*CD units/ drug molecule*	K_H	**Load**	$K_{N/W}$	*CD units/ drug molecule*	K_H
0	3.1 (1.0)	272 (81)	65.4	21.3 (1.3)	17.4 (2.2)	1571 (190)	11.6	12.9 (1.3)
0.2	4.7 (0.8)	417 (63)	42.8	20.7 (0.5)	17.6 (3.5)	1591 (308)	11.4	24.4 (5.8)
0.4	5.8 (0.9)	517 (72)	34.5	24.4 (0.6)	24.3 (2.0)	2197 (172)	8.2	29.2 (1.3)
0.8	15.4 (2.2)	1387 (187)	12.8	30.6 (1.2)	39.6 (4.0)	3589 (351)	4.9	20.2 (0.8)
1.0	19.0 (3.5)	1706 (297)	10.3	38.0 (0.8)	44.6 (2.1)	4032 (169)	4.4	22.9 (1.0)

Figure Captions

Figure 1.- Solubility diagrams of estradiol (A) or ketoconazole (B) in HPβCD (circles), pH 4 HPβCD /carbopol (0.05%) (squares), or pH 8 HPβCD /carbopol (0.05%) (triangles) solutions. Open symbols correspond to non-autoclaved samples, and solid symbols correspond to autoclaved samples.

Figure 2.- Schematic draw of the pH-sensitiveness of the HPβCD/ carbopol IPNs.

Figure 3.-TEM images of a cross-section of freeze-dried HPβCD/ 1% carbopol IPN (A), HPβCD hydrogel (B), and 1% carbopol system (C).

Figure 4.- Swelling profiles in water of dried HPβCD/ carbopol IPNs prepared from solutions containing 20% cyclodextrin and different proportions of carbopol.

Figure 5.- Dependence of the storage (G', open symbols) and loss (G'', full symbols) moduli of HPβCD/ carbopol IPNs.

Figure 6.- Force-displacement curves for swollen HPβCD/ carbopol IPNs prepared with different proportions of carbopol.

Figure 7.- Estradiol release profiles in 0.3% SDS solution from HPβCD/ carbopol IPNs that were previously loaded by immersion in a drug suspension applying or not autoclaving.

Figure 8.- Ketoconazole release profiles in 0.3% SDS solution from HPβCD/ carbopol IPNs that were previously loaded by immersion in a drug suspension applying or not autoclaving.

Figure 1

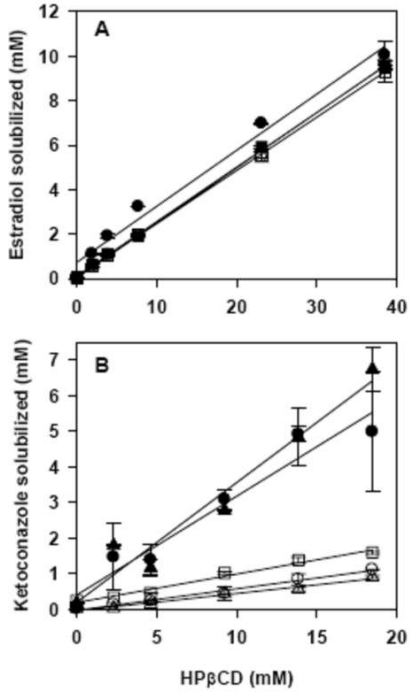

A
Estradiol solubilized (mM)
0
2
4
6
8
10
12
0
10
20
30
40
B
Ketoconazole solubilized (mM)
0
1
2
3
4
5
6
7
0
5
10
15
20
HPβCD (mM)

Figure 2

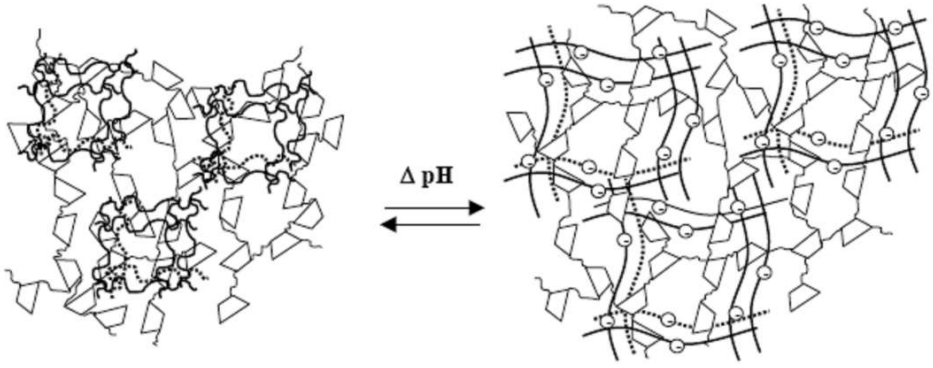


Figure 3

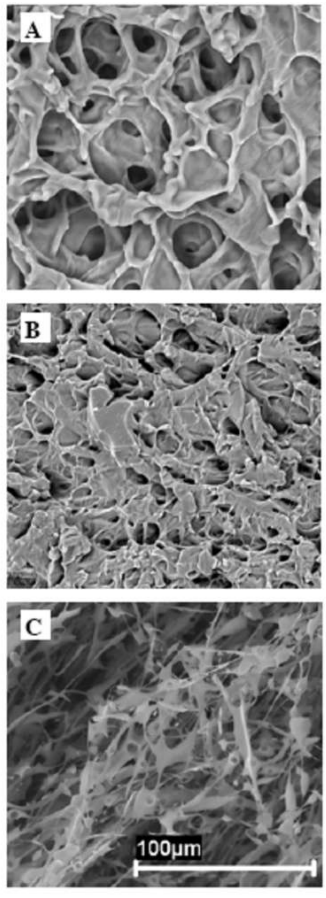


Figure 4

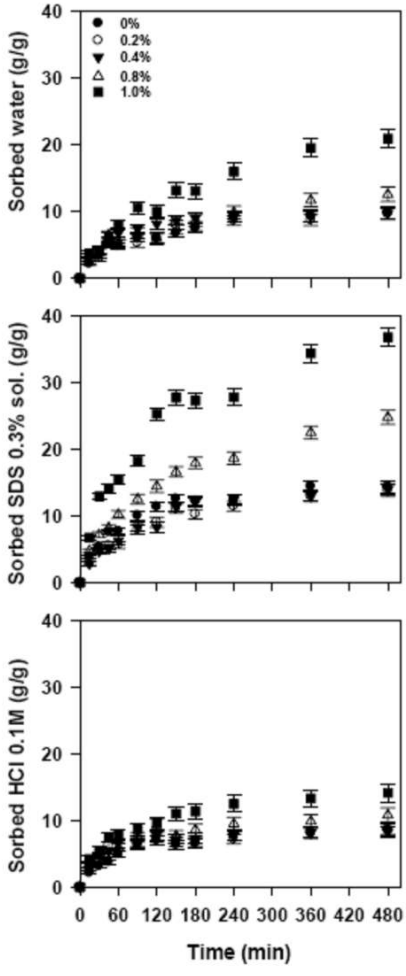

0%
0.2%
0.4%
0.8%
1.0%
Sorbed water (g/g)
Sorbed SDS 0.3% sol. (g/g)
Sorbed HCl 0.1M (g/g)
0
10
20
30
40
0 60 120 180 240 300 360 420 480
Time (min)

Figure 5

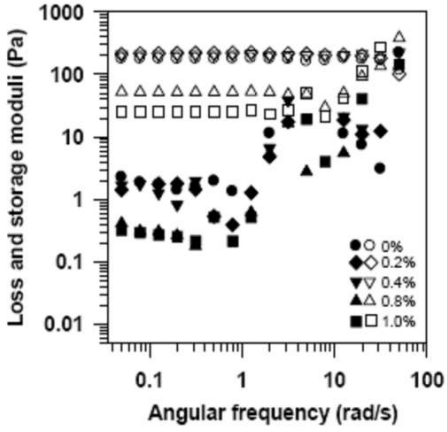

Loss and storage moduli (Pa)
1000
100
10
1
0.1
0.01
0.1
1
10
100
Angular frequency (rad/s)
0%
0.2%
0.4%
0.8%
1.0%

Figure 6

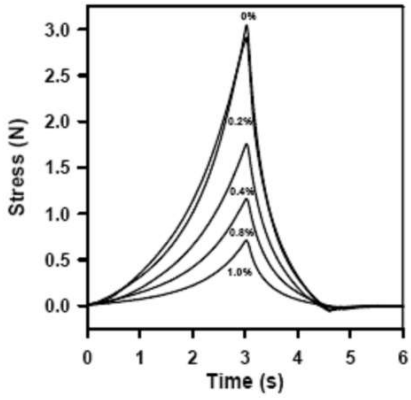


Figure 7

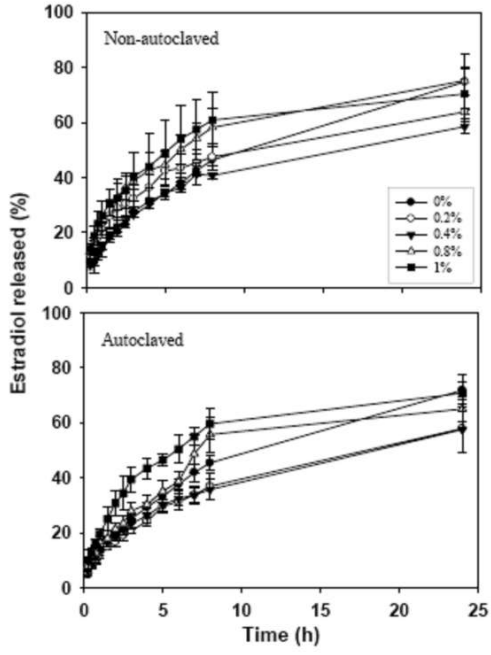
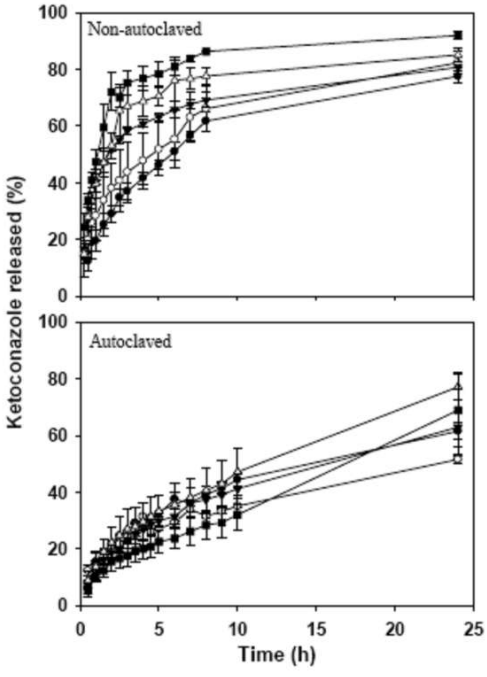

Non-autoclaved
Autoclaved
0%
0.2%
0.4%
0.8%
1%
Estradiol released (%)
Time (h)
0
20
40
60
80
100
0
5
10
15
20
25

Figure 8


Non-autoclaved
Autoclaved
Ketoconazole released (%)
Time (h)
0
20
40
60
80
100
0
5
10
15
20
25

4. Resultados y Discusión

De acuerdo con los objetivos que se declaran en el correspondiente apartado, el trabajo se ha centrado en el diseño y la evaluación de dos tipos de hidrogeles de ciclodextrinas:

a) Sistemas obtenidos por reticulación simultánea de ciclodextrinas con polisacáridos semisintéticos.

b) Sistemas preparados por reticulación de ciclodextrinas e interpenetración simultánea de sus entramados con microgeles de carbopol.

4.1. HIDROGELES OBTENIDOS POR RETICULACIÓN SIMULTÁNEA DE DERIVADOS DE β-CICLODEXTRINA (βCD) CON POLISACÁRIDOS SEMISINTÉTICOS UTILIZANDO ETILENGLICOLDIGLICIDILÉTER (EGDE) COMO AGENTE RETICULANTE

4. 1. 1. *PREPARACIÓN*

Para preparar los hidrogeles, se seleccionó el EGDE como agente reticulante de ciclodextrinas por su conocida funcionalidad y su baja toxicidad *(Poole y col., 2004).* Al igual que otros agentes que cuentan con grupos glicidiléter (también denominado epóxido, oxirano u óxido de alqueno; *Allinger y col., 1988*), el EGDE se ha utilizado previamente para obtener hidrogeles de distinta composición, haciéndolo reaccionar con polímeros preformados de naturaleza diversa que cuentan con grupos hidroxilo o amino en sus cadenas, tales como ADN o éteres de celulosa *(Amiya y Tanaka, 1987; Yui y col., 1992; Rodríguez y col., 2003).* Esta capacidad para formar uniones interpoliméricas a través de grupos hidroxilo, sugirió su interés potencial para co-reticular cadenas polisacarídicas con ciclodextrinas, sin necesidad de modificar sus estructuras introduciendo grupos reactivos mediante reacciones químicas previas *(Siemoneit y col., 2006).*

El EGDE requiere un medio de pH básico para reaccionar con los grupos hidroxilo de los anillos de glucopiranosa. El proceso se inicia con la apertura de sus anillos oxaciclopropano que es catalizada por los iones OH^- y, a continuación, se produce la reticulación *(Vollhart y Schore, 2003).* Dado que la reacción es endotérmica, para que trascurra a una velocidad adecuada es necesario aportar calor *(Rodríguez y col., 2003).* En nuestro caso, la preparación de los hidrogeles se llevó a cabo a 50ºC, temperatura a la que la ciclodextrina y los derivados celulósicos son estables en disolución y la reacción se completa en pocas horas.

Entre las ciclodextrinas naturales y los numerosos derivados semisintéticos que contienen grupos hidroxilo libres y que, por lo tanto, son susceptibles de reaccionar con

EGDE, para preparar los hidrogeles se seleccionaron inicialmente tres derivados de βCD: hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD), metil-β-ciclodextrina (MβCD) y sulfobutiléter-β-ciclodextrina (SBECD), que combinan un tamaño de cavidad adecuado para un gran número de fármacos con la elevada solubilidad acuosa que le comunican los sustituyentes hidrófilos. Este aspecto resulta crítico puesto que los resultados obtenidos en ensayos previos mostraron que el proceso de reticulación requiere una concentración mínima de ciclodextrina del 10% (p/v), que supera ampliamente la solubilidad de la βCD natural (1.8% p/v).

Para optimizar las condiciones de preparación de los hidrogeles, se llevó a cabo la monitorización reológica del proceso de reticulación, ensayando una serie de sistemas con concentraciones variadas de EGDE y HPβCD. Las disoluciones se prepararon en NaOH 0.2M y cada una se dividió en dos porciones, la primera se transfirió al plato Peltier del reómetro y la segunda se llevó a un tubo de ensayo que se mantuvo en estufa a 50ºC. Los resultados del estudio reológico de reticulación, que se llevó a cabo a esta misma temperatura, pusieron de manifiesto la necesidad de utilizar concentraciones de HPβCD superiores al 10% y de EGDE por encima del 14.28%. Tomando como base esta información, para la preparación de los hidrogeles se seleccionaron las disoluciones de HPβCD al 20% (5 ml) a las que se incorporaron 2 ml de una disolución de EGDE (50% w/w en agua), de manera que la concentración final de ambos componentes fue del 14.28% (hidrogel #20-0). En este sistema, la concentración de agente reticulante es suficiente para reaccionar con 1.64 moles de grupos hidroxilo por litro. Teniendo en cuenta que la concentración de HPβCD es 0.11 mol/l y que cada molécula de esta ciclodextrina presenta 21 grupos hidroxilo potencialmente reactivos, hasta un máximo del 71% de estos grupos podrá reaccionar con EGDE. En la molécula de ciclodextrina, los hidroxilos que ocupan las posiciones 2 y 3 están situados en la región más ancha de la cavidad, mientras que el hidroxilo de la posición 6 se sitúa en la zona más estrecha. El orden de reactividad de estos grupos es el siguiente: OH-6 > OH-2 > OH-3 *(Chin y col., 1968; Cabral Marques, 1994; Loftsson y Brewster, 1996)*. Por lo tanto, la

concentración de grupos hidroxilo con alta reactividad (OH-6 y OH-2) en la disolución de HPβCD es de 1.54 mol/l. Dado que el grado de sustitución de la HPβCD es 4.6 y la reactividad de los grupos hidroxipropilo de los sustituyentes es similar a la de los OH-6, es de esperar que aquellos también participen en el proceso de reticulación. En resumen, la cantidad de EGDE incorporado como agente reticulante es suficiente para reaccionar con, al menos, dos tercios del total de grupos hidroxilo reactivos, lo que explica la elevada consistencia de los hidrogeles obtenidos.

Una práctica habitual para mejorar la solubilidad y modular la velocidad de cesión de fármacos anfifílicos e hidrofóbicos a partir de geles físicos y de comprimidos matriz *(Pose-Vilarnovo y col., 2002; 2003; 2004)*, consiste en utilizar de manera conjunta ciclodextrinas y éteres de celulosa. Tomando como punto de partida este hecho y con el fin de evaluar el efecto de la incorporación de derivados celulósicos a los hidrogeles de ciclodextrina reticulada, se planteó un segundo estudio en el que aplicando el mismo procedimiento descrito se co-reticuló la ciclodextrina con hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), un polímero lineal constituido por unidades de glucopiranosa similares a las que constituyen la HPβCD *(Doelker, 1987; Doelker, 1993)*.

La variedad de HPMC seleccionada para llevar a cabo el estudio (Methocel® K4M) presenta un peso molecular medio de 82400 Da y un grado de sustitución de 1.65 y contiene un 22.4% de grupos metoxilo y un 8.3% de grupos hidroxilo *(Alvarez-Lorenzo y col., 1999)*. Por lo tanto, una dispersión al 1% de esta HPMC cuenta con, aproximadamente, 0.1 mol/l de grupos hidroxilo disponibles para la reticulación. Para favorecer la aleatoriedad de las uniones ciclodextrina-polímero y minimizar las uniones covalentes dentro de una misma cadena de HPMC o de varias cadenas entre sí *(Capitan y col., 2000; Rodríguez y col., 2003)*, para la preparación de los hidrogeles se seleccionaron concentraciones de HPMC situadas entre la concentración crítica de solapamiento ($c^* = 1/[\eta]$) y la concentración de entrecruzamiento ($c_{ent} = 10/[\eta]$), que para este polímero concreto son 0.14 y 1.4% respectivamente *(Alvarez-Lorenzo y col.,*

1999). El intervalo de concentraciones de HPMC elegido permitió preparar una serie de hidrogeles que se identifican por los siguientes códigos: #20-0 (20% HPβCD-0% HPMC), #20-0.2 (20% HPβCD-0.2% HPMC), #20-0.4 (20% HPβCD-0.4% HPMC), #20-0.6 (20% HPβCD-0.6% HPMC), #20-0.8 (20% HPβCD-0.8% HPMC), #20-1 (20% HPβCD-1% HPMC) y #0-1 (0% HPβCD-1% HPMC).

Cuando se monitorizó reológicamente la cinética de reticulación (Figura 4.1) se observó que, a tiempo cero, todos los sistemas se comportan del mismo modo que las dispersiones de HPβCD o de HPβCD-HPMC preparadas sin agente reticulante y presentan el comportamiento característico de las dispersiones poliméricas diluidas (módulo de pérdida bajo y módulo de almacenamiento prácticamente nulo). A 50ºC y en presencia de EGDE, se produce tras un tiempo de latencia de pocos minutos un incremento progresivo en el valor de ambos módulos hasta que se alcanza una meseta.

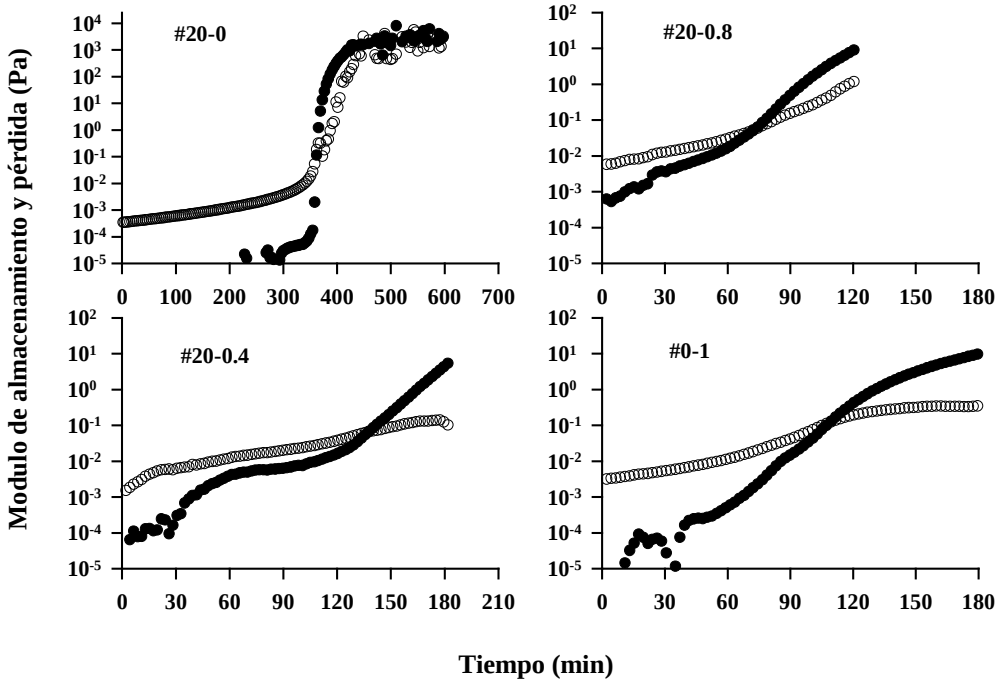


Figura 4.1.- Evolución en el tiempo de los módulos de almacenamiento (G´, •) y pérdida (G´´, o) para los diferentes sistemas preparados.

El tiempo de gelificación, estimado como el tiempo necesario para que el módulo de almacenamiento se sitúe por encima del de pérdida, (tan δ =1) *(Yui y col., 1992)*, se va haciendo progresivamente más bajo a medida que se incrementa la proporción de HPMC en el sistema: #20-0 (360 min)> #20-0.2 (240 min)> #20-0.4 (138 min)> #20-0.6 (80 min)> #20-0.8 (72 min)> #20-1 (15 min). Esta misma tendencia se manifiesta en la evolución de los valores de los dos módulos que, al final del proceso, fueron en todos los casos superiores a los obtenidos para los sistemas preparados únicamente con HPβCD. Estos hechos se explican por la proporción más alta de grupos hidroxilo reactivos presentes en el sistema al comienzo de la reacción y por la mayor facilidad de la co-reticulación de la HPβCD con las cadenas largas y flexibles de la HPMC. En 6 horas, como máximo, se forma un entramado de consistencia elevada. No obstante, para asegurar que la reacción se completa, la preparación de los hidrogeles se llevó a cabo manteniendo los moldes 12 horas en la estufa.

Este proceso de reticulación se ensayó también con otros dos derivados de β-ciclodextrina, la metil-β-ciclodextrina (MβCD) y la sulfobutiléter-β-ciclodextrina (SBβCD). Los hidrogeles de MβCD, con o sin HPMC, también se formaron en menos de 6 horas. En cambio, la SBβCD no dio lugar a hidrogeles, sin duda debido a que por su elevado grado de sustitución, cuenta con pocos grupos hidroxilo disponibles para reaccionar con EDGE, al tiempo que los grupo sulfonato ionizados presentes en los sustituyentes dan lugar a repulsiones electrostáticas intensas que dificultan su aproximación.

También se comprobó que el procedimiento desarrollado es adecuado para preparar hidrogeles, no sólo con las ciclodextrinas indicadas sino también con la γ-ciclodextrina, co-reticulándolas con otros materiales polisacarídicos, como la carboximetilcelulosa sódica o ciertas gomas guar catiónicas. Por lo tanto, los resultados obtenidos prueban que se trata de una aproximación sencilla, que transcurre en

condiciones suaves de pH y temperatura, en medio acuoso y en una sola etapa, y que permite obtener hidrogeles de composición muy variada. Este último hecho confiere al procedimiento una gran versatilidad.

4. 1. 2. *CARACTERIZACIÓN*

4.1.2.a. Propiedades estructurales

Los hidrogeles de HPβCD y de HPβCD-co-HPMC, que una vez preparados son transparentes y presentan una consistencia adecuada para su manejo, experimentaron un marcado incremento de diámetro cuando se introdujeron en agua (de 8.6 a 12 mm), mostrando una vez hidratados una superficie suave y uniforme. Estas características son propias de hidrogeles homogéneamente reticulados, de manera que el proceso fija de manera cuantitativa a la totalidad de los componentes de partida en el sistema, evitando la lixiviación de cualquiera de sus componentes durante los procesos de lavado. Para establecer el grado de reticulación, se registraron los espectros de infrarrojos de los hidrogeles secos y se compararon las señales características de los enlaces éter en el hidrogel con las obtenidas con los productos de partida. La HPβCD presenta un pico a 1082 cm^{-1} de menor intensidad que a 1033 cm^{-1} (A_{1082}/A_{1033}=0.73), y la HPMC cuenta con picos menos intensos a 1117 cm^{-1} que a 1066 cm^{-1} (A_{1117}/A_{1066}=0.95), lo que es característico del predominio de los grupos alcohol primario en la estructura de estas sustancias *(Langkilde y Svantesson, 1995; Rodríguez y col., 2003)*. En cambio, en los hidrogeles la relación de áreas A_{1082}/A_{1033} (=1.03-1.13) se incrementó en un 60% mientras que el cociente A_{1117}/A_{1066} (=1.01-1.13) aumentó en un 10%. Estos resultados indican que en torno al 60% de los hidroxilo primarios de la HPβCD se han transformado en hidroxilos secundarios durante la reticulación, lo que coincide con el cálculo teórico que predice que la proporción de grupos hidroxilo reactivos de la HPβCD que pueden ser reticulados con EGDE es de dos tercios. El 10% de reticulación encontrado para los grupos hidroxilo de la HPMC, tanto en presencia como en ausencia

de HPβCD, coincide con el observado previamente para otros éteres de celulosa *(Rodríguez y col., 2003)*. La ausencia de bandas a 1250 cm^{-1} indica que, una vez finalizada la síntesis del hidrogel, no quedan residuos de agente reticulante sin reaccionar.

4.1.2.b. Hinchamiento

La elevada afinidad por el agua de los hidrogeles secos se puso de manifiesto al registrar los perfiles de hinchamiento en función del tiempo (Figura 4.2.). Aunque todos los hidrogeles captaron agua rápidamente, el grado de hinchamiento final resultó ser muy dependiente de la proporción de HPMC. El hidrogel preparado exclusivamente con HPβCD (#20-0) captó una cantidad de agua equivalente a 10 veces su peso seco, mientras que el hidrogel HPβCD-co-HPMC preparado con la proporción más alta de HPMC (#20-1) sólo multiplicó su peso por 4. El menor grado de hinchamiento experimentado por los hidrogeles HPβCD-co-HPMC se explica por su más alto grado de reticulación. El hidrogel seco preparado únicamente con HPMC mostró apariencia de film, resultó difícil de manipular por su baja consistencia y, tras permanecer 12 horas en agua, su grado de hinchamiento fue de 5.6 g/g.

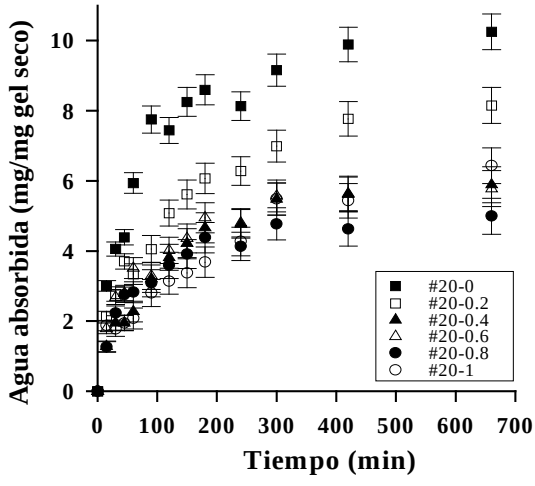


Figura 4.2.- Perfiles de hinchamiento de los hidrogeles secos.

El proceso de incorporación de agua se ajustó a una cinética tipo raíz cuadrada (r^2>0.99), que indica que el agua penetra por difusión en el sistema *(Gehrke y col., 1994)*. Todos los hidrogeles mostraron una velocidad de hinchamiento en torno a 0.050-0.068 $min^{-1/2}$, excepto aquellos preparados con la proporción más alta de HPMC (#20-1) que incorporaron agua más lentamente (0.037 $min^{-1/2}$) y a una velocidad similar a la que se encontró previamente con los hidrogeles de éteres de celulosa catiónicos *(Rodríguez y col., 2003)*. Los hidrogeles de MβCD y de MβCD-co-HPMC presentaron una capacidad de incorporación de agua ligeramente superior a la de los hidrogeles de HPβCD, a lo que puede contribuir la mayor hidrofilia de la MβCD. Por lo tanto, los resultados obtenidos indican que los hidrogeles secos se comportan como sistemas superabsorbentes y que la estructura de su entramado es muy permeable a las moléculas de agua.

4.1.2.c. Carga y cesión de fármacos

Como se comentó en el apartado correspondiente, la incorporación de las ciclodextrinas a los hidrogeles responde al doble objetivo de mejorar su aptitud para cargar fármacos hidrofóbicos y de controlar la cesión de fármacos hidrofílicos. Por lo tanto, una vez preparados los hidrogeles, se llevó a cabo un estudio con un fármaco hidrofóbico, el estradiol, y otro hidrofílico, el diclofenaco sódico.

Diclofenaco

Dado que el diclofenaco presenta una alta afinidad por la HPβCD *(Pose-Vilarnovo y col., 1999)*, se ensayaron hidrogeles preparados con HPβCD (#20-0) o HPβCD-co-HPMC (#20-0.2, #20-0.4, #20-0.6, #20-0.8, #20-1) y HPMC (#0-1).

Los hidrogeles de HPβCD incorporaron cantidades de diclofenaco más altas (27 mg/g y 106 mg/g cuando se cargaron en disoluciones de fármaco al 0.1% y 0.5%, respectivamente) que los hidrogeles de HPβCD-co-HPMC (15-20 mg/g y 57-81 mg/g en las mismas condiciones). El fármaco se puede encontrar en los hidrogeles en tres estados de asociación diferentes: i) disuelto en la fase acuosa del entramado; ii) formando complejos de inclusión con la ciclodextrina, y iii) asociado hidrofóbicamente a los anillos de glucopiranosa del éter de celulosa. La cantidad de fármaco incorporada resultó ser independiente de que el ensayo se llevase a cabo con hidrogeles hidratados o previamente desecados, lo que se explica por el rápido hinchamiento experimentado por los hidrogeles secos y su consiguiente capacidad para recuperar su estructura inicial en un tiempo muy breve.

Las diferencias estructurales entre los distintos hidrogeles deben afectar considerablemente a su capacidad de carga y al control de la cesión. De hecho, los hidrogeles de HPβCD-co-HPMC presentan un grado de reticulación más alto y una capacidad de hinchamiento sensiblemente menor. La cantidad de fármaco que puede ser incorporada por simple equilibrio entre la fase acuosa del entramado y la disolución de carga se estimó aplicando la ecuación *(Kim y col., 1992)*:

$$Carga = (Vs / Wp) \times Co$$

en la que *Vs* es el volumen de agua captada por el hidrogel, *Wp* es el peso del hidrogel seco y *Co* la concentración de fármaco en la disolución de carga. Si se emplea una disolución de diclofenaco al 0.1%, las cantidades medias cargadas por los hidrogeles en su fase acuosa, una vez alcanzado el máximo grado de hinchamiento, son: #20-0, 9.9 (0.5) mg/g; #20-0.2, 7.8 (0.4) mg/g; #20-0.4, 5.6 (0.3) mg/g; #20-0.6, 5.6 (0.3) mg/g; #20-0.8, 5.0 (0.2) mg/g; #20-1, 5.4 (0.3) mg/g; #0-1, 5.6 (0.2) mg/g. Cuando la concentración de la disolución de carga de diclofenaco es del 0.5%, las cantidades de fármaco se multiplican por 5. Estas cantidades son del orden de 2 a 5 veces inferiores a

las encontradas experimentalmente, lo que pone de manifiesto que la incorporación de fármaco se produce también por otros mecanismos.

Para estudiar la contribución de las interacciones del diclofenaco con los componentes del entramado polimérico, se estimó el coeficiente de reparto (*K*) del fármaco entre el entramado polimérico y la disolución de carga a partir de la siguiente ecuación:

$$Carga\ (total) = \left[(Vs + KVp)/Wp \times Co\right]$$

donde *Vp* es el volumen del polímero seco. Una vez más, los valores del coeficiente de reparto resultaron ser más altos en los hidrogeles preparados únicamente con HPβCD que en los de HPβCD-co-HPMC lo que indica que, a pesar de que el diclofenaco se encuentra ionizado y que su capacidad para interaccionar con las cavidades de la ciclodextrina puede verse reducida *(Stella y col., 1999)*, las cavidades de las ciclodextrinas juegan un papel fundamental en el proceso de carga.

La elevada capacidad de carga del hidrogel de HPMC preparado en ausencia de ciclodextrina (25 mg/g y 97 mg/g cuando se cargaron en disoluciones de fármaco al 0.1% y 0.5%, respectivamente) se puede explicar por el establecimiento de interacciones hidrofóbicas entre las unidades anhidroglucosa de las cadenas de HPMC y los anillos aromáticos del diclofenaco. La incorporación, a través de este mecanismo, de otros fármacos antiinflamatorios no esteroídicos, como el ibuprofeno, a hidrogeles de éteres de celulosa ha sido descrita previamente *(Ridell y col., 1999)*. Como el diclofenaco es más hidrofóbico que el ibuprofeno *(Bustamante y col., 2000)*, la intensidad de la interacción con la HPMC puede ser incluso mayor. Teniendo en cuenta la composición del hidrogel de HPMC (3.27×10^{-4} U g de unidades de anhidroglucosa por gramo de gel seco), la cantidad total de fármaco cargado (3.14×10^{-4} mol/g) y la cantidad de fármaco que el hidrogel carga por simple equilibrio de su fase acuosa con la disolución de diclofenaco al 0.5% (0.91×10^{-4} mol/g), el número de moléculas de

diclofenaco unidas a cada unidad de anhidroglucosa del entramado polimérico debe ser 0.68.

En los hidrogeles de HPβCD, que presentan 3.84×10^{-4} mol de ciclodextrina/g, se estima que el número de moléculas de diclofenaco unidas por cada unidad de anhidroglucosa puede ser del orden 1:4 a 1:5. Como cada HPβCD se encuentra formada por 7 unidades de anhidroglucosa y la contribución de la HPMC al contenido total es bastante bajo, se puede asumir una relación molar fármaco/ciclodextrina próxima a 0.61. Además, en el caso de los hidrogeles de HPβCD la carga parece depender principalmente de la interacción del diclofenaco con las cavidades de ciclodextrina. Como el diclofenaco es un fármaco anfifílico, algunas moléculas también se pueden introducir en el hidrogel por asociación con las que se encuentran unidas al entramado. Este fenómeno se ha puesto de manifiesto previamente para los complejos de inclusión de ibuprofeno y diflunisal, cuando se encuentran en disolución en concentraciones inferiores a su concentración crítica de micelización *(Magnusdottir y col., 2002).*

Con el propósito de profundizar en el conocimiento del estado del fármaco en el hidrogel, se compararon los espectros Raman de los hidrogeles cargados con los complejos de inclusión diclofenaco-HPβCD liofilizados. El fármaco puede interaccionar con la ciclodextrina para establecer el complejo de inclusión a través de los anillos fenilacetato y diclorofenilo, si bien está última interacción parece la más favorable *(Pose-Vilarnovo y col., 2003).* Para estudiar la formación de complejos, se analizaron los cambios de las bandas propias del diclofenaco en el espectro Raman del hidrogel cargado *(Iliescu y col., 2004).* En la región comprendida entre 1500 y 1650 cm^{-1} el diclofenaco presenta tres bandas características, que están ausentes en la HPβCD y la HPMC. La banda a 1579 cm^{-1} se asocia a la vibración asimétrica del grupo acetato, mientras las bandas a 1582 y 1603 cm^{-1} están relacionadas con las vibraciones de los anillos diclorofenilo y fenilacetato, respectivamente. Algunas de estas bandas, en especial la del diclorofenilo, se ensanchan y se desplazan a números de onda más altos cuando se establecen los complejos de inclusión al liofilizar disoluciones fármaco-

ciclodextrina, tanto en presencia como en ausencia de HPMC. Los espectros Raman del diclofenaco en los hidrogeles de HPβCD y HPβCD-co-HPMC presentaron desplazamientos similares a los del fármaco incorporado a la ciclodextrina en los sistemas liofilizados, con bandas a 1588 cm^{-1} (#20-0) y a 1589 cm^{-1} (#20-0.4). El hidrogel de HPMC (#0-1) también mostró un desplazamiento hacia 1589 cm^{-1} lo que confirma la existencia, también en este hidrogel, de uniones de tipo hidrofóbico entre el fármaco y las unidades de anhidroglucosa. Como esta interacción con la HPβCD sólo es posible cuando el fármaco se introduce en su cavidad, se puede concluir que el diclofenaco interacciona con la ciclodextrina en el hidrogel del mismo modo que cuando forma complejos de inclusión.

Con el fin de evaluar el efecto de la desecación de los hidrogeles sobre el perfil de cesión del fármaco, los hidrogeles se ensayaron: a) sin someterlos a ningún tratamiento ni antes ni después de la carga (Figura 4.3a; hidratados- hidratados); b) desecándolos en estufa antes y después de la carga (Figura 4.3b; secos-secos); c) desecándolos sólo después de incorporar el fármaco (Figura 4.3c; hidratados-secos) y d) desecándolos sólo antes de la carga (Figura 4.3d; secos-hidratados). La concentración de la disolución de carga (0.1 ó 0.5%) no afectó apreciablemente a los perfiles de cesión.

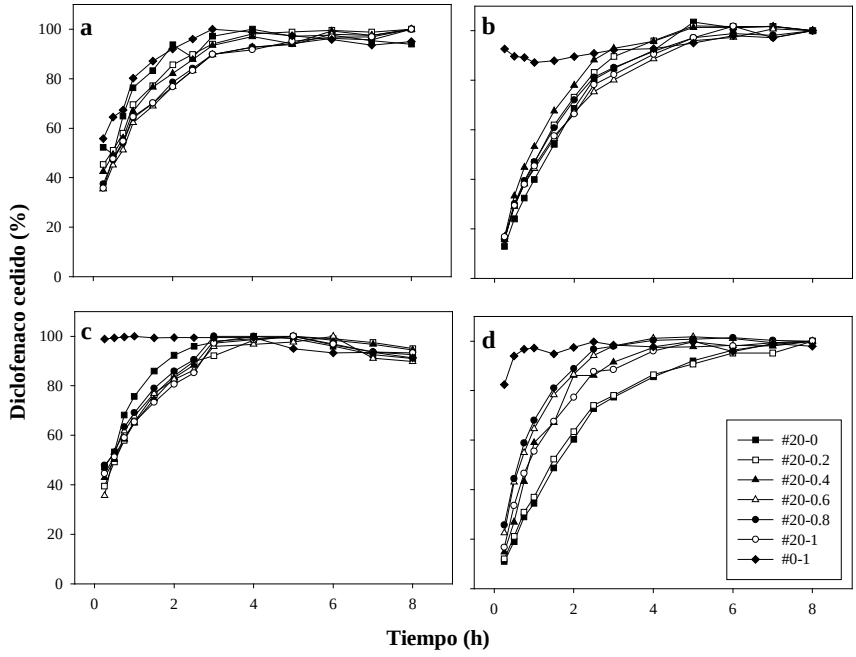


Figura 4.3.- Perfiles de cesión del diclofenaco a partir de los hidrogeles cargados en soluciones acuosas de diclofenaco 0.5% (p/v).

La cesión de fármaco a partir del hidrogel preparado sólo con HPMC sin ciclodextrina (#0-1) no se vio afectada por el tratamiento térmico y fue prácticamente inmediata. En cambio, los hidrogeles de HPβCD o HPβCD-co-HPMC mantuvieron la cesión durante varias horas gracias a la capacidad de las ciclodextrinas para crear un entorno más hidrofóbico que el generado por las cadenas lineales de la HPMC. La rápida liberación, al inicio del estudio, de una fracción apreciable de la dosis se debe al fármaco que se introduce en el hidrogel por simple equilibrio entre las fases acuosas. Esto indica que la ciclodextrina también desempeña un papel importante en el control de la liberación del diclofenaco. En los hidrogeles de ciclodextrina, los fenómenos de dilución son mínimos debido a que las ciclodextrinas se encuentran covalentemente unidas unas a otras y a que el propio entramado limita el volumen de agua que puede

penetrar en el hidrogel. Todo ello da lugar a un microambiente rico en cavidades capaces de interaccionar con las moléculas de fármaco y, en consecuencia, a hidrogeles que sostienen la liberación del fármaco *(Liu y col., 2004a; Zhang y col., 2005).*

El efecto del contenido en HPMC de los hidrogeles HPβCD-co-HPMC fue marcado en los sistemas que no se secaron (hidratados-hidratados) y, aunque en sentido opuesto, también lo fue en los que sufrieron dos procesos de secado (secos-secos). Las cadenas de HPMC ralentizaron el proceso de cesión de los primeros y lo promovieron en los últimos. La incorporación de HPMC conduce a un mayor grado de reticulación y a un menor grado de hinchamiento, lo que puede explicar la liberación más lenta a partir de los hidrogeles hidratados. Los hidrogeles HPβCD-co-HPMC que sufrieron dos procesos de secado (secos-secos) mostraron una cesión más rápida a medida que se incrementó la concentración de HPMC. En estos hidrogeles se puede producir un arrastre de moléculas de diclofenaco por moléculas de agua durante el proceso de hinchamiento *(Peppas y col., 2004)*. Además, el diclofenaco presenta una mayor afinidad por el agua que la HPMC, lo que puede provocar un efecto salino, facilitando la entrada de agua en el hidrogel y, consecuentemente, la difusión del fármaco *(McCrystal y col., 1999).*

En resumen, los hidrogeles de HPβCD y de HPβCD-co-HPMC presentan una elevada capacidad de carga y mantienen la cesión de diclofenaco durante varias horas. Si se tiene en cuenta que la dosis usual de diclofenaco es de 50-100 mg al día *(Martindale, 1999),* 1 ó 2 gramos de gel serían suficientes para cubrir las necesidades terapéuticas diarias.

Estradiol

El estradiol presenta una alta afinidad tanto por la HPβCD como por la MβCD, tal como reflejaron los estudios previos de solubilización. Los diagramas de solubilidad pusieron de manifiesto la formación de complejos de estequiometría 1:1 mol:mol (diagramas de tipo A_L) y que la aplicación de un proceso de autoclavado (20 minutos a 120ºC) favorece de manera muy notable el proceso de complejación. La solubilidad del estradiol se incrementó 100 veces en el caso de la HPβCD y 158 en el de la MβCD cuando la concentración de la ciclodextrina en disolución fue del 1%. Sin embargo, las constantes de formación de complejo estimadas a partir de la ecuación:

$$K_{1:1} = \frac{pendiente}{So(1 - pendiente)}$$

resultaron ser del mismo orden de magnitud (17.4 mM^{-1} para la HPβCD y 27.2 mM^{-1} para la MβCD) lo que indica una capacidad de complejación muy similar a bajas concentraciones de ciclodextrina. Desde un punto de vista práctico resulta muy interesante conocer la proporción de moléculas de ciclodextrina que permanecen libres en el medio *(Loftsson y col., 2005b; Loftsson y col., 1999)*. En los sistemas estudiados, 1 de cada 3 moléculas de MβCD forman complejos solubles con el estradiol. Esta relación disminuye hasta 1 de cada 4 moléculas de ciclodextrina en el caso de la HPβCD. Los diagramas de los sistemas autoclavados experimentaron una desviación negativa de la linealidad. Este hecho se puede relacionar con la formación de estructuras supramoleculares que se establecen cuando la concentración de ciclodextrina se encuentra por encima de su concentración crítica de asociación *(Loftsson y Brewster, 1996)*. El autoclavado resultó ser particularmente útil para mejorar la capacidad de complejación de la HPβCD (36.4 mM^{-1}) y la solubilidad del estradiol cuando también está presente en el medio HPMC (incrementos en la solubilidad del estradiol de hasta 170 veces), haciendo posible que participe el 50% de las moléculas de ciclodextrina en el proceso de complejación del estradiol. Este efecto del calentamiento se ha justificado

por el aumento temporal de la solubilidad que produce y que facilita que las moléculas de fármaco ocupen las cavidades de las ciclodextrinas *(Loftsson y Brewster, 1996).*

A la vista de estos resultados, se prepararon y se ensayaron hidrogeles a base de MβCD (20-25%) y MβCD-co-HPMC (20%-co-0.25%; 25%-co-0.25%), además de los de HPβCD (20-25-30%) y HPβCD-co-HPMC (20%-co-0.25%; 25%-co-0.25%; 30%-co-0.25%). Discos de estos hidrogeles se cargaron por inmersión en una suspensión de estradiol.

Al igual que las disoluciones acuosas de HPβCD, los hidrogeles preparados a partir de ella que se sometieron a autoclavado incorporaron el doble de cantidad de fármaco que aquellos que no sufrieron dicho tratamiento. Como era de esperar a partir de los valores de las constantes de formación de los complejos, los hidrogeles de MβCD mostraron, en general, una mayor capacidad de complejación y el autoclavado manifestó una influencia menos marcada (la carga descendió ligeramente en los hidrogeles de MβCD pero aumentó en los hidrogeles MβCD-co-HPMC). Dado que la solubilidad del estradiol es 5.17 mg/l y los hidrogeles pueden captar de 6 a 10 veces su peso en agua (6-10 ml/g), la cantidad de estradiol que puede incorporar el hidrogel por simple equilibrio entre la fase acuosa del entramado y la solución de carga se puede estimar en 0.031-0.051 mg/g. Este valor es, por término medio, 500 veces inferior al que presentan los hidrogeles, lo que indica que la mayor parte del fármaco se encuentra formando complejos de inclusión con las unidades de ciclodextrina. La relación molar ciclodextrina:estradiol se situó entre 4.7 y 13.6. La limitada capacidad de carga del hidrogel HPβCD(30%)-co-HPMC(0.25%) se relaciona con su bajo grado de hinchamiento, que dificulta la difusión de las moléculas de fármaco a su través.

Los valores del coeficiente de reparto, estimados por el procedimiento descrito para el diclofenaco, se situaron entre 1500 y 4800, lo que revela que los hidrogeles de MβCD y los de HPβCD, estos últimos autoclavados, presentan una marcada afinidad por el estradiol, que se ve incrementada cuando los hidrogeles cuentan con HPMC en su

estructura. Se observó, además, una intensa correlación lineal entre los coeficientes de reparto de fármaco en los hidrogeles y las constantes de afinidad calculadas a partir de los diagramas de solubilidad, lo que prueba el papel fundamental de las ciclodextrinas en la incorporación de estradiol al hidrogel.

Teniendo en cuenta la elevada potencia de este fármaco, que se administra por vía oral en dosis diarias de 1-2 mg o por vía transdérmica en dosis semanales de 2-5 mg/semana *(Kuhl, 2005)*, se requerirían cantidades de hidrogel de ciclodextrina comprendidas entre 50-200 mg para preparar una formulación útil para cubrir las necesidades terapéuticas usuales.

Los ensayos de cesión del estradiol se llevaron a cabo en disolución acuosa de dodecilsulfato sódico (SDS) al 0.3%, que es el medio recomendado en las farmacopeas para ensayar fármacos de solubilidad acuosa limitada. Aunque todos los hidrogeles fueron capaces de mantener la cesión de estradiol durante varios días, se observaron notables diferencias en la cinética del proceso (Figura 4.4).

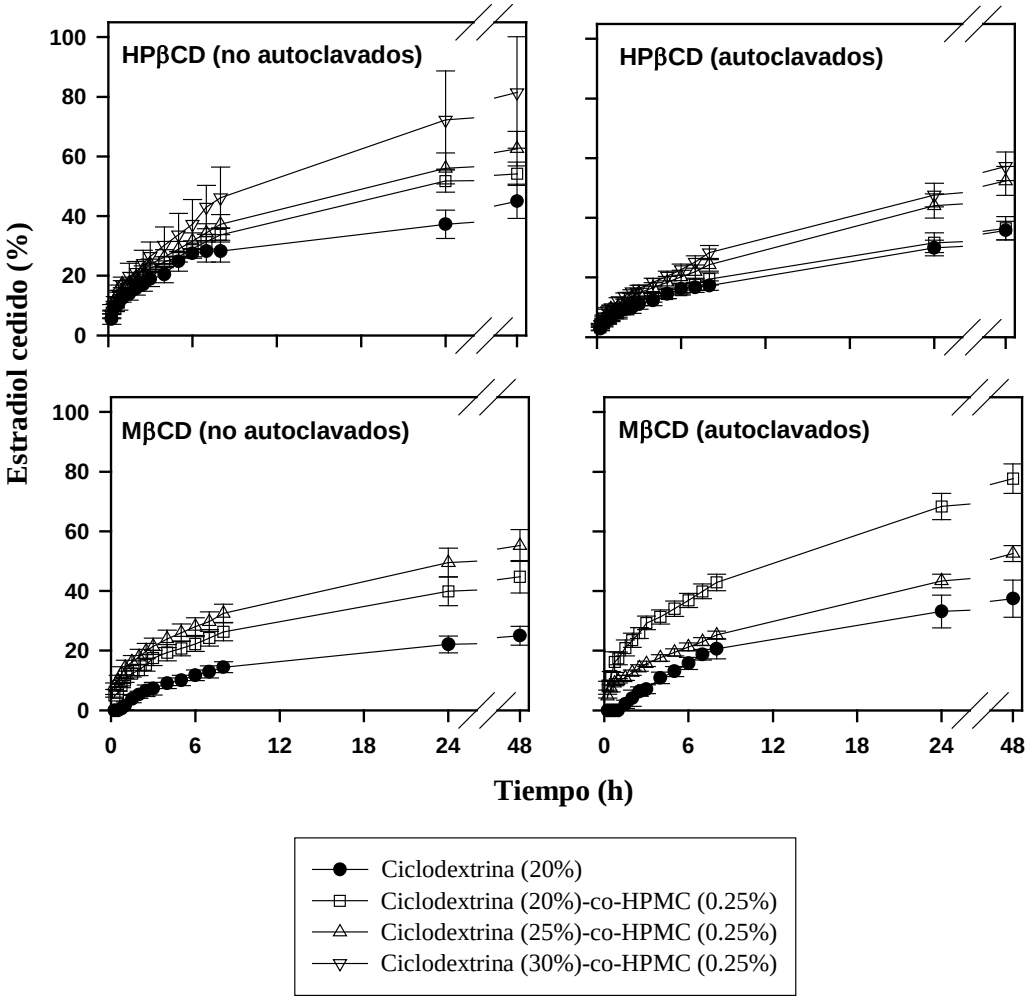


Figura 4.4.- Perfiles de cesión del estradiol a partir de los diferentes hidrogeles en estudio.

En general, los hidrogeles preparados incorporando HPMC a su estructura cedieron el fármaco a una velocidad ligeramente más alta, en particular los hidrogeles de HPβCD que se cargaron sin aplicar autoclavado. Para los hidrogeles de HPβCD se encontró una correlación negativa entre los valores de la constante de velocidad de liberación (obtenidos por ajuste a la ecuación de Higuchi, r^2 >0.99) y las constantes de

formación de complejo estradiol:ciclodextrina estimadas a partir del diagrama de solubilidad, lo que indica que la afinidad de la HPβCD por el fármaco controla el proceso de cesión. Para los hidrogeles de MβCD se observaron tiempos de latencia de 45-60 min, concordantes con las elevadas constantes de afinidad obtenidas para este derivado de ciclodextrina.

En su conjunto, estos resultados confirman que la complejación fármaco-ciclodextrina determina la afinidad del fármaco por el hidrogel y desempeña un papel fundamental en el control de la liberación.

4.2. SISTEMAS PREPARADOS POR RETICULACIÓN DE CICLODEXTRINAS E INTERPENETRACIÓN SIMULTÁNEA DE SUS ENTRAMADOS CON MICROGELES DE CARBOPOL.

Los hidrogeles interpenetrados (IPNs) son sistemas resultantes del entrecruzamiento de dos entramados poliméricos de los que al menos uno se ha sintetizado y reticulado en presencia del otro. Los IPNs combinan en un único material las funciones de los polímeros constituyentes sin que sufran alteraciones significativas, lo que los diferencia de los materiales de composición similar que se obtienen por copolimerización.

En esta etapa del estudio se procedió a sintetizar hidrogeles de HPβCD en un medio conteniendo microgeles de ácido poliacrílico de manera que, al unirse covalentemente las ciclodextrinas entre sí, las cadenas resultantes puedan pasar a través de los microgeles forzando su retención física en una estructura común. De esta manera es previsible que el sistema resultante combine la capacidad de complejación de las ciclodextrinas, probada en la primera fase del estudio, con la aptitud de las cadenas de ácido poliacrílico para dar lugar a hidrogeles con hinchamiento sensible a cambios de pH y propiedades bioadhesivas. La optimización de las proporciones de ambos componentes debe conducir a la obtención de sistemas interpenetrados con propiedades mecánicas y de cesión adecuadas. Para llevar a cabo el trabajo se partió de microgeles de ácido poliacrílico, comercializados como Carbopol® 71G, que presentan en su estructura grupos ácido carboxílico con pKa ≈ 6.0 *(Noveon, 2002)* y que cuentan con la aprobación de las autoridades sanitarias para ser utilizados como excipiente de formas de dosificación destinadas a diferentes vías. La variedad seleccionada está constituida por microgeles de bajo grado reticulación. Por lo tanto, presenta largas cadenas de ácido poliacrílico entre puntos de reticulación que los dotan de una elevada flexibilidad y de un tamaño de malla relativamente grande.

4. 2. 1. *INTERACCIÓN DEL CARBOPOL CON LA HPBCD. EFECTO SOBRE LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS.*

Antes de proceder a la preparación de los IPNs, se llevaron a cabo estudios dirigidos a poner de manifiesto posibles fenómenos de interacción del carbopol con la HPβCD, así como potenciales alteraciones del proceso de complejación de esta ciclodextrina con fármacos de distinta naturaleza. En lo que se refiere al primero de estos aspectos, se prepararon disoluciones de mezclas de carbopol e HPβCD que se desecaron por liofilización o en estufa. A continuación, las muestras desecadas se analizaron por calorimetría diferencial de barrido (DSC) y espectrofotometría IR. El registro de DSC de la HPβCD muestra una amplia endoterma entre 50 y 150ºC asociada a su deshidratación *(Granero y Longhi, 2002)*, una Tg a 225ºC y un pico de descomposición en torno a 300ºC. Los films de carbopol obtenidos por desecación en estufa presentaron tres señales definidas: una endoterma ancha entre 50 y 100ºC provocada por la evaporación del agua absorbida, un cambio en la línea base a 133ºC causado por su transición vítrea (Tg) y una última endoterma próxima a los 250ºC que refleja la descomposición del polímero *(Kanis y col., 2000)*. Tanto en las mezclas liofilizadas como en los films, la Tg característica del carbopol desaparece o se desplaza hacia temperaturas más altas lo que indica una cierta interacción con la HPβCD. Los espectros de infrarrojo de los films y de los sistemas lioflilizados corroboraron la formación de puentes de hidrógeno entre la HPβCD y el carbopol. Este último presenta una banda ancha a 1700 cm^{-1} que se atribuye a la existencia de dos poblaciones de grupos carbonílicos; una correspondiente a las uniones entre hidrógenos intra e intermoleculares y otra asociada a los grupos carbonilo libres *(Pérez-Marcos y col., 1993; Barreiro-Iglesias y col., 2002)*. La banda se desplaza hacia frecuencias de vibración más altas (1726 cm^{-1}) en presencia de la HPβCD lo que indica una reducción de las uniones por puentes de hidrógeno en el carbopol y el establecimiento de nuevas uniones con la ciclodextrina. Para estimar el porcentaje de puentes de hidrógeno establecidos con la ciclodextrina, se deconvolucionaron en tres picos mediante un ajuste

de tipo lorentziano las bandas características de ambos compuestos en la región comprendida entre 1550 y 1800 cm^{-1}. Los resultados obtenidos indican que, en los sistemas desecados, entre el 38 y el 48% de los grupos carboxilo forman puentes de hidrógeno con la HPβCD. Es previsible que este porcentaje se reduzca de forma muy notable en las condiciones de preparación de los hidrogeles (disolución alcalina) en las que los grupos ácido carboxílico se encuentran ionizados, por lo que no deben interferir en la preparación de los IPNs.

Los diagramas de solubilidad, que se construyeron a continuación, confirmaron que la presencia de carbopol en el medio no altera de manera significativa la capacidad de la HPβCD para formar complejos de inclusión con estradiol o con ketoconazol. Los diagramas correspondientes al estradiol obtenidos a 25ºC con HPβCD en presencia de carbopol, con o sin proceso de autoclavado, fueron de tipo A_L con una pendiente inferior a la unidad, lo que es característico de la formación de complejos con estequiometría 1:1 mol:mol. Ni la capacidad solubilizante de la HPβCD ni su afinidad por el estradiol se alteraron en presencia de carbopol.

Los diagramas de solubilidad del ketoconazol en disoluciones de HPβCD también fueron de tipo A_L y de nuevo se puso de manifiesto un incremento en la solubilidad cuando los sistemas se sometieron a autoclavado. En los sistemas no autoclavados la presencia del carbopol al 0.05% provocó un ligero aumento en la solubilidad del fármaco, que podría estar relacionado con el descenso en el pH del medio que produce el polímero y con el establecimiento de interacciones iónicas entre el carbopol y el fármaco. El ketoconazol es una base débil que presenta dos pKa (6.51 y 2.95; *Skiba y col., 2000)* y su solubilidad aumenta mucho a pH inferiores a 4 *(Esclusa-Díaz y col., 1996).* Para dilucidar la importancia de las interacciones fármaco/carbopol, el pH de las disoluciones se ajustó a 8. En estas condiciones, la solubilidad del ketoconazol en medios con HPβCD y carbopol fue similar a la observada en ausencia de carbopol, lo que indica que la contribución de los microgeles a la solubilización del fármaco es prácticamente nula. Como a pH ácido el fármaco experimenta una

degradación apreciable *(Skiba y col., 2000)*, sólo se autoclavaron las disoluciones HPβCD/carbopol neutralizadas (pH 8). En estas condiciones, los diagramas de solubilidad del ketoconazol fueron superponibles con los obtenidos en ausencia de carbopol.

4. 2. 2. *PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE IPNs*

4.2.2.a. Preparación

La última etapa se centró en la preparación de los IPNs incorporando a porciones de 5 ml de disolución de HPβCD al 20% p/v en KOH 0.2M, cantidades suficientes de carbopol para alcanzar concentraciones de 0.2, 0.4, 0.8 y 1% (p/v). Una vez homogeneizado el sistema, se añadieron bajo agitación 2 ml de EGDE y la mezcla se transfirió a tubos de ensayo de 8.6 mm de diámetro interno que se mantuvieron a 50ºC durante 12 horas.

El medio básico permitió por un lado la reticulación de las ciclodextrinas y, por otro, evitó la reacción de los grupos ácido carboxílicos del carbopol con el EGDE con la consiguiente formación de un verdadero sistema interpenetrado, en el que el incipiente entramado de ciclodextrinas es capaz de enhebrar los microgeles de carbopol que guían el crecimiento del entramado al mismo tiempo que permanecen retenidos en el sistema (Figura 4.5).

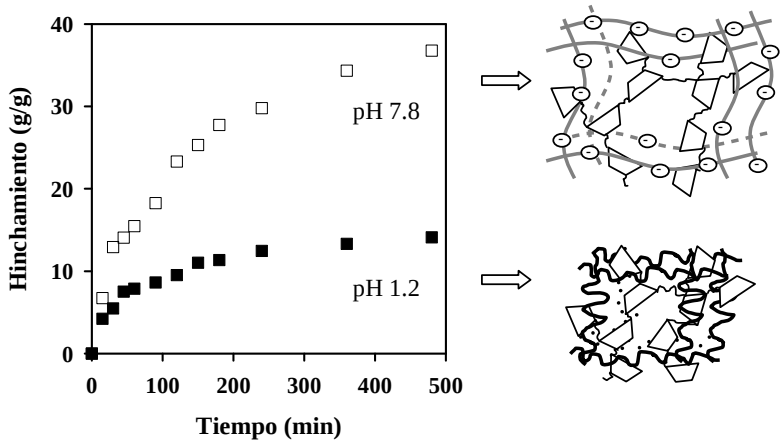


Figura 4.5.- Efecto del pH sobre el grado de hinchamiento del IPN de HPβCD y Carbopol al 1%.

Todos los IPNs presentaron a simple vista una estructura uniforme y una superficie continua. Sin embargo, la microscopía electrónica de barrido puso de manifiesto la existencia de importantes diferencias estructurales entre el hidrogel de HPβCD y los IPNs, especialmente con los que presentan un más alto contenido en carbopol. Estos últimos mostraron una estructura interna claramente más porosa, con poros de mayor tamaño y mejor definidos, lo que sugiere que el entramado de los microgeles de carbopol podría servir de guía para el crecimiento de las cadenas de ciclodextrina.

4.2.2.b. Hinchamiento

Los estudios de hinchamiento, que se llevaron a cabo en medios de distinto pH (agua pH 5.8, SDS 0.3% pH 7.8 y HCl pH 1.2), pusieron de manifiesto la capacidad de los IPNs para responder a cambios de pH (Figura 4.5). Este efecto se hizo especialmente evidente en los IPNs preparados con 0.8 ó 1% de carbopol. El elevado contenido en

grupos carboxílicos de estos IPNs da lugar a un aumento de la presión osmótica en el hidrogel y a una intensificación de las repulsiones electrostáticas, lo que promueve la penetración de agua y de SDS desde la disolución circundante. En estos medios, los IPNs se comportan como sistemas superabsorbentes capaces de incrementar su peso hasta 20-40 veces. El menor grado de hinchamiento experimentado en medio ácido pone de manifiesto que los grupos ácido carboxílico de los microgeles de carbopol permanecen libres y no ionizados. Los IPNs experimentaron un rápido hinchamiento en las primeras dos horas, alcanzándose el estado de equilibrio al cabo de ocho horas. En todos los casos, el proceso de hinchamiento se ajustó a una cinética tipo raíz cuadrada (r^2>0.99) lo que indica que las moléculas de agua pueden penetrar fácilmente en el sistema.

4.2.2.c. Propiedades mecánicas y bioadhesivas

Una vez hidratados, los IPNs mostraron un comportamiento viscoelástico con valores del módulo de pérdida (G'') y de almacenamiento (G') comprendidos entre 0.1 y 300 Pa, siendo en todos los casos el valor de G' superior al de G''. Este comportamiento es característico de los entramados bien estructurados. Los IPNs preparados con 0.8 ó 1% de carbopol presentaron valores de módulo más bajos que los restantes IPNs, lo que indica que los microgeles de carbopol comunican flexibilidad a la estructura del sistema. Este efecto es consecuencia del bajo grado de reticulación de estos microgeles, que no experimentan reticulación por reacción con el EGDE. Como ya se ha indicado, los microgeles de carbopol están constituidos por cadenas de ácido poliacrílico relativamente largas que pueden rotar y cambiar su conformación casi libremente, soportando deformaciones considerables sin romperse.

La dureza y la compresibilidad de los IPNs, estimadas a partir del registro de los gráficos fuerza *vs.* desplazamiento, mostraron que los preparados con un 0.2% de carbopol se comportan de manera similar al hidrogel de HPβCD, y que a medida que se

incrementa la proporción de carbopol los valores de ambos parámetros disminuyen progresivamente. Como los IPNs son viscoelásticos y no elásticos puros, para cuantificar su deformabilidad se calculó el módulo de deformabilidad, ED, empleando el modelo de Hecky *(Mohsenin y Mittal, 1977; Konstance, 1993)*. Los valores obtenidos para este parámetro mostraron una correlación negativa con la proporción de carbopol, lo que indica que la rigidez de los IPNs se va reduciendo a medida que se incrementa el contenido en carbopol (Figura 4.6).

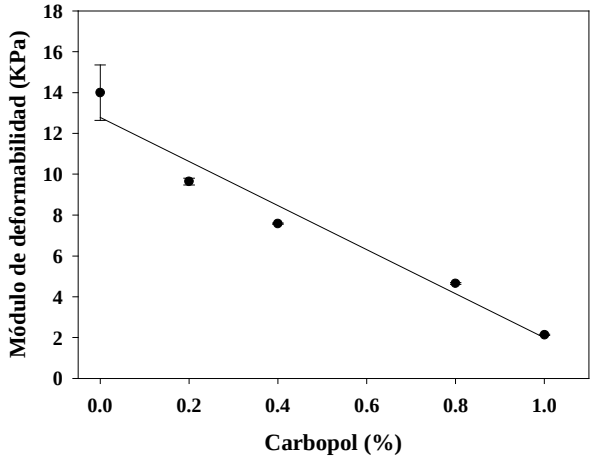


Figura 4.6.- Dependencia del módulo de defromabilidad respecto a la proporción de carbopol en el IPN.

Los valores de ED obtenidos resultaron ser del mismo orden de magnitud que los de hidrogeles de alginato *(Lee y col., 2000)*, N-isopropilacrilamida *(Mounir, 2004)* o sus copolímeros con otros monómeros acrílicos *(Harmon y col., 2003)* y de entramados semi-interpentrados acrílicos *(Siddhantaa y Gangopadhyay, 2005)*.

En resumen, todos los IPNs de HPβCD-carbopol, incluso los que incorporan la proporción más alta de carbopol, presentan una consistencia suficiente para ser manipulados sin riesgo de fragmentación, aunque por su deformabilidad no plantean

riesgos de daño mecánico cuando entren en contacto con los tejidos biológicos al usarlos como componentes de sistemas de liberación de fármacos.

La capacidad bioadhesiva de los IPNs se cuantificó como el trabajo necesario para separar el hidrogel de un sustrato de piel curtida. En publicaciones previas se ha demostrado que existe una estrecha relación entre el trabajo de adhesión a este sustrato y el obtenido si se utiliza mucosa sublingual y que, si no existe limitación de agua, los resultados obtenidos son muy similares *(Blanco-Fuente y col., 1996)*. Los experimentos, que se llevaron a cabo con IPNs hidratados en agua, revelaron un notable incremento en la capacidad bioadhesiva de los IPNs a medida que aumenta su contenido en carbopol, alcanzándose un máximo para el IPN preparado con una concentración de carbopol del 0.8%, lo que sin duda está relacionado con la presencia de grupos ácido carboxílico en su estructura.

4.2.2.d. Carga y cesión de fármacos hidrofóbicos

Finalmente, se evaluó la utilidad de los IPNs como vehículos de estradiol y ketoconazol, dos fármacos pertenecientes a la Clase II del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica. En primer lugar se procedió a cargar los hidrogeles por inmersión en suspensiones acuosas de estos fármacos, sometiendo algunos de ellos a autoclavado. Los IPNs preparados con un 0.2 y un 0.4% de carbopol mostraron un capacidad de carga de estradiol ligeramente inferior a la del hidrogel control de HPβCD, mientras que los IPNs preparados con las proporciones más altas de carbopol incorporaron cantidades mayores de fármaco. Como cabía esperar de los estudios de solubilidad, el autoclavado potenció hasta en un 50% la incorporación de estradiol en el hidrogel control de HPβCD.

El estradiol se puede incorporar a los IPNs por simple equilibrio entre su fase acuosa y la disolución de carga, y por complejación con las unidades de ciclodextrina.

Al aumentar el contenido en carbopol de los IPNs, se incrementa el volumen de agua que pueden alojar, por lo que la cantidad de fármaco cargada por el primer mecanismo será también mayor. Teniendo en cuenta la solubilidad en agua del estradiol (5.17 mg/l), la cantidad máxima de este fármaco que se puede alojar en la fase acuosa del hidrogel de HPβCD es 0.050 mg/g. Sin embargo, este hidrogel es capaz de cargar de 145 a 211 veces más de estradiol. Resultados similares se obtuvieron para los IPNs preparados con un 0.2 y un 0.4% de carbopol. Finalmente, los IPNs preparados con un 1% de carbopol pueden cargar hasta 0.10 mg/g en su fase acuosa, valor 121 a 139 veces inferior a la carga total de fármaco. Esto indica que en los IPNs la mayor parte del estradiol se encuentra formando complejos de inclusión con las unidades de ciclodextrina.

Los valores de $K_{N/W}$ ponen claramente de manifiesto que los IPNs preparados con 1% de carbopol pueden cargar estradiol con una afinidad incluso superior a la del hidrogel control, independientemente del tratamiento térmico que se aplique durante el proceso de carga. Este efecto puede tener su origen en la mayor flexibilidad y capacidad de hinchamiento de estos IPNs, que debe facilitar la difusión del fármaco hacia su interior y su interacción con las unidades de ciclodextrina. El marcado descenso en el número de ciclodextrinas libres en estos IPNs apoya esta hipótesis. Es importante señalar que, en las condiciones del estudio, no se alcanza la saturación permaneciendo un porcentaje importante de cavidades de ciclodextrina libres en los IPNs. No obstante, 100-200 mg de IPN serían suficientes para cargar la dosis habitual de estradiol.

De manera análoga, el autoclavado incrementó también notablemente la cantidad de ketoconazol cargada por el hidrogel control de HPβCD y por los IPNs (230-561%), mostrándose de nuevo el IPN preparado con un 1% de carbopol como el de mayor capacidad de carga. Aunque las interacciones iónicas fármaco/carbopol podrían intervenir en el proceso de carga, su contribución debe ser secundaria en comparación con el papel desempeñado por la formación de complejos fármaco-ciclodextrina. En apoyo de esta hipótesis hay que destacar que el carbopol se encuentra neutralizado en los IPNs y que la cantidad total de ketoconazol cargada es considerablemente mayor

(hasta 286 veces para el IPN con 1% de carbopol) que la que se puede alojar en la fase acuosa del entramado por simple equilibrio con el medio acuoso externo (0.11 mg/g). Al igual que en el caso del estradiol, los IPNs con un 0.8 y un 1% de carbopol mostraron los valores más altos de $K_{N/W.}$

Tanto el hidrogel de HPβCD como los IPNs mostraron una notable capacidad para prolongar la cesión del estradiol y del ketoconazol (Figuras 4.7 y 4.8), lo que sin duda debe estar relacionada con la elevada afinidad de estos fármacos por la ciclodextrina.

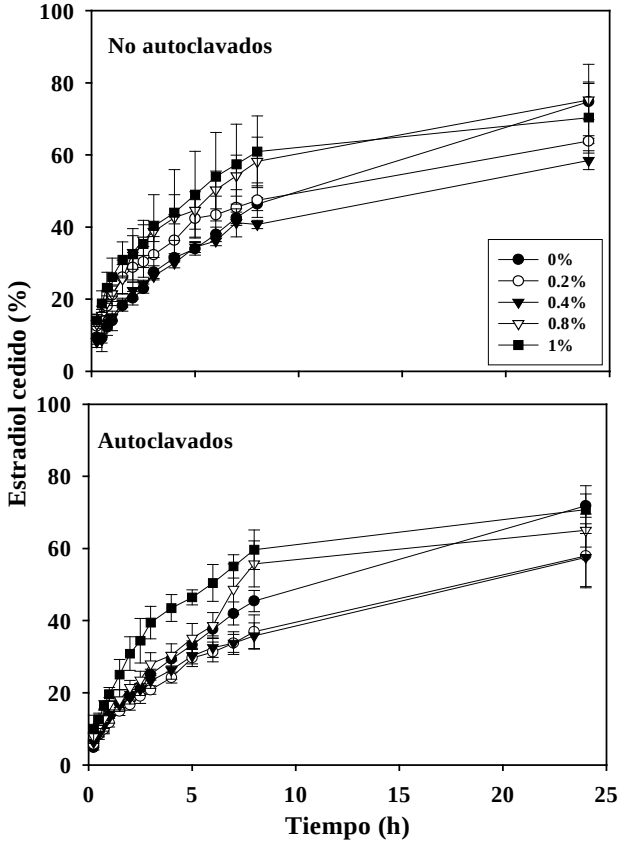


Figura 4.7.- Perfiles de cesión del estradiol a partir de los IPNs preparados con diferentes proporciones de carbopol.

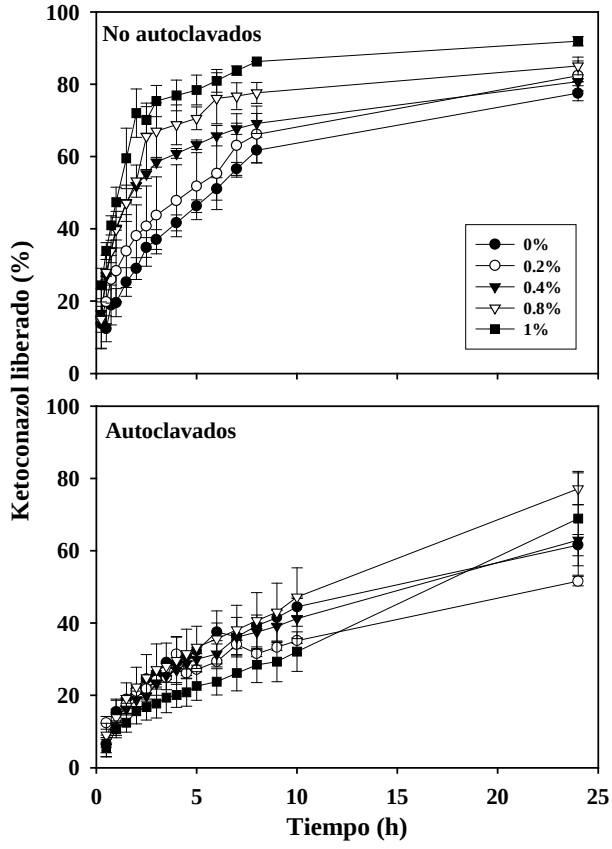


Figura 4.8.- Perfiles de cesión del ketoconazol a partir de los IPNs preparados con diferentes proporciones de carbopol.

En el caso del estradiol, la aplicación del autoclavado durante el proceso de carga no repercutió significativamente en la velocidad de cesión del fármaco (Figura 4.7), pero sí lo hizo en el caso del ketoconazol (Figura 4.8). Este hecho puede estar relacionado con el incremento en el valor de la constante de afinidad del ketoconazol por la ciclodextrina cuando se aplica el proceso de autoclavado (3.3 *vs.* 33.9 mM^{-1}). También se observa que al incrementarse la proporción de carbopol en los IPNs, el proceso de cesión transcurre de manera más rápida, lo que se puede atribuir a su mayor grado de hinchamiento y, en consecuencia, a su mayor tamaño de malla.

5. Conclusiones

De los resultados de las investigaciones que se recogen en la memoria, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

a) La reticulación con etilenglicoldiglicidil éter permite preparar en condiciones suaves y en una única etapa hidrogeles de ciclodextrinas, de ciclodextrinas y éteres de celulosa, o de ciclodextrinas y gomas guar. La utilización de concentraciones iguales o superiores al 14.28% de hidroxipropil-β-ciclodextrina, metil-β-ciclodextrina o γ-ciclodextrina y de etilenglicoldiglicidil éter hace posible que el 60% de los grupos hidroxilo de las ciclodextrinas formen enlaces covalentes con el agente reticulante, dando lugar a hidrogeles continuos que no experimentan pérdidas de peso por disolución parcial o por erosión durante los procesos de lavado y manipulación. La incorporación de polisacáridos semisintéticos permite ampliar el intervalo de proporciones ciclodextrina/agente reticulante en el que es posible conseguir la formación de hidrogeles.

b) Los hidrogeles mantienen la conocida capacidad de las unidades ciclodextrina libres para formar complejos de inclusión con fármacos, y presentan excelentes propiedades de hinchamiento y consistencia si se les incorporan polisacáridos semisintéticos. Los procesos de incorporación y cesión de diclofenaco o estradiol a estos hidrogeles está mayoritariamente controlada por la afinidad entre estos fármacos y las ciclodextrinas. La capacidad de carga de los hidrogeles supera hasta 5 y 500 veces, respectivamente, las cantidades de diclofenaco y de estradiol que se incorporarían si el proceso estuviese regulado por su simple incorporación a la fase acuosa del hidrogel. Los perfiles de cesión obtenidos prueban que los hidrogeles son capaces de sostener el proceso durante períodos de tiempo que llegan a siete días, y que pueden ajustarse a distintas necesidades terapéuticas a través de una correcta selección de la naturaleza o la proporción del derivado celulósico que se co-reticule con la ciclodextrina.

c) El procedimiento que se ha desarrollado para reticular ciclodextrinas en presencia de microgeles de carbopol permite obtener, en una sola etapa, entramados interpenetrados que combinan la capacidad de carga de los hidrogeles de ciclodextrina con la aptitud para responder a cambios de pH y la capacidad bioadhesiva que son características del ácido poliacrílico. Estos hechos se explican porque los fenómenos de interacción carbopol/ciclodextrina en medio acuoso son de baja intensidad y la reactividad del etilenglicodiglicidil éter con los microgeles es nula. Los estudios de carga y cesión que se llevaron a cabo con estradiol y ketoconazol ponen de manifiesto que estos sistemas interpenetrados tienen un gran potencial como componentes de formas de liberación controlada de fármacos.

6. Bibliografía

Albers, E. y Muller, B.W. "Complexation of steroid hormones with cyclodextrin derivatives: substituent effects of the guest molecule on solubility and stability in aqueous solution" *J. Pharm. Sci.* 81 (1992) 756-761.

Alvarez-Lorenzo, C., Lorenzo-Ferreira, R.A., Gomez-Amoza, J.L., Martínez-Pacheco, R., Souto, C. y Concheiro, A. "A comparison of gas-liquid chromatography, NMR spectroscopy and Raman spectroscopy of the substituent content of general non-ionic cellulose ethers" *J. Pharm. Biomed. Anal.* 20 (1999) 373-383.

Alvarez-Lorenzo, C. y Concheiro, A. "Molecularly imprinted polymers for drug delivery" *J. Chromatogr. B* 804 (2004) 231-245.

Allinger, N.M., Cava, M.P., de Jongh, D.C., Johnson, C.R., Lebel, N.A. y Stevens, C.L. *Química Orgánica,* 2ª Ed. Reverté S.A., Barcelona, 1988, p. 639.

Amidon G.L., Lennernäs, H., Shah, V.P. y Crison, J.R. "A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability" *Pharm. Res.* 12 (1995) 413-420.

Amiya, T. y Tanaka, T. "Phase transitions in cross-linked gels of natural polymers" *Macromolecules* 20 (1987) 1162–1164.

Arima, H., Yunomae, K., Miyake, K., Irie, T., Hirayama, F. y Uekama, K. "Comparative studies of the enhancing effects of cyclodextrins on the solubility and oral bioavailability of tacrolimus in rats" *J. Pharm. Sci*. 90 (2001) 690-701.

Arima, H., Hagiwara, Y., Hirayama, F. y Uekama, K. "Enhancement of antitumor effect of doxorubicin by its complexation with γ-cyclodextrin in pegylated liposomes" *J. Drug Target.* 14 (2006) 225-232.

Asanuma, H., Akiyama, T., Kajiya, K., Hishiya, T. y Komiyama, M. "Molecular imprinting of cyclodextrin in water for the recognition of nanometer-scaled guests" *Anal. Chim. Acta* 435 (2001) 25-33.

Asanuma, H., Hishiya, T. y Komiyama, M. "Efficient separation of hydrophobic molecules by molecularly imprinted cyclodextrin polymers" *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 50 (2004) 51-55.

Baldet-Dupi, P. y Deratani, A. "Cyclodextrin-containig membranes. Synthesis and separation properties in pertraction". *Proc. Int. Sump. Cyclodextrins* 9^{th}, (1999) 193-196.

Barreiro-Iglesias, R., Alvarez-Lorenzo, C. y Concheiro, A. "Thermal and FTIR characterization of films obtained from carbopol/surfactant aqueous solutions" *J. Therm. Anal. Calorim.* 68 (2002) 479-488.

Bettinetti, G.P., Mura, P., Liguori, A. y Bramanti, G. "Solubilization and interaction of naproxen with cyclodextrins in aqueous solution and in solid state" *Il Farmaco* 44 (1989) 195-213.

Bender, M.L. y Komiyama, M., "Cyclodextrin Chemistry" Springer-Verlag, Berlín, 1978.

Bibby, D.C., Davies, N.M. y Tucker, I.G. "Mechanism by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems" *Int. J. Pharm.* 197 (2000) 1-11.

Blanco-Fuente, H., Vila-Dorrio, B., Anguiano-Igea, S., Otero-Espinar, F.J. y Blanco-Méndez, J. "Tanned leather: a good model for determining hydrogels bioadhesion" *Int. J. Pharm.* 138 (1996) 103-112.

Botsi, A., Yannakopoulou., K., Perly, B. y Hadjoudis, E. "Positive or adverse effects of methylation on the inclusion behavior of cyclodextrins-a comparative NMR-

study using pheromone constituents of the olive fruit-fly" *J. Org. Chem.* 60 (1995) 4017-4023.

Brewster, M.E., Anderson, W.R., Estes, K.S. y Bodor, N. "Development of aqueous parenteral formulations for carbamazepine through the use of modified cyclodextrins" *J. Pharm. Sci.* 80 (1991) 380-393.

Brewster, M.E. y Loftsson, T. "Complexation-use of cylodextrin to improve pharmaceutical properties of intramuscular formulations". En: *Injectable drug development. Techniques to reduce pain and irritation.* Gupta, P.K. y Brazeau G.A. (Eds.), Interpharm Press, Denver, USA, 1999, pp. 307-336.

Bustamante, P., Peña, M.A. y Barra, J. "The modified extended Hansen method to determine partial solubility parameters of drugs contaning a single hydrogen bonding group and their sodium derivatives: benzoic acid/Na and ibuprofen/Na" *Int. J. Pharm.* 194 (2000) 117-124.

Cabral Marques, H.M. "Applications of cyclodextrins. Thermodynamic aspects of cyclodextrin complexes" *Rev. Port. Farm.* 44 (1994) 77-84.

Capitan, D., Nobile, M.A., Mensitieri, G., Sannino, A. y Segre, A.L. "^{13}C solid state NMR determination of crosslinking degree in superabsorbing cellulose-based networks" *Macromolecules* 33 (2000) 430-437.

Challa, R., Ahuja, A., Ali, J. y Khar, R.K. "Cyclodextrins in drug delivery: an updated review" *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 6 (2005) 329-357.

Chien, Y.W. y Lin, S.S. "Optimisation of treatment by applying programmable rate-controlled drug delivery technology" *Clin. Pharmacokinet.* 41(2002) 1267-1299.

Chin, T.F., Chung, P.H. y Lanch J.L. "Influence of cyclodextrins on ester hydrolysis" *J. Pharm. Sci.* 57 (1968) 44-48.

Coughlan, D.C., Quilty, F.P. y Corrigan, O.I. "Effect of drug physicochemical properties on swelling/deswelling kinetics and pulsatile drug release from thermoresponsive poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels" *J. Control. Release* 98 (2004) 97-114.

Cramer, F., Saenger, W. y Satz, H.C. "Inclusion compounds. XIX. The formation of inclusion compounds of α-cyclodextrin in aqueous solutions, thermodynamics and kinetics" *J. Am. Chem. Soc*. 89 (1967) 14-20.

Crini, G., Torri, G., Guerrini, M., Martel, B., Lekchiri, Y. y Morcellet, M. "Linear cyclodextrin-poly(vinyalmine): Síntesis and NMR characterization" *Eur. Polym. J*. 33 (1997) 1143-1151.

Crini G., Janus, L., Morcellet, M., Torri G., Naggi, A., Bertini, S. y Vecchi, C. "Macroporous polyamines containing cyclodextrin: Synthesis, characterization and sorption properties" *J. Appl. Polym. Sci.* 69 (1998) 1419-1427.

Crini, G. y Morcellet, M. "Synthesis and applications of adsorbents containing cyclodextrins" *J. Sep. Sci*. 25 (2002) 789-813.

Cserhati, T. y Forgacs, E. "Retention of some monoamine-oxidase inhibitory drugs on a β-cyclodextrin polymer-coated silica column" *J. Chromatogr*. 660 (1994) 313-318.

Cserhati, T., Fenyvesi, E. y Szejtli, J. "Interaction of nonylphenyl and tributylphenyl ethylene-oxide ionic surfactants with highly soluble cyclodextrin derivatives" *J. Incl. Phenom. Mol. Recog. Chem.* 14 (1992) 181-188.

Davis, M. E. y Brewster, M. E. "Cyclodextrin-based pharmaceutics: past, present and future" *Nat. Rev. Drug Discov.* 3 (2004) 1023-1035.

Deratani, A., Pöpping G.B. y Muller, G. "Linear cyclodextrin-containig polyelectrolytes. 1. Synthesis of poly(1-vinylimidazole)-supported beta-cyclodextrin. Effect of pH and ionic strength on the solution behavior" *Macromol. Chem. Phys*. 196 (1995) 343-352.

Doelker, E. "Water swollen cellulose derivatives in pharmacy". En *Hydrogels in Medicine and Pharmacy*. Vol. 2. Peppas, N.A.(Ed.), CRC Boca Raton, Florida, 1987, pp. 115-160.

Doelker, E. "Cellulose derivatives" *Adv. Polym. Sci.* 107 (1993) 200-265.

Duchêne, D. y Wouessidjewe, D. "Pharmaceutical uses of cyclodextrins and derivatives" *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 17 (1990) 2487-2499.

Duchêne, D., Ponchel, G. y Wouessidjewe, D. "Cyclodextrins in targeting. Application to nanoparticles" *Adv. Drug Deliv. Rev*. 36 (1999) 29-40.

Esclusa-Diaz, M.T., Gayo-Otero, M., Pérez-Marcos, M.B., Vila-Jato, J.L. y Torres-Labandeira, J.J. "Preparation and evaluation of ketoconazole-β-cyclodextrin multicomponent complexes" *Int. J. Pharm.* 142 (1996) 183-187.

European pharmacopeia, 4ª y 5ª Ed., Council of Europe, Maisonneuve S.A., 2005.

Fallons, M.S. y Chauhan, A. "Sequestration of amitriptyline by liposomes" *J. Colloid. Interf. Sci.* 300 (2006) 7-19.

Faraji, H. "β-cyclodextrin-bonded silica particles as the solid-phase extraction medium for the determination of phenol compounds in water samples followed by gas chromatography with flame ionization and mass spectrometry detection" *J. Chromatogr. A* 1087 (2005) 283-288.

Farmacopea Japonesa, 14ª Ed., Society of Japanese Pharmacopoeia, 2002.

Fatouros, D.G., Hatzidimitriou, K. y Antimisiaris, S.G. "Liposomes encapsulating prednisolone and prednisolone-cyclodextrin complexes: comparison of membrane integrity and drug release" *Eur. J. Pharm. Sci.* 13 (2001) 287-296.

Faucci, M.T. y Mura, P. "Effect of water-soluble polymers on naproxen complexation with natural and chemically modified b-cyclodextrins" *Drug. Devel. Ind. Pharm.* 27 (2001) 909-917.

Fenyvesi, E., Shirakura, O., Szejtli, J. y Nagai, T. "Pharmaceutical interactions in dosage forms and processing. 44. Properties of cyclodextrin polymer as a tabletting aid" *Chem. Pharm. Bull.* 32 (1984) 665-669.

Fenyvesi, E., Szejtli, J., Zsaon, B., Antal, B. y Wagner, P "Water-swellable cyclodextrin polymers" U.S. Pat. 4547572, 1985 Hung. Teljes HU 34226.

Fenyvesi, E., Ujhazy, A., Szejtli, J., Putter, S. y Gan, T.G. "Controlled release of drugs from cyclodextrin polymers substituted with ionic groups" *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 25 (1996) 185-189.

Fernandes, C.M. y Veiga, F.J. "The cyclodextrins as modelling agents of drug controlled release" *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 44 (2002) 79-85.

Fernandes, C.M., Ramos P., Falcao, A.C. y Veiga, F.J. "Hydrofilic and hydrophobic cycldextrins in a new sustained release oral formulation of nicardipine: in vitro evaluation and bioavailability studies in rabbits" *J. Control. Release* 88 (2003) 127-134.

Filipovic-Grcic, J., Laan, M.B., Skalko, N. y Jalsenjak, I. "Chitosan Microspheres of nifedipine and nifedipine-cyclodextrin inclusion complexes" *Int. J. Pharm.* 135 (1996) 183-190.

Filipovic-Grcic, J., Voinovich, D., Moneghini, M., Becirevic-Lacan, M., Magarotto, L. y Jalsenjak, I. "Chitosan microspheres with hydrocortisone and hydrocortisone-hydroxypropyl-β-cyclodextrin inclusion complex" *Eur. J. Pharm. Sci.* 9 (2000) 373-379.

French, D. "The Schardinger dextrins" *Adv. Carboh. Chem.* 12 (1957) 189-260.

Friedman, R.B. "Cyclodextrin-containing polymers". En "*New trends in cyclodextrins and derivatives*", Duchêne, D. (Ed), Editions de Santé, Paris, 1991, pp. 157-178.

Frömming, K.H. y Szejtli, J. *Cyclodextrins in Pharmacy*. Davies, J.E.D. (Ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1994, pp. 29-32.

Fundueanu G., Constantin, M., Mihai, D., Bortolotti, F., Cortesi, R., Ascenzi, P. y Menegatti, E. "Pullulan-cyclodextrin microspheres– A chromatographic approach for the evaluation of the drug-cyclodextrin interactions and the determination of the drug release profiles" *J. Chromatogr. B* 791 (2003) 407-419.

Gehrke, S.H., Biren, D. y Hopkins, J.J. "Evidence for Fickian water transport in initially glassy poly(2-hydroxyethyl methacrylate)" *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* 6 (1994) 375-390.

Gorecka, B.A., Sanzgiri, Y.D., Bindra, D.S. y Stella, V. "Effect of SBE4-β-CD, a sulfobutyl ether β-cyclodextrin, on the stability and solubility of O^6-benzylguanine (NSC-637037) in aqueous solutions" *Int. J. Pharm.* 125 (1995) 55-61.

Granero, G. y Longhi, M. "Thermal analysis and spectroscopic characterization of interactions between a naphthoquinone derivative with HP-β-CD or PVP" *Pharm. Dev. Technol.* 7 (2002) 381-390.

Gulsen D. y Chauhan, A. "Dispersion of microemulsion drops in HEMA hydrogel: a potential ophtalmic drug delivery vehicle" *Int. J. Pharm.* 292 (2005) 95-117.

Hadaruga, N.G., Hadaruga, D.I., Paunescu, V., Tatu, C., Ordodi, V.L. Bandur, G. y Lupea, A.X. "Thermal stability of the linoleic acid/ α- and β-cyclodextrin complexes" *Food Chem.* 99 (2006) 500-508.

Harada, A., Furue, M. y Nozakura, S. "Cyclodextrin-containing polymers. 1. Preparation of polymers" *Macromolecules* 9 (1976) 701-704.

Harada, A., Furue, M. y Nozakura, S. "Inclusion of aromatic-compounds by a β-cyclodextrin-epichlorohydrin polymer" *Polym. J.* 13 (1981) 777-781.

Harada, A. y Kamachi, M. "Complex-formation between cyclodextrin and poly(propylenglycol)" *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 19 (1990) 1322-1323.

Harada, A., Li., J. y Kamachi, M "Complex-formation between poly(methyl vinyl ether) and γ–cyclodextrin" *Chem. Lett.* 2 (1993) 237-240.

Harada, A., Li, J. y Kamachi, M. "Preparation and characterization of a polyrotaxane consisting of monodisperse poly(ethyleneglycol) and α-cyclodextrins" *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994) 3192-3196.

Harada, A. "Design and construction of supramolecular architectures consisting of cyclodextrin and polymers" *Adv. Polym. Sci.* 133 (1997) 141-191.

Harmon, M.E., Kuckling, D y Frank C.W. "Photo-cross-linkable PNIPAAm copolymers. 5. Mechanical properties of hydrogel layers" *Langmuir* 19 (2003) 10660-10665.

Hedges, A.R. "Industrial applications of cyclodextrins" *Chem. Rev.* 98 (1998) 2035-2044.

Hersey, A., Robinson, B.H. y Kelly, H.C. "Mechanism of inclusion compound formation for binding of organic dyes, ions and surfactants to α-cyclodextrin studied by kinetic methods based on competition experiments" *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 1. 82 (1986) 1271-1287.

Higuchi, T. y Connors, K.A. "Phase solubility techniques" *Adv. Anal. Chem. Instrum.* 4 (1965) 117-212.

Hiratani, H., Mizutani, Y. y Alvarez-Lorenzo, C. "Controlling drug release from imprinted hydrogels by modifying the characteristics of the imprinted cavities" *Macromol. Biosci*. 5 (2005) 728-733.

Hirayama, F. y Uekama, K. "Methods of investigating and preparing inclusion compounds". En: *Cyclodextrins and their industrial uses.* Duchêne, D. (Ed.) Editions de Santé, París, 1987, pp. 131-172.

Hirayama, F., Yamanaka, M., Horikawa, T. y Uekama, K. "Characterization of peracylates β-cyclodextrins with different chain lengths as a novel sustained-release carrier for water soluble drugs" *Chem. Pharm. Bull*. 43 (1995a) 130-136.

Hirayama, F., Horikawa, T., Yamanaka, M. y Uekama, K. "Enhanced bioavailability and reduced metabolism of salbutamol by perbutanoyl β-cyclodextrin after oral administration in dogs" *J. Pharm. Sci*., 1 (1995b) 517-520.

Hirayama, F., Usami, M., Kimura, K. y Uekama, K. "Crystallization and polymorphic transition behavior of chloramphenicol palmitate in 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin matrix" *Eur. J. Pharm. Sci*. 5 (1997) 23-30.

Hirayama, F. y Uekama, K. "Cyclodextrin-based controlled drug release system" *Adv. Drug Del. Rev*. 36 (1999) 125-141.

Hishiya, T., Shibata, M., Kakazu, M., Asanuma, H. y Komiyama, M. "Molecularly imprinted cyclodextrins as selective receptors for steroids" *Macromolecules* 32 (1999) 2265-2269.

Hladon, T. y Cwiertina, B. "Physical and chemical interaction between cellulose ethers and β-cyclodextrins" *Pharmazie* 49 (1994) 497-500.

Hoffman, A.S. "Hydrogels for biomedical applications" *Adv. Drug. Del. Rev.* 43 (2002) 3-12.

Hollas, M., Chung, M.A. y Adams, J. "Complexation of pyrene by poly(allylamine) with pendant β-cyclodextrin side groups" *J. Phys. Chem. B.* 102 (1998) 2947-2953.

Huang, Y. y Fan, X.D. "Study on hydrogels of β -cyclodextrin-crosslinked acrylic acid and their controlled drug release behavior" *Acta Polym. Sin.* 3 (2006) 505-509.

Ikeda, I., Kimura, K., Hirayama, F., Arima, H. y Uekama, K. "Controlled release of a water-soluble drug, captopril, by a combination of hydrophilic and hydrophobic cyclodextrin derivatives" *J. Control. Release* 66 (2000) 271-280.

Iliescu T., Baia, M. y Miclaus, V. "A Raman spectroscopic study of the diclofenac-sodium-β-cyclodextrin interaction" *Eur. J. Pharm. Sci*. 22 (2004) 487-495.

Irie, T., Otagiri, M., Sunada, M., Uekama, K., Ohtani, Y., Yamada, Y. y Sugiyama, Y. "Cyclodextrin-induced hemolysis and shape changes of human-erythrocytes in vitro" *J. Pharmacobio-Dyn* 5 (1982) 741-744.

Irie, T. y Uekama, K. "Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation" *J. Pharm. Sci*. 86 (1997) 147-162.

Irie, T. y Uekama, K. "Cyclodextrins in peptide and protein delivery" *Adv. Drug Del. Rev*. 36 (1999) 101-123.

Kamada, M., Hirayama, F., Udo, K., Yano, H., Arima, H. y Uekama, K. "Cyclodextrin conjugate-based controlled release system: repeated- and prolonged-releases of ketoprofen after oral administration in rats" *J. Control. Release* 82 (2002) 407-416.

Kanis, L. A., Viel, F.C., Crespo, J.S., Bertolino, J.R., Pires, A.T.N. y Soldi, V. "Study of poly(ethylene oxide)/Carbopol blends through thermal analysis and infrared spectroscopy" *Polymer* 41 (2000) 3303-3309.

Kanjickal, D., Lopina, S., Evancho-Chapman, M.M., Schmidt, S. y Donovan, D. "Improving delivery of hydrophobic drugs from hydrogels through cyclodextrins" *J. Biomed. Mater. Res.* 74A (2005) 454-460.

Kawaguchi, T. "Manufacture of methylated mono-6-deoxyamino cyclodextrins and their inclusion compounds", Jpn. Kokai Tokkio Koho JP 03 100 002 (1996).

Kim, S.W., Bae, Y.H. y Okano, T. "Hydrogels: swelling, drug loading and release" *Pharm. Res.* 9 (1992) 283-290.

Kimura, K., Hirayama, F., Arima, H. y Uekama, K. "Solid-state ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopic study on amorphous solid complexes of tolbutamide with 2-hydroxypropyl-α- and -β-cyclodextrins" *Pharm. Res.* 16 (1999) 1729-1734.

Konstance, R.P. "Axial compression properties of calcium caseinate gels" *J. Dairy Sci.* 76 (1993) 3317-3326.

Kraus, C., Mehnert, W. y Frömming, H.-H. "Interactions of β-cyclodextrin with Solutol® HS and their influence on diazepam solubilization" *Pharm. Ztg. Wiss*. 136 (1991) 11-16.

Kuhl, H. "Pharmacology of estrogens and progestagens: influence of different routes of administration" *Climateric* 8 (2005) 3-63.

Langkilde, F.W. y Svantesson, A. "Identification of celluloses with Fourier-ttansform (FT) mid-infrared, FT-Raman and near-infrared spectrometry" *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13 (1995) 409-414.

Layre, A.M., Gosselet, N. M., Renard, B., Sebille, B. y Amiel. C. "Comparison of the complexation of cosmetical and pharmaceutical compounds with γ-cyclodextrin, 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin and water-soluble β-cyclodextrin-co-epichlorohydrin polymers" *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*43 (2002) 311-317.

Lee, K.Y., Rowley, J.A., Eiselet, P., Moy, E.M., Bouhadir, K.H. y Mooney, D.J. "Controlling machanical and swelling properties of alginate hydrogels independently by cross-linker type and cross-linking density" *Macromolecules* 33 (2000) 4291-4294.

Lee, M.H., Yoon, K.J. y Ko, S.W. "Synthesis of a vinyl monomer containing β-cyclodextrin and grafting onto cotton fiber" *J. Appl. Polym. Sci.* 80 (2001) 438-446.

Lee, K.P., Choi, S.H., Ryu, F.N., Ryoo, J.J., Park, J.H., Kim, Y. y Hyun, M.H. "Preparation and characterization of cyclodextrin polymer and its High-Performance Liquid-Chromatography Stationary Phase" *Anal. Sci.* 18 (2002) 31-34.

Lehner, S.J., Müller, B.W. y Seydel, J.K. "Interactions between p-hydroxybenzoic acid-esters and hydroxypropyl-β-cyclodextrin and their antimicrobial effect against *Candida albicans* "*Int. J. Pharm.* 93 (1993) 201-208.

Li, W. H., Hamielec, A. E. y Crowe, C. M. "Kinetics of free-radical cppolymerization of methyl-methacrylate ethylene-glycol dimethacrylate. 1. Experimental investigation" Polymer 30 (1989) 1513-1517.

Li, J., Ni, X. y Leong., K.W. "Injectable drug-delivery systems based on supramolecular hydrogels formed by poly(ethylene oxide)s and α-cyclodextrin" *J. Biomed. Mater. Res.* 65 (2003) 196-202.

Li, J., Xiao, H., Li, J. y Zhong, Y.P. "Drug carrier systems based on water soluble cationic β-cyclodextrin polymers" *Int. J. Pharm*. 278 (2004) 329-342.

Liu, L. y Guo, Q-X. "The driving forces in the inclusion complexation of cyclodextrins" *J. Incl. Phenom. Macroc. Chem.* 42 (2002) 1-14.

Liu, Y.Y. y Fan, X.D. "Synthesis and characterization of pH- and temperature-sensitive hydrogel of N-isopropylacrylamide/cyclodextrin based copolymer" *Polymer* 43 (2002) 4997-5003.

Liu, Y.Y., Fan, X.D. y Gao, L. "Sinthesis and characterization of β-cyclodextrin based functional monomers and its copolymers with N-isopropylacrylamide" *Macromol. Biosci.* 3 (2003) 715-719.

Liu, YY., Fan, XD., Kang, T. y Sun, L. "A cyclodextrin microgel for controlled release driven by inclusion effects" *Macromol. Rapid Commun.* 25 (2004a) 1912-1916.

Liu, Y.Y., Fan, X.D., Hu, H. y Tang., Z.H. "Release of chlorambucil from (Poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels with β-cyclodextrin moieties" *Macromol. Biosci.* 4 (2004b) 729-736.

Liu, Y.Y., Fan, X.D. y Zhao, Y.B. "Synthesis and characterization of a poly(N-isopropylacrylamide) with β-cyclodextrin as pendant groups" *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* 43 (2005) 3516-3524.

Liu, Y.Y. y Fan, X.D. "Sinthesis, properties and controlled release behaviors of hydrogel networks using cyclodextrin as pendant groups" *Biomaterials* 26 (2005) 6367-6374.

Loftsson, T., Brewster, M.E., Derendorf, H. y Bodor, N. "2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin: Properties and usage in pharmaceutical formulations" *Pharm. Ztg. Wiss.* 136 (1991) 5-10.

Loftsson, T., Stéfansdóttir, Ó., Fridriksdóttir, H. y Gudmundsson, Ó. "Interactions between preservatives and 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin" *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 18 (1992) 1477-1484.

Loftsson, T., Olafsdóttir, B.J., Fridriksdóttir, H. y Jónsdóttir, S. "Cyclodextrin complexation of NSAIDS - physicochemical characteristics" *Eur. J. Pharm. Sci.* 1 (1993) 95-101.

Loftsson, T., Fridriksdóttir, H., Thórisdóttir, S. y Stefánsson, E. "The effect of hydroxypropyl methylcellulose on the release of dexamethasone from aqueous 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin formulations" *Int. J. Pharm.* 104 (1994a) 181-184.

Loftsson, T., Fridriksdóttir, H., Sigurdadóttir, A.M. y Ueda, H. "The effect of water-soluble polymers on drug-cyclodextrin complexation" *Int. J. Pharm.* 110 (1994b) 169-177.

Loftsson, T. y Sigurdadóttir, A.M. "The effect of polyvinylpyrrolidone and hydroxypropylmethylcellulose on hydroxypropyl-β-cyclodextrin complexation of hydrocortisone and its permeability through hairless mouse skin" *Eur. J. Pharm. Sci*. 2 (1994c) 297-301.

Loftsson, T. y Brewster, M.E. "Pharmaceutical applications of cyclodextrins. I. Drug solubilization and stabilization" *J. Pharm. Sci.* 85 (1996) 1017-1025.

Loftsson, T. "Increasing the cyclodextrin complexation of drugs and drug bioavailability through addition of water-soluble polymers" *Pharmazie* 53 (1998) 733-740.

Loftsson, T., Másson, M. y Sigurjónsdóttir, J.F. "Methods to enhance the complexation efficiency of cyclodextrins" *S.T.P. Pharma Sci.* 9 (1999) 237-242.

Loftsson, T., Magnúsdóttir, A., Másson, M. y Sigurjónsdóttir, J.F. "Self-association and cyclodextrin solubilization of drugs" *J. Pharm. Sci.* 91 (2002) 2307-2316.

Loftsson, T., Gudmundsson, J.A., Árnadóttir, R.O. y Fridriksdóttir, H. "Sublingual delivery of 17β-estradiol from cyclodextrin containing tablets" *Pharmazie* 58 (2003) 358-359.

Loftsson, T., Másson, M. y Brewster, M.E. "Self-association of cyclodextrin and cyclodextrin complexes" *J. Pharm. Sci.* 93 (2004a) 1091-1099.

Loftsson T., Brewster, M.E. y Másson, M. "Role of cyclodextrins in improving oral drug delivery" *Am. J. Drug Del*. 2 (2004b) 261-275.

Loftsson, T. y Másson, M. "The effects of water-soluble polymers on cyclodextrins and cyclodextrin solubilization of drugs" *J. Drug. Del. Sci. Tech.* 14 (2004) 35-43.

Loftsson, T., Jarho, P., Másson, M. y Järvinen, T. "Cyclodextrins in drug delivery" *Expert Opin. Drug Del*. 2 (2005a) 335-351.

Loftsson, T., Hreinsdóttir, D. y Másson, M. "Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs" *Int. J. Pharm.* 302 (2005b) 18-28.

Loukas, Y.L., Vraka, V. y Gregoriadis, G. "Drugs, in cylodextrins, in liposomes: a novel approach to the chemical stability of drugs sensitive to hydrolysis" *Int. J. Pharm.* 162 (1998) 137-142.

Macarak, E.J., Kumor, K. y Weisz, P.B. "Sulfation and hemolytic activity of cyclodextrin" *Biochem. Pharmacol.* 42 (1991) 1502-1503.

Maffeo, D., Leondiadis, L., Mavridis, I.M. y Yannakopoulou, K. "Positive effect of natural and negatively charged cyclodextrins on the stabilization of penicillins towards beta-lactamase degradation due to inclusion and external guest-host association. An NMR and MS study" *Org. Biomol. Chem.* 4 (2006) 1297-1304.

Magnusdottir, A., Másson, M. y Loftsson, T. "Self association and cyclodextrin solubilization of NSAIDs" *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 44 (2002) 213-218.

Martel, B. Ruffin, D., Weltrowski, M., Lekchiri, Y. y Morcellet, M. "Water-soluble polymers and gels from the polycondensation between cyclodextrins and poly(carboxylic acid)s: A study of the preparation parameters" *J. Polym. Sci.* 97 (2005) 433-442.

Martel, B. y Morcellet, M. "Cyclodextrin-poly(vinylamine) systems. 2. Catalytic hydrolysis of p-nitrophenyl acetate" *Eur. Polym. J.* 31 (1995) 1089-1093.

Martindale. *The Complete Drug Reference.* Parfitt, K. (Ed.), Pharmaceutical Press, Tauton, MA, 1999, p. 32.

Matsubara, K., Irie, T. y Uekama, K. "Controlled release of the LHRH agonist buserelin acetate from injectable suspensions containing triacetylated cyclodextrins in an oil vehicle" *J. Control. Release* 31 (1994) 173-180.

Matsubara, K., Ando, Y., Irie, T. y Uekama, K., "Protection afforded by maltosyl-β-cyclodextrin against alpha-chymotrypsin-catalyzed hydrolysis of a luteinizing hormone-releasing hormone agonist, buserelin acetate" *Pharm. Res.* 14 (1997) 1401-1405.

McCrystal, C.B., Ford, J.L. y Rajabi-Siahboomi, A.R. "Water distribution studies within cellulose ethers using differential scanning calorimetry. 1. Effect of polymer molecular weight and drug addition" *J. Pharm. Sci.* 88 (1999) 792-801.

Memisoglu, E., Bochot, A., Sen, M., Duchêne, D., y Hincal, A.A. "Non-surfactant nanospheres of progesterone inclusion complexes with amphiphilic β-cyclodextrins" *Int. J. Pharm.* 251 (2003) 143-153.

Merkus, F.W.H.M., Schipper, N.G.M., Hermes, W.A.J.J., Romejin, S.G. y Verhoef, J.C. "Absorption enhancers in nasal drug delivery-efficacy and safety" *J. Control. Release* 24 (1993) 201-208.

Mizobuchi, Y., Tanaka, M. y Shono, T. "Preparation and sorption behavior of cyclodextrin polyurethane resins" *J. Chromatogr*. 194 (1980) 153-161.

Miyake, K., Arima, H., Irie, T., Hirayama, F. y Uekama, K. "Enhanced absorption of cyclosporin A by complexation with dimethyl-β-cyclodextrin in bile duct-cannulated and noncannulated rats" *Bio. Pharm. Bull.* 22 (1999) 66-72.

Miyazaga, I., Ueda, H., Nagase, H., Endo, T., Kobayashi, S. y Nagai, T. "Physicochemical properties and inclusion complex-formation of delta-cyclodextrin" *Eur. J. Pharm. Sci*. 3 (1995) 153-162.

Mocanu, G., Despina, V. y Carpov, A. "Cyclodextrin polymers" *J. Bioact. Compat. Pol*. 16 (2001) 315-342.

Mohsenin, N. y Mittal, J.P. "Use of rheological terms and correlation of compatible measurements in food texture research" *J. Texture Stud*. 8 (1977) 395-408.

Monza da Silveira, A., Ponchel, G., Puisieux, F. y Duchêne, D. "Combined poly(isobutylcyanoacrylate) and cyclodextrins nanoparticles for enhancing the encapsulation of lipophilic drugs" *Pharm. Res*. 15 (1998) 1051-1055.

Mounir, A., Darwish, N. y Shehata, A. "Effect of crosslinking concentration on the micelle formation inside the polymer gel network and mechanical properties of sensitive hydrogel polymer in contact with surfactant solutions" *J. Appl. Polym. Sci.* 91 (2004) 3921-3926.

Mura, P., Faucci, M.T. y Bettinetti, G.P. "The influence of polyvinylpyrrolidone on naproxen complexation with hydroxypropyl-β-cyclodextrin" *Eur. J. Pharm. Sci*. 13 (2001) 187-194.

Nakai, Y., Yamamoto, K., Terada, K., Horibe, H. y Ozawa, K. "Interaction of tri-o-methyl-beta-cyclodextrin with drugs. 2. Enhanced bioavailability of ketoprofen in rats when administered with tri-o-methyl-β-cyclodextrin" *Chem. Pharm. Bull.* 31 (1983) 3745-3747.

Nakai, Y., Yamamoto, K., Terada, K. y Watanabe, D. "New methods for preparing cyclodextrin inclusion compounds. I. Heating in a sealed container" *Chem. Pharm. Bull*. 35 (1987) 4609-4615.

Nagase, Y., Hirata, M., Wada, K., Arima, H., Hirayama, F., Irie, T., Kikuchi, M. y Uekama, K. "Improvement of some pharmaceutical properties of DY-9760e by sulfobutylether β-cyclodextrin" *Int. J. Pharm*. 229 (2001) 163-172.

Nagase, Y., Arima, H., Wada, K., Sugawara, T., Satoh, H., Hirayama, F. y Uekama, K. "Inhibitory effect of sulfobutylether β-cyclodextrin on DY-9760e-induced cellular damage: In vitro and in vivo studies" *J. Pharm. Sci.* 92 (2003) 2475-2483.

Noveon™, *The specialty chemicals innovator*, Bulletin 16, 2002, http://www.pharma.noveon.com/Bulletins/epb16.pdf.

Nozaki, T., Maeda, Y. y Kitano, H., "Cyclodextrin gels which have a temperature responsiveness" *J. Polym. Sci. A, Polym. Chem.* 35 (1997) 1535-1541.

Ohtani, Y., Irie, T., Uekama, K., Fukunaga, K. y Pitha, J. "Differential effects of α-, β-, and γ- cyclodextrins on human erythrocytes" *Eur. J. Biochem*. 186 (1989) 17-22.

Okamoto, H., Komatsu, H., Hashida, M. y Sezaki, H. "Effects of beta-cyclodextrin and di-o-methyl-β-cyclodextrin on the percutaneous-absorption of butylparaben, indomethacin and sulfanilic acid " *Int. J. Pharm.* 30 (1986) 35-45.

Okimoto, K., Ohike, A., Ibuki, R., Aoki, O., Ohnishi, N., Irie, T., Uekama, K., Rajewski, V.J. y Stella, V.J. "Design and evaluation of an osmotic pump tablet (OPT) for chlorpromazine using (SBE)(7m)- β-cyclodextrin" *Pharm. Res.* 16 (1999) 549-554.

Osada, Y. "Polymer Gels: Crosslink formations". En: *Gels Handbook*. Volumen 1. Osada, Y. y Kajinara, K. (Eds). Academic Press, San Diego (2001).

Pariot, N., Edwards-Lévy, F., Andry, M.C. y Lévy, M.C. "Cross-linked β-cyclodextrin microcapsules: preparation and properties" *Int. J. Pharm.* 232 (2002) 175-181.

Peppas, N.A., Wood, K.M. y Blanchette, J.O. "Hydrogels for oral delivery of therapeutic proteins" *Expert Opin. Biol. Th.* 4 (2004) 881-887.

Pérez-Marcos, M.B., Martinez-Pacheco, R., Gomez-Amoza, J.L., Souto, C., Concheiro, A. y Rowe, R.C. "Interlot variability of Carbomer-934" *Int. J. Pharm.* 100 (1993) 207-212.

Perlovich, G.L., Skar, M. y Bauer-Brandl, A. "Driving forces and the influence of the buffer composition on the complexation reaction between ibuprofen and HPBCD" *Eur. J. Pharm. Sci.* 20 (2003) 197-200.

Piel, G., Piette, M., Barillaro, V., Castagne, D., Evrard, B. y Delattre, L. "Betamethasone-in-cyclodextrin-in-liposome: the effect of cyclodextrins on encapsulation efficiency and release kinetics" *Int. J. Pharm.* 312 (2006) 75-82.

Pitha, J., Rao, T.C., Lindberg, B. y Sefferes, P. "Distribution of substituents in 2-hydroxypropyl ethers of cyclomaltoheptaose" *Carbohydr. Res*. 200 (1990) 429-435.

Pitha, J. y Hoshino, T. "Effects of ethanol on formation of inclusion complexes of hydroxypropylcyclodextrins with testosterone or with methyl-orange" *Int. J. Pharm.* 80 (1992) 243-251.

Poole, A., van Herwijnen, P., Weideli, H., Thomas, M.C., Ransbotyn, G. y Vance, C. "Review of the toxicology, human exposure and safety assessment for bisphenol A diglycidylether (BADGE)" *Food Addit. Contam.* 21 (2004) 905-919.

Pose-Vilarnovo, B., Santana-Penin, L., Echezarreta-López, M., Pérez-Marcos, M.B., Vila-Jato, J. L. y Torres-Labandeira, J. J. "Interactions of diclofenac sodium with hand hydroxypropyl-β-ciclodextrin in solution" *STP Pharma Sci.* 9 (1999) 231-236.

Pose-Vilarnovo, B., Rodríguez-Tenreiro Sánchez, C., Pérez-Marcos, M.B. y Torres-Labandeira, J.J. "Sulphamethoxazole-cyclodextrin-hydroxypropylmethylcellulose multicomponent complexes" *J. Therm. Anal. Calor*. 68 (2002) 657-667.

Pose-Vilarnovo, B., Rodriguez-Tenreiro Sánchez, C., Dieguez Moure, N., Vila-Jato, J. L. y Torres-Labandeira, J. J. "Effect of hydroxypropylmethyl cellulose on the complexation of diclofenac with cyclodextrin" *J. Therm. Anal. Calor*. 73 (2003) 661-670.

Pose-Vilarnovo, B., Rodríguez-Tenreiro, C., Rosa dos Santos, J.F., Vázquez-Doval, J.,Concheiro, A., Alvarez-Lorenzo, C. y Torres-Labandeira, J.J. "Modulating drug release with cyclodextrins in hydroxypropyl methylcellulose gels and tablets" *J. Control. Release* 94 (2004) 351-363.

Quaglia, F., Varricchio, G., Miro, A., La Rotonda, M.I., Larobina, D. y Mensitieri, G. "Modulation of drug release from hydrogels by using cyclodextrins: the case of nicardipine/β-cyclodextrin system in crosslinked polyethylenglycol" *J. Control. Release* 71 (2001) 329-337.

Rajewski, R.A., Traiger, G., Bresnahan, J., Jaberaboansari, P., Stella, V.J. y Thompson, D.O. "Preliminary safety evaluation of parentally administered sulfoalkyl ether β-cyclodextrin derivatives" *J. Pharm. Sci.* 84 (1995) 927-932.

Rajewski, R.A. y Stella, V.J. "Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery" *J. Pharm. Sci.* (1996) 1142-1169.

Real Farmacopea Española, 3ª Ed., Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, 2005.

Renard, E., Barnathan, G., Deratani, A. y Sebille, B. "Polycondensation of cyclodextrins with epichlorohydrin. Influence of reaction conditions on the polymer structure" *Macromol. Symp*. 122 (1997a) 229-234.

Renard, E., Deratani, A., Volet, G. y Sebille, B. "Preparation and characterization of water soluble high β-cyclodextrin-epichlorohydrin polymers" *Eur. Polym. J.* 33 (1997b) 49-57.

Ridell, A., Evertsson, H., Nilsson, S., y Sundelof, L.O. "Amphiphilic association of ibuprofen and two non-ionic cellulose derivatives in aqueous solution" *J. Pharm. Sci.* 88 (1999) 1175-1181.

Rodríguez, R., Alvarez-Lorenzo, C. y Concheiro, A. "Interactions of ibuprofen with cationic polysaccharides in aqueous dispersions and hydrogels. Rheological and diffusional implications" *Eur. J. Pharm. Sci.* 20 (2003) 429-438.

Rodríguez-Pérez, A.I., Rodríguez-Tenreiro, C., Álvarez-Lorenzo, C., Taboada, P., Concheiro, A. y Torres-Labandeira, J.J. "Sertaconazole/Hydroxypropyl-β-

cyclodextrin complexation: isothermal titration calorimetry and solubility approches" *J. Pharm. Sci.* 95 (2006a) 1751-1762.

Rodríguez-Pérez, A.I., Rodríguez-Tenreiro, C., Álvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A. y Torres-Labandeira, J.J. "Drug solubilization and delivery from cyclodextrin-pluronic aggregates" *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6 (2006b) 3179-3186.

Saenger, W. "Cyclodextrin inclusion-compounds in research and industry" *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 92 (1980) 343-361.

Sakairi, N. "Polymeric inclusion compounds", Jpn. Kokai Tokkio Koho JP 11 279 206 (1999).

Schipper, N.G.M., Hermens, W.A.J.J., Romejin, S.G., Verhoef, J.C. y Merkus, F.W.H.M. "Nasal absorption of 17-β-estradiol and progesterone from a dimethyl-cyclodextrin inclusion formulation in rats" *Int. J. Pharm.* 64 (1990) 61-66.

Schipper, N.G.M., Verhoef, J.C, Romejin, S.G. y Merkus, F.W.H.M. "Absorption enhancers in nasal insulin delivery and their influence on nasal ciliary functioning" *J. Control. Release* 21 (1992) 173-186.

Sellergren, B. y Hall, A. " Fundamental aspect on the synthesis and characterisation of imprinted network polymers". En: *Molecularly imprinted polymers.* Sellergren, B. (Ed.), Elsevier Science B. V., Amsterdam, 2001, pp. 21-57.

Seo, T., Kajihara, T. y Iijima, T. "The synthesis of poly(allylamine)containing covalently bound cyclodextrin and its catalytic effect in the hydrolysis of phenyl-esters", *Makromol. Chem.* 188 (1987) 2071-2082.

Shimamoto, T. "Pharmaceutical aspects - nasal and depot formulations of leuprolide" *J. Androl.* 8 (1987) S14-S16.

Shiotani, K., Uehata, K., Irie, T., Uekama, K., Thompson, D.O. y Stella, V.J. "Differential effects of sulfate and sulfobutylether of β-cyclodextrin on erythrocyte membranes in vitro" *Pharm. Res*. 12 (1995) 78-84.

Siddhanta, S.K. y Gangopadhyay, R. "Conducting polymer gel: formation of a novel semi-IPN from polyaniline and crosslinked poly(2-acrylamido-2-methyl propanesulphonicacid)" *Polymer* 26 (2005) 2993-3000.

Siemoneit, U., Schmitt, C., Alvarez-Lorenzo, C., Luzardo, A., Otero-Espinar, F., Concheiro, A. y Blanco-Mendez, J. "Acrylic/cyclodextrin hydrogels with enhanced drug loading and sustained release capability" *Int. J. Pharm.* 312 (2006) 66-74.

Sigurdadóttir, A.M. y Loftsson, T. "The effect of polyvinylpyrrolidone on cyclodextrin complexation of hydrocortisone and its diffusion through hairless mouse skin" *Int. J. Pharm.* 126 (1995) 73-78.

Skalko, N., Brandl, M., Landan, M.B., Grid, J.F. y Genjak, I.J. "Liposomes with nifedipine and nifedipine-cyclodextrin complex: calorimetrical and plasma stability comparison" *Eur. J. Pharm.* Sci. 4 (1996) 287-296.

Skiba, M., Skiba-Lahiani, M., Marchais, H., Duclos, R. y Arnauld, P. "Stability assessment of ketoconazole in aqueous formulations" *Int. J. Pharm.* 198 (2000) 1-6.

Solms, V.J. y Egli, R.H. "Harze mit Einschlusshohlraumen von Cyclodextrin-struktur" *Helv. Chim. Acta*. 48 (1965) 1225-1228.

Sreenivasan, K. "Studies on polyurethane-β-cyclodextrin copolymers. 1. Synthesis and characterization" *New Polym. Mater.* 5 (1996) 73-79.

Sreenivasan, K. "Synthesis and evaluation of β-cyclodextrin-2-hydroethyl methacrylate copolymer as a novel adsorbent" *Polym. Int.* 42 (1997a) 22-24.

Sreenivasan, K. "On the restriction of the release of water-soluble component from polyvinyl alcohol film by blending β-cyclodextrin" *J. Appl. Polym. Sci.* 65 (1997b) 1829-1832.

Stella, V.J. y Rajewski. R.A. "Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery" *Pharm. Res.* 14 (1997) 556-567.

Stella, V.J., Rao, V.M., Zannou, E.A. y Zia, V. "Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes" *Adv. Drug Del. Rev.* 36 (1999) 3-16.

Sweerman, S.C. "Martindale. The Complete Drug Reference" 33th ed., London, Pharmaceutical Press, 2002.

Szente L. y Szejtli, J. "Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties and trends in development" *Adv. Drug. Del. Rev.* 36 (1999) 17-28.

Szente, L., Apostol, I. Gerloczy, A. y Szejtli, J. "Suppositories containing cyclodextrin complexes. Part 2: Dissolution and absorption studies" *Pharmazie* 40 (1985) 406-407.

Szejtli, J., Fenyvesi, E., Zoltan, S., Zsadon, B. y Tudos, F. "Cyclodextrin-poly(vinyl alcohol) polymers in the form of beads, sheet, fibers o blocks" Hung. Pat 19626; 1979 Belg. Pat. 877653; 1981 U.S. Pat. 4274985 (1979a).

Szejtli, J., Zsadon, B., Fenyvesi, E., Szilasi, M. y Tudos, F. "Water soluble cyclodextrin polymers", Hung. Teljes HU 22968 (1982a).

Szejtli, J. "Cyclodextrin Technology". Davies JED (Ed.) Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands (1988).

Szejtli, J. "Past, present and future of cyclodextrin research" *Pure Appl. Chem.* 76 (2004)1825-1845.

Szeman, J., Ueda, H., Szejtli, J., Fenyvesi, E., Watanabe, Y., Machida, Y. y Nagai, T. "Enhanced percutaneous absorption of homogenized tolnaftate/β-cyclodextrin polymer ground mixture" *Drug Des. Del.* 1 (1987) 325-332.

Tabushi, I., Shimizu, N. y Yamamura, K. "Cyclodextrin derivatives of polystyrene" Jpn. Kokai Tokkio Koho JP 79 61 289 (1979), US Pat. 4 169 079 (1979).

Tamai, Y. y Tanaka, H. "Molecular dynamics study of polymer-water interaction in hydrogels. 1. Hydrogen-bond structure" *Macromolecules* 29 (1996) 6750-6760.

Tanaka, M., Mizobuchi, Y., Sonoda, T. y Shono, T. "Retention behavior of benzene derivatives on chemically bonded β-cyclodextrin phases" *Anal. Lett.* 14 (1981) 281-290.

Tanaka, M., Kawaguchi, Y., Nakae, M., Mizobuchi, Y. y Shono, T. "Separation of disubtituted benzene isomers on chemically bonded cyclodextrin stationary phases" *J. Chromatogr*. 246 (1982) 207-214.

Tavornvipas, S., Hirayama, F., Arima, H., Uekama, K., Ishiguro, T., Oka, M., Hamayasu, K. y Hashimoto, H. "6-o-α-(4-o- α-D-glucuronil)-D-glucosyl-β-cyclodextrin: solubilizing ability and some cellular effects" *Int. J. Pharm.* 249 (2002) 199-209.

Tavornvipas, S., Tajiri, S., Hirayama, F., Arima, H. y Uekama, K. "Effects of hydrophilic cyclodextrins on aggregation of recombinant human growth hormone" *Pharm. Res.* 21 (2004) 2369-2376.

Tokihiro, K., Arima, H., Tajiri, S., Irie, T., Hirayama, F. y Uekama, K. "Improvement of subcutaneous bioavailability of insulin by sulphobutylether β-cyclodextrin in rats " *J. Pharm. Pharmacol.* 52 (2000) 911-917.

Uekama, K., Irie, T., Sunada, M., Otagiri, M., Arimatsu, Y. y Nomura, S. "Alleviation of prochlorperazine-induced primary irritation of skin by cyclodextrin complexation" *Chem. Pharm. Bull.* 30 (1982) 3860-3862.

Uekama, K., Otagiri, M., Irie, T.,Seo, H. y Tsuruoka, M. "Improvement of dissolution and absorption characteristics of phenytoin by a water-soluble beta-cyclodextrin-epichlorohydrin polymer" *Int. J. Pharm*. 23 (1985) 35-42.

Uekama, K. y Otagiri, M. "Cyclodextrins in drug carrier systems" *Crit. Rev. Ther. Drug* 3 (1987) 1-40.

Uekama, K. y Irie, T. "Pharmaceutical applications of methylated cyclodextrin derivatives". En: *Cyclodextrins and their industrial uses*. Duchêne, D. (Ed.). Editions de Santé, Paris, (1987) pp 395-439.

Uekama, K., Horikawa, T., Horiuchi, Y. y Hirayama, F. "In vitro and in vivo evaluation of delayed-release behavior of diltiazem from its o-carboxymethyl-o-ethyl-β-cyclodextrin complex" *J. Control. Release* 25 (1993) 99-106.

Uekama, K., Hirayama, F. y Irie, T. "Application of cyclodextrins in pharmaceutical preparations" *Drug Target. Deliv.* 3 (1994) 411-456.

Uekama, K., Minami, K. y Hirayama, F. "6^A-*O*-[(4-Biphenylyl)acetyl]-α–, β- and γ-cyclodextrins and 6^A-Deoxy-6^A-[[(4-biphenylyl)acetyl]amino]-]-α–, β- and γ-cyclodextrins: Potential prodrugs for colon-specific delivery" *J. Med. Chem. 40* (1997) 2755-2761.

Uekama, K., Hirayama, F. y Irie, T. "Cyclodextrin drug carrier systems" *Chem. Rev.* 98 (1998) 2045-2076.

Uekama, K. "Recent aspects of pharmaceutical application of cyclodextrins" *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*44 (2002) 3-7.

Uekama, K. "Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation" *Chem. Pharm. Bull.* 52 (2004) 900-915.

United States Pharmacopeia-National Formulary, USP30/NF25, The United Satates Pharmacopeial Convention, Rockville, 2006.

Valero, M., Perez-Revuelta, B.I. y Rodríguez, L.J. "Effect of PVP K-25 on the formation of naproxen:β-cyclodextrin complex" *Int. J. Pharm.* 253 (2003) 97-110.

Villiers, A. "Sur la fermentation de la fécule par l´action du ferment butyriqué" *C.R. Hebd. Sesances Acad. Sci.* 112 (1891) 536-538.

Vollhardt, K.P.C. y Schore, N.E. "Further reactions of alcohols and the chemistry of ethers". En: *Organic Chemistry, Structure and Function.* Vollhardt, K.P.C. (Ed.), W.H. Freeman and Company, Nueva York, 2003, pp. 346-350.

Vretblad, P. "Inmobilization of ligands for bioespecific affinity chromatography via their hydroxyl groups cyclohexaamylose-beta-amylase system" *FEBS Letter* 47 (1974) 86-89.

Watanabe, Y., Matsumoto, Y., Seki, M., Takase, M. y Matsumoto, M. "Absorption enhancement of polypeptide drugs by cyclodextrins. 1. Enhanced rectal absorption of insulin from hollow-type suppositories containing insulin and cyclodextrins in rabbits" *Chem. Pharm. Bull.* 40 (1992) 3042-3047.

Wiedenhof, N. y Frieling, R.G "Properties of cyclodextrins. 5. Inclusion isotherms and kinetics of inclusion of benzoic acid and meta-chlorobenzoic acid on β-E25-cyclodextrin-epichlorohydrin resin" *Starke* 23 (1971) 129-132.

Yamada, M., Hirayama, F. y Uekama, K. "Release-control of a water-soluble drug by film-forming trivaleryl-β-cyclodextrin" *Drug Del. Syst.* 14 (1999) 27-32.

Yamauchi, A. "Gels introduction" En: *Gels Handbook.* Vol.1. Osada, Y. y Kajiwara, K. (Eds.), Academic Press, San Diego, 2001, , pp. 4-25.

Yano, H., Hirayama, F., Arima, H. y Uekama, K. "Prednisolone-appended a-cyclodextrin: alleviation of systemic adverse effect of prednisolone after intracolonic administration in 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced rats" *J. Pharm. Sci.* 90 (2001) 2103-2112.

Yoshida A., Yamamoto M., Irie T., Hirayama F. y Uekama K. "Some pharmaceutical properties of 3- hydroxypropyl-β-cyclodextrin and 2,3-dihydroxypropyl-β-cyclodextrins and their solubilizing and stabilizing abilities" *Chem. Pharm. Bull.*, 37 (1989) 1059-1063.

Yoshinaga, M. "Cyclodextrin-modified poly(vinyl alcohol) polymers and films and membranes prepared from them" Jpn. Kokai Tokkio Koho JP 03 221 503 (1991a).

Yoshinaga, M. "Polymers containing cyclodextrin pendant groups and films and membranes prepared from them", Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 03 221 504 (1991b).

Yui, N., Okano, T. y Sakurai, Y. "Inflammation responsive degradation of crosslinked hyaluronic acid gels" *J. Control. Release* 22 (1992) 105-116.

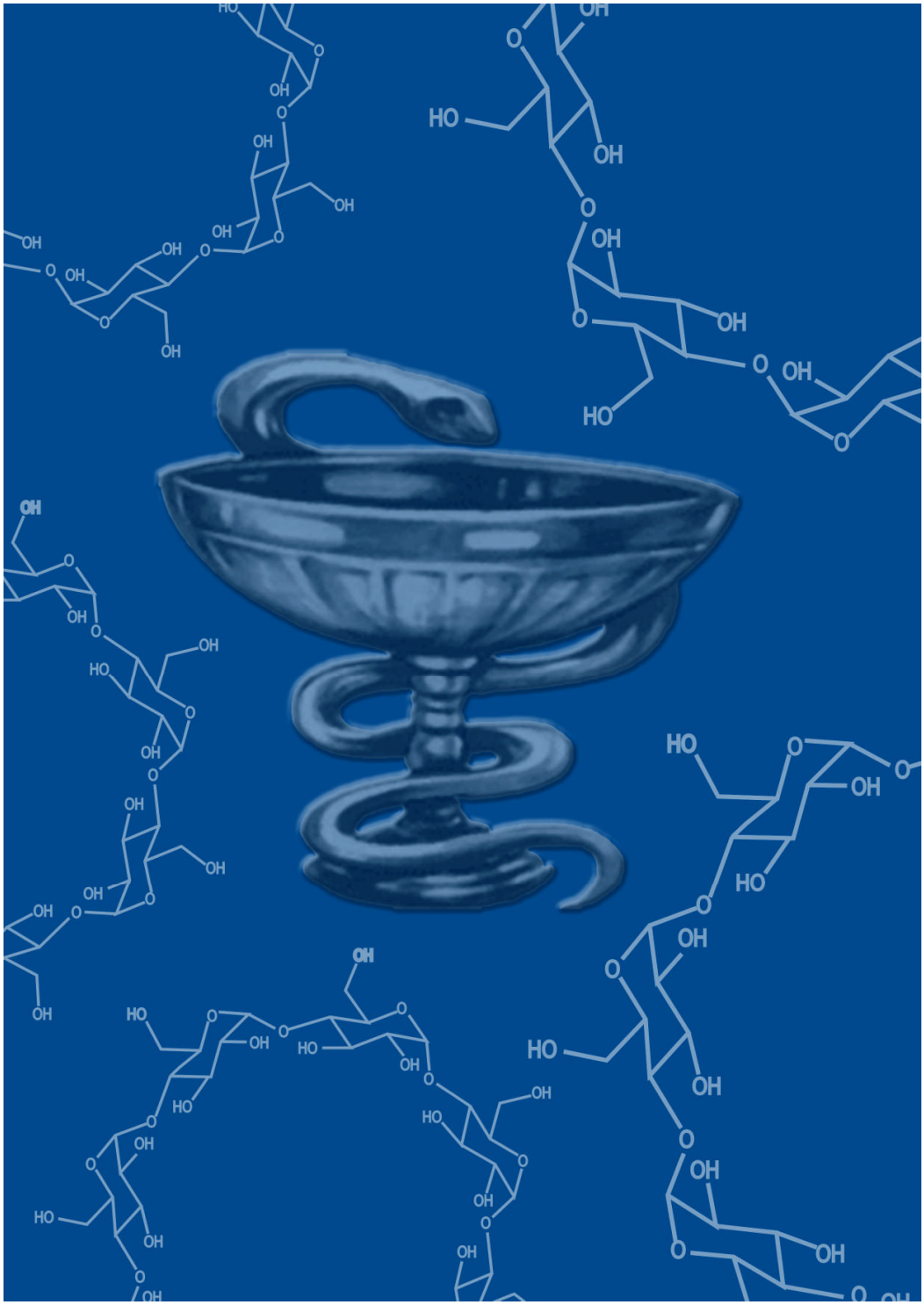
Zemel, H. y Koch, M. "Preparation of crosslinked cyclodextrin resins with enhanced porosity" U.S. 4958015 (1990).

Zhang, J. y Peppas, N.A. "Synthesis and characterization of pH- and Temperature-sensitive poly(mathacrylic acid)/Poly(N-isopropylacrylamide) Interpenetrating Polymeric Networks" *Macromolecules* 33 (2000) 102-107.

Zhang, M.Q. y Rees, D.C. "A review of recent applications of cyclodextrins for drug discovery" *Exp. Opin. Ther. Patents* 9 (1999) 1697-1717.

Zhang, J.T., Huang, S.W., Gao, F.Z. y Zhuo, R.X. "Novel temperature-sensitive, β-cyclodextrin-incorporated poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels for slow release of drug" *Colloid. Polym. Sci.* 283 (2005) 461-464.

Zsadon, B., Decseil, L., Szilasi, M., Tudos, F. y Szejtli, J. "Inclusion chromatography of enantiomers of indole alkaloids on a cyclodextrin polymer stationary phase" *J. Chromatogr*. 270 (1983) 127-134.


HO
OH
O