

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



**HIDROGELES POLI-IÓNICOS DE CHITOSÁN Y ÁCIDO
POLIACRÍLICO COMO NUEVOS SISTEMAS DE
LIBERACIÓN GÁSTRICA DE AMOXICILINA PARA EL
TRATAMIENTO DE “H PYLORI”**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR**

Paloma Marina de la Torre Iglesias

Bajo la dirección del Doctor:

José Luis Gastres García

Madrid, 2003

ISBN: 84-669-2055-2

Paloma M. de la Torre Iglesias - TESIS DOCTORAL



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

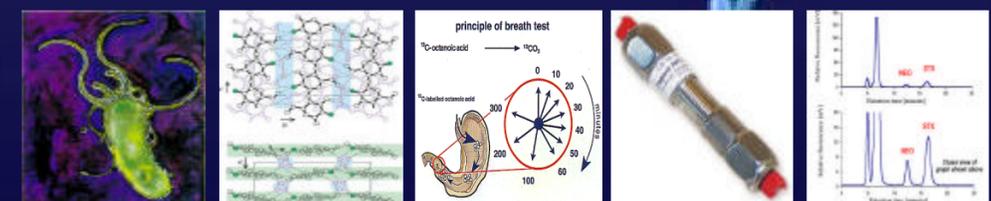
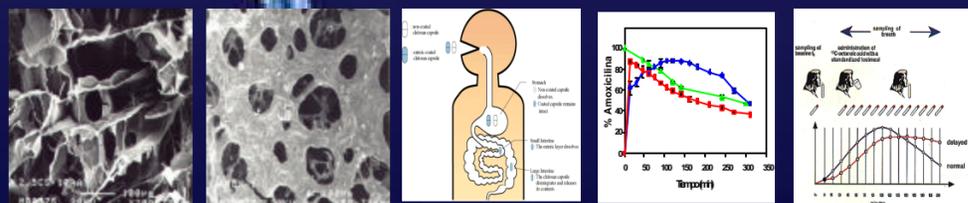
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

HIDROGELES POLI-IÓNICOS DE CHITOSÁN Y ÁCIDO POLIACRILICO COMO NUEVOS SISTEMAS DE LIBERACIÓN GÁSTRICA DE AMOXICILINA PARA EL TRATAMIENTO DE *H. pylori*

TESIS DOCTORAL

PALOMA M. DE LA TORRE IGLESIAS

2003



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



**HIDROGELES POLIIÓNICOS DE CHITOSÁN Y ÁCIDO
POLIACRÍLICO COMO NUEVOS SISTEMAS DE
LIBERACIÓN GÁSTRICA DE AMOXICILINA PARA EL
TRATAMIENTO DE *H. pylori***

TESIS DOCTORAL

PALOMA M. DE LA TORRE IGLESIAS

2003



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

José Luís Lastres García, Director del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid,

INFORMA:

Que la presente memoria experimental y bibliográfica para optar al grado de Doctor, elaborada por Dña. Paloma M. De la Torre Iglesias, ha sido realizada en este Departamento bajo la dirección conjunta de los doctores D. Santiago Torrado Durán y Dña. Susana Torrado Durán, y se encuentra ya concluida, por lo que autorizo su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el Tribunal correspondiente.

Y para que conste firmo el presente certificado en Madrid, a 7 de Abril de 2003.

Dr. José Luís Lastres García

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. José Luis Lastres García por haberme permitido realizar la presente tesis doctoral en el Departamento que está a su cargo.

De un modo especial, quiero expresar mi más sincera gratitud a mis directores Dr. Santiago Torrado Durán y Dra. Susana Torrado Durán, sin cuya orientación, constante ayuda, disponibilidad y estímulo no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

También quiero mostrar mi agradecimiento al Dr. Juan José Torrado Durán por su apoyo y ayuda.

Así mismo, quiero agradecer a todos mis compañeros del Departamento, muchos de los cuales ofrecieron voluntariamente su colaboración en la parte experimental de esta tesis, sin cuya ayuda no hubiera sido posible la realización de la misma, y sobre todo, por su inestimable apoyo, amistad y ayuda a lo largo de estos años.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia y amigos el apoyo recibido durante todo este tiempo.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	pág.1
OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO	pág.5
Capítulo I: <i>Helicobacter pylori</i>. PATOLOGÍA Y TRATAMIENTO	pág.9
I.1 Clasificación de <i>H. pylori</i>	pág.12
I.2 Fisiología y estructura	pág.13
I.3 Patogenia e inmunidad	pág.14
I.4 Epidemiología	pág.15
I.5 Síndromes clínicos	pág.16
I.6 Prevención y control	pág.17
I.7 Diagnóstico	pág.18
I.7.1 Métodos diagnósticos	pág.19
I.7.1.1 Métodos directos o invasivos	pág.19
I.7.1.2 Métodos no invasivos.....	pág.20
I.7.2 Elección de la prueba diagnóstica.....	pág.22
I.8 Tratamiento en España	pág.23
I.8.1 Pautas de tratamiento.....	pág.23
I.8.2 Elección de la pauta erradicadora	pág.28
I.9 Principios activos utilizados en este trabajo	pág.29
I.9.1 Amoxicilina	pág.29
I.9.2 Omeprazol.....	pág.38
I.9.3 Almagato	pág.41
I.10 Bibliografía	pág.41

I.11	Direcciones de internet	pág.44
Capítulo II:	HIDROGELES COMO SISTEMAS DE RETENCIÓN GÁSTRICA	pág.45
II.1	Anatomía del estómago	pág.47
II.2	Motilidad gastrointestinal	pág.49
II.3	Tránsito gastrointestinal	pág.51
II.3.1	Estado de ayuno	pág.51
II.3.2	Situación post-pandrial.....	pág.52
II.4	Formas farmacéuticas de retención gástrica	pág.53
II.4.1	Sistemas de liberación intragástrico por balance hidrodinámico, que prolonga la estancia en el tracto gastrointestinal.....	pág.55
II.4.2	Sistemas de liberación intragástrica flotantes, que presentan una cámara de flotación con vacío o con un gas	pág.55
II.4.3	Sistemas de liberación gastrointestinal hinchables, con una cámara que contiene un líquido que gasifica a la temperatura corporal	pág.56
II.4.4	Sistemas de liberación osmóticamente controlados.....	pág.56
II.4.5	Sistemas con tamaño de partícula controlado	pág.57
II.4.6	Sistemas bioadhesivos de liberación gástrica	pág.57
II.5	Consideraciones generales de hidrogeles	pág.58
II.5.1	Clasificación de hidrogeles	pág.58
II.5.2	Monómeros y estructura de los hidrogeles	pág.59
II.5.2.1	Monómeros	pág.59
II.5.2.2	Estructura de la red polimérica.....	pág.60
II.5.3	Propiedades físicas, químicas y toxicológicas de los hidrogeles	pág.61
II.5.3.1	Factores que afectan al hinchamiento de los geles	pág.61
II.5.3.2	Dinámica del hinchamiento.....	pág.61

II.5.3.3	Propiedades mecánicas	pág.61
II.5.3.4	Citotoxicidad y toxicidad <i>in vivo</i>	pág.62
II.5.4	Sistemas de cesión controlada con hinchamiento sensible a los estímulos exteriores.....	pág.62
II.5.5	Tratamiento matemático de las cinéticas de cesión	pág.63
II.5.5.1	Sistemas de difusión controlada.....	pág.64
II.5.5.2	Sistemas controlados químicamente.....	pág.65
II.5.5.3	Sistemas de hinchamiento controlado	pág.66
II.5.6	Aplicaciones de los hidrogeles en la administración de principios activos	pág.68
II.6	Hidrogeles de retención gástrica	pág.69
II.6.1	Chitosán	pág.71
II.6.2	Derivados del ácido poliacrílico: Carbopol® 974P NF o Carbomer® 934 P	pág.72
II.7	Bibliografía	pág.73
II.8	Direcciones de internet	pág.79
Capítulo III: EVALUACIÓN DEL VACIAMIENTO GÁSTRICO		pág.81
III.1	El vaciamiento gástrico	pág.84
III.1.1	Radioescintigrafía	pág.85
III.1.2	Pruebas ultrasónicas	pág.86
III.1.3	Prueba en suero.....	pág.86
III.1.4	Prueba de aliento con [¹³ C] ácido octanoico.....	pág.86
III.2	Bibliografía	pág.87
Capítulo IV: MATERIALES Y MÉTODOS		pág.91
IV.1	Materiales	pág.93

IV.1.1	Materias primas	pág.93
IV.1.2	Reactivos empleados	pág.93
IV.1.3	Especialidades farmacéuticas	pág.93
IV.2	Instrumental	pág.94
IV.3	Métodos analíticos	pág.94
IV.3.1	Método empleado en la preparación de las distintas formulaciones de complejos poliiónicos e hidrogeles	pág.95
IV.3.1.1	Preparación de los distintos hidrogeles o complejos poliiónicos no covalentes	pág.95
IV.3.1.2	Proceso de liofilización	pág.98
IV.3.2	Métodos empleados en la caracterización física de las materias primas y formulaciones.....	pág.98
IV.3.2.1	Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	pág.98
IV.3.2.2	Especroscopía infrarroja con transformada de Fourier (IRTF).....	pág.98
IV.3.3	Técnicas analíticas para la cuantificación de la amoxicilina y de sus productos de degradación	pág.99
IV.3.3.1	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	pág.99
IV.3.3.2	Espectrofotometría UV	pág.100
IV.3.4	Técnicas analíticas para la cuantificación del ácido octanoico en los ensayos <i>in vitro</i> de velocidad de disolución	pág.100
IV.3.5	Métodos empleados en el estudio farmacotécnico de hidrogeles	pág.101
IV.3.5.1	Ensayos de hinchamiento.....	pág.101
IV.3.5.2	Ensayos de velocidad de disolución	pág.102
IV.3.6	Métodos empleados en los ensayos <i>in vivo</i> de estudio de vaciamiento gástrico.....	pág.102
IV.3.7	Métodos estadísticos	pág.104
IV.4	Bibliografía	pág.104

Capítulo V: VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	pág.107
V.1 Análisis de ácido octanoico por HPLC	pág.110
V.1.1 Selectividad	pág.110
V.1.2 Linealidad	pág.111
V.1.3 Precisión	pág.112
V.1.3.1 Repetibilidad.....	pág.112
V.1.3.2 Reproducibilidad	pág.112
V.1.4 Recuperación.....	pág.115
V.2 Análisis de amoxicilina trihidrato por HPLC	pág.116
V.2.1 Selectividad	pág.116
V.2.2 Precisión	pág.119
V.2.2.1 Repetibilidad.....	pág.119
V.2.2.2 Reproducibilidad	pág.120
V.2.3 Recuperación.....	pág.121
V.3 Análisis de amoxicilina trihidrato por espectrometría directa	pág.122
V.3.1. Estudio en medio ácido (pH=1,2).....	pág.122
V.3.1.1 Selectividad.....	pág.122
V.3.1.2. Linealidad.....	pág.125
V.3.1.3 Precisión	pág.126
V.3.1.3.1Repetibilidad.....	pág.126
V.3.1.3.2Reproducibilidad	pág.127
V.3.1.4 Recuperación	pág.128
V.3.2. Estudio en medio de pH 4,0.....	pág.129
V.3.2.1 Selectividad.....	pág.129

V.3.2.2. Linealidad.....	pág.131
V.3.2.3 Precisión	pág.132
V.3.2.3.1 Repetibilidad.....	pág.132
V.3.2.3.2 Reproducibilidad	pág.133
V.3.2.4 Recuperación.....	pág.133
V.4 Discusión parcial	pág.134
Capítulo VI: INFLUENCIA DE LA SOLUBILIDAD DEL PRINCIPIO ACTIVO Y DE LA PROPORCIÓN DE CHITOSÁN EN LOS COMPLEJOS POLIIÓNICOS	pág.137
VI.1 Caracterización física por medio de microscopía electrónica de barrido	pág.140
VI.2 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (IRTF) ..	pág.157
VI.3 Estudios de hinchamiento y erosión.....	pág.158
VI.4 Ensayos de velocidad de disolución	pág.163
VI.5 Discusión parcial	pág.168
VI.6 Bibliografía	pág.169
Capítulo VII: INFLUENCIA DE LA PROPORCIÓN DE ÁCIDO POLIACRÍLICO, DE LA FUERZA IÓNICA Y DEL VOLUMEN DEL MEDIO FORMADOR DEL HIDROGEL EN LOS COMPLEJOS POLIIÓNICOS	pág.171
VII.1 Estudio de la influencia del incremento del contenido en PAA en la estructura y comportamiento de hidrogeles basados en chitosán	pág.174
VII.1.1 Caracterización física por medio de microscopía electrónica de barrido	pág.174
VII.1.2 Estudios de hinchamiento, erosión y velocidad de disolución	pág.182
VII.2 Estudio de la influencia de la fuerza iónica en hidrogeles con distintos porcentajes de ambos polímeros	pág.189
VII.2.1 Caracterización física por medio de microscopía electrónica de barrido	pág.190

VII.2.2 El efecto de medios de formación del hidrogel con mayores fuerzas iónicas sobre el hinchamiento/ erosión y cesión de la amoxicilina.....	pág.195
VII.3 Estudios de la influencia del volumen del medio formador del hidrogel en diferentes complejos poliiónicos	pág.201
VII.3.1 Caracterización física por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM)	pág.202
VII.3.2 Estudios de hinchamiento, erosión y velocidad de disolución.....	pág.206
VII.4 Discusión parcial	pág.209
VII.5 Bibliografía	pág.210
Capítulo VIII: ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL pH DEL MEDIO DE DISOLUCIÓN EN DOS COMPLEJOS POLIIÓNICOS. ESTUDIO <i>IN VIVO</i> PARA DEMOSTRAR SU PROLONGADA RETENCIÓN GÁSTRICA.....	pág.213
VIII.1 Estudio del grado de linchamiento y erosión en función del pH.....	pág.216
VIII.2 Estudio <i>in vitro</i> de cesión en función del pH.....	pág.219
VIII.3 Estudio del tránsito gástrico.....	pág.221
VIII.4 Discusión parcial	pág.227
VIII.5 Bibliografía	pág.228
Capítulo IX: ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE LA AMOXICILINA.....	pág.231
IX.1 Estudio de estabilidad de la amoxicilina en los medios de disolución empleados en la producción de los distintos hidrogeles	pág.236
IX.2 Estudio de estabilidad de la amoxicilina en diferentes formulaciones en medio simuldo gástrico (HCl 0,1N).....	pág.237
IX.3 Discusión parcial	pág.238
IX.4 Bibliografía	pág.239
Capítulo X: ESTUDIO <i>IN VIVO</i> DE LA INFLUENCIA DEL AUMENTO DEL pH INTRAGÁSTRICO EN EL TIEMPO DE VACIAMIENTO GÁSTRICO DEL COMPLEJO POLIIÓNICO SELECCIONADO	pág.241
X.1 Estudios de tránsito gástrico.....	pág.244
X.2 Discusión parcial	pág.248

X.3 Bibliografíapág.250
DISCUSIÓN FINALpág.253
CONCLUSIONESpág. 263
BIBLIOGRAFÍApág.267
Publicación 1pág.283
Publicación 2pág.293
Publicación 3pág.303
Publicación 4pág.319

INTRODUCCIÓN

Este tema tuvo su origen en un proyecto OTRI para mejorar las formulaciones utilizadas en el diagnóstico de *Helicobacter pylori*. Durante este trabajo se realizaron distintas revisiones bibliográficas, destacando entre ellas el importante trabajo de Patel y col. (1996). Este trabajo desarrolla hidrogeles liofilizados compuestos por una forma de quitosán modificado (chitosán-poli (etilen óxido)) que permite una cesión sostenida *in vitro* de antibiótico (amoxicilina o metronidazol) y que podrían ser utilizadas en un tratamiento gástrico local. Con posterioridad surgen distintos trabajos de hidrogeles que consiguen distintos perfiles de cesión sostenida de antibióticos en la cavidad gástrica (Risbud y col., 2000).

Sin embargo, existen también trabajos, como el de Atherton y col. (1996), que consideran que la cesión gástrica local presentaría peores resultados en la erradicación del *H. pylori* que los tratamientos sistémicos actuales, en los que se combinan dos antibióticos con un inhibidor de la bomba de protones. El empleo de distintos tratamientos sistémicos junto con la mayor aparición de resistencias en tratamientos sistémicos convencionales, llevó a plantear la posibilidad de realizar un tratamiento gástrico local, administrándolo de forma conjunta con los tratamientos sistémicos de primera elección para potenciar su actividad erradicadora y disminuir la aparición de resistencias.

Una vez seleccionados los hidrogeles como los sistemas más adecuados para conseguir este tipo de tratamiento, se escogen un polímero de naturaleza catiónica (chitosán de bajo peso molecular) y un derivado de ácido poliacrílico (Carbopol® 974P NF), que permiten formar complejos poliónicos con altas capacidades de hinchamiento pero fácilmente

4 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

erosionables y biocompatibles con la ruta de administración oral, característica que permitirá su utilización.

En este trabajo se estudiaron las distintas proporciones de ambos polímeros, sus interacciones polímero/ polímero y polímero/ antibiótico, seleccionando los hidrogeles liofilizados que presentaron las mejores características *in vitro*.

Al llegar a este punto faltaba conocer el comportamiento *in vivo* que podían presentar estos hidrogeles. Recientemente está siendo introducida en la práctica clínica una técnica indirecta con [¹³C]ácido octanoico, que permite evaluar el tiempo de vaciamiento gástrico de sólidos en tratamientos con distintos medicamentos (Geboes y col., 2002 y Maes y col., 1994). El empleo de esta técnica ha confirmado la existencia de tiempos de residencia gástrica prolongada para los hidrogeles seleccionados.

Los trabajos de Erah y col. (1997) indican la existencia de una alta degradación en medio simulado gástrico, por lo tanto esto requiere poner a punto una técnica separativa de HPLC, que permita separar y cuantificar la amoxicilina durante el tiempo de permanencia de estos hidrogeles liofilizados en el medio simulado gástrico.

El último paso fue comprobar el vaciamiento gástrico de una formulación seleccionada cuando se asocia a un tratamiento sistémico convencional. Durante este tratamiento las condiciones gástricas se encuentran alteradas por el inhibidor de la bomba de protones. Recientemente, Geboes y col. (2002) han demostrado que ciertos agentes antiácidos, que contienen magnesio en su estructura, retrasan el vaciamiento gástrico. Por lo tanto, este tipo de antiácidos podría afectar el tiempo de residencia gástrica de estos hidrogeles liofilizados.

OBJETIVO

El objetivo de esta tesis es la elaboración de complejos poliónicos liofilizados compuestos por quitosán y ácido poliacrílico, que permitan una cesión sostenida de amoxicilina en la zona gástrica.

PLANTEAMIENTO

El planteamiento para la realización de este trabajo es el siguiente:

1. Desarrollo y selección de los complejos poliónicos liofilizados de ácido poliacrílico y quitosán que muestran mejores características para la cesión sostenida de amoxicilina en la cavidad gástrica. Estudio de las distintas variables que influyen en las interacciones polímero/ polímero y polímero/ principio activo.
2. Estudio *in vitro* e *in vivo* para determinar el tiempo de retención gástrica de los hidrogeles seleccionados.
3. Estudios de estabilidad de los hidrogeles de amoxicilina en medio gástrico.
4. Determinación del tiempo de vaciamiento gástrico de los hidrogeles seleccionados en voluntarios que tienen un elevado pH gástrico mediante distintos tratamientos que pueden ser utilizados en la terapia de erradicación de *H. pylori*.

CAPÍTULO I: *Helicobacter pylori*. PATOLOGÍA Y TRATAMIENTO.

La infección por *Helicobacter pylori* es probablemente una de las más frecuentes en el hombre, calculándose que aproximadamente el 50% de la población mundial está infectada por esta bacteria. No obstante tan solo el 15% de las personas infectadas desarrolla una enfermedad en relación con esta infección. *Helicobacter pylori* es una bacteria recientemente descubierta que causa una infección gástrica y fue primeramente descrita por Barry Marshall y Robin Warren en Perth, Australia, en 1983. El descubrimiento de este microorganismo causó una revolución en gastroenterología, ya que suponía la curación completa de las úlceras pépticas, al erradicar al microorganismo disminuyendo el número de recurrencias ulcerosas, lo que no se había obtenido con los tratamientos “clásicos” antisecretores gástricos anteriores. Al principio la hipótesis de que *H. pylori* fuera la causante de las úlceras fue difícil de creer por varias razones: la primera era que esta bacteria crecía en un medio ácido, bastante agresivo para el desarrollo de microorganismos (aunque ya se conocía la colonización de la mucosa gástrica por lactobacilos y algunas levaduras); otra causa era la observación de que mucha gente que tenía *H. pylori* en su estómago no desarrollaba úlcera, y la última era que no se cumplía el tercer postulado de Koch ya que todavía no se habían conseguido modelos animales en los que se reprodujera la enfermedad. Los postulados de Koch son los criterios de demostración de la relación causal entre un microorganismo y una enfermedad específica, al principio *H. pylori* pudo asociarse a las lesiones ulcerosas y fue aislado en cultivos desde esas lesiones, lo que satisfacía los postulados 1 y 2 de Koch. Para demostrar el tercer postulado, Barry Marshall, un joven médico australiano que trabajaba en el equipo de J. R. Warren, ingirió un cultivo de la bacteria (cuando aún no existían tratamientos efectivos contra este microorganismo) y a las dos semanas le realizaron una endoscopia y una biopsia. Una parte del estómago de Marshall tenía aspecto inflamado y se encontró *H. pylori* en la capa mucosa que recubría

12 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

esta zona, por lo tanto se consiguió probar que *H. pylori* era capaz de provocar una enfermedad en un voluntario humano sano.

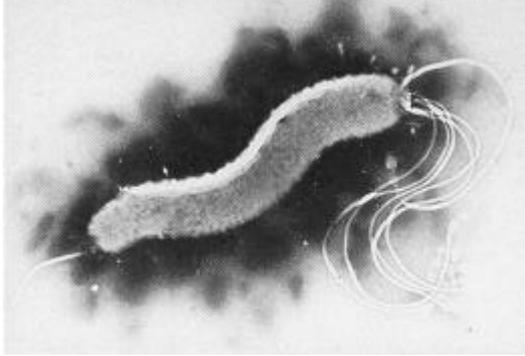


Figura 1. La imagen muestra el aspecto de *H. pylori* cuando se observa por microscopía electrónica (cortesía del Prof A. Lee y Dr. J. O'Rourke, Escuela de Microbiología e Inmunología, University of New South Wales, Australia) (fuente: www.helicobacterspain.com).

I.1. Clasificación de *H. pylori*.

H. pylori pertenece al subgrupo más pequeño de las proteobacterias (ϵ -proteobacterias). Dentro de este subgrupo todas las bacterias son bacilos gramnegativos, delgados, y pueden ser rectos, curvados o helicoidales. Las ϵ -proteobacterias tienen una clase, *Campylobacteres*, un orden, *Campylobacterales* y dos familias, *Campylobacteraceae* y *Helicobacteraceae*. Los dos géneros más importantes son *Campylobacter* y *Helicobacter*, se ubican en la Sección 2 de la primera edición del Manual Bergey, dado que son bacilos gramnegativos, microaerófilos, móviles, helicoidales o vibrioides (Prescot y col., 2000).

Existen al menos 14 especies de *Helicobacter*, que se aíslan del estómago y del tracto intestinal superior de los seres humanos, los perros, los gatos y otros mamíferos.

Tabla 1. Características de las α -proteobacterias (Prescot y col., 2000).

Género	Dimensiones (μ m) y morfología.	Contenido G y C (% mol)	Requerimiento de oxígeno	Otras características distintivas
<i>Campylobacter</i>	0,2-0,5 x 0,5-5; células vibrioides con un único flagelo polar en uno o ambos extremos	30-38	Microaerófilas	Hidratos de carbono no fermentados ni oxidados; oxidasa-positivo y ureasa negativo; presentes en el tracto intestinal, órganos reproductores y cavidad bucal de animales.
<i>Helicobacter</i>	0,5-1,0 x 2,5-5; células helicoidales, curvadas o rectas con extremos redondeados; flagelos múltiples, con vainas.	33-42,5	Microaerófilas	Catalasa y oxidasa-positivas; la urea se hidroliza rápidamente; presentes en la mucosa gástrica de los seres humanos y otros animales.

I.2. Fisiología y estructura.

Los miembros del género *Helicobacter* se identifican mediante secuenciación del ARNr 16S, estudio de los ácidos grasos celulares, presencia de uno o más flagelos polares envainados y determinación de pruebas bioquímicas (por ejemplo, reacciones positivas para la oxidasa y la catalasa, hidrólisis de hipuratonegativa). *H. pylori* es muy móvil (movilidad en sacacorcho) y produce abundante ureasa (Murray y col., 1997).

H.pylori se sitúa en la capa mucosa gástrica, dentro de ella, o por debajo de ella, y también se adhiere a la capa de células epiteliales. La bacteria se encuentra en altas concentraciones en las criptas gástricas del antro, pero también se puede encontrar en epitelio de células con características gástricas de otra parte del tracto gastrointestinal, como en el duodeno (Erah y col., 1997). También se ha realizado un estudio donde se encontró que en el 60 % de los pacientes infectados la bacteria se encontró en el fondo, en el 45% apareció en el cuerpo, en 14% en el antro y en el 32% en más de una región.

14 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

H. pylori es una bacteria de forma helicoidal que cambia a forma de coco al someterse bajo la influencia de varios factores, como pueden ser: la privación de nutrientes, un aumento en la tensión de oxígeno, pH alcalino, aumento de temperatura, exposición a diferentes antibióticos y envejecimiento de los cultivos. Estas formas pueden estar implicadas en la transmisión de la enfermedad y en recaídas después del tratamiento. Brenciaglia y col., (2000) han descrito que estos cocos son viables, capaces de metabolizar y de revertir a su anterior forma helicoidal hasta después de 4 semanas de envejecimiento.

I.3. Patogenia e inmunidad.

Se han identificado diversos factores de virulencia potenciales en *H. pylori*, que son los siguientes:

- Ureasa
- Motilidad
- Factores de adherencia
- Citotoxina termolábil
- Proteasa para la mucina gástrica
- Hemolisina
- Lipopolisacárido

Se cree que los más importantes son: a) la producción de ureasa (la cual origina una nube de amoníaco que protege al microorganismo frente al ácido gástrico), gracias a esta enzima la bacteria puede alcanzar la capa mucosa gástrica y empezar a colonizarla, el amoníaco posee un efecto tóxico para las células eucariotas gástricas y la ureasa origina directamente la inflamación de la mucosa gástrica; b) la movilidad, c) la actividad mucinasa (que permite al microorganismo pasar a través de la capa mucosa con rapidez); d) los factores de adherencia (anclan la bacteria a la unión intracelular de las células entéricas), aunque se ha visto que la mayoría de las bacterias se encuentran dentro de la capa de

mucos y solo un pequeño porcentaje se adhiere a las células epiteliales, aunque al desarrollarse una úlcera este porcentaje aumenta considerablemente.

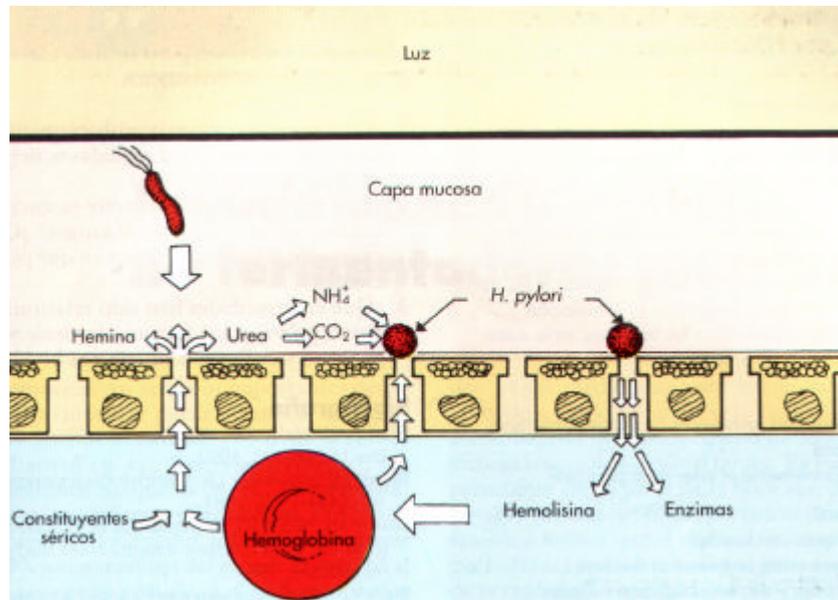


Figura 2. Representación esquemática de la colonización de la mucosa gástrica por *H. pylori*. El organismo móvil avanza con rapidez a través del mucus viscoso hacia los factores de crecimiento quimiotácticos urea y hemina, presentes en las criptas gástricas. La acidez del estómago es neutralizada por la actividad ureasa y la hemina estimula el crecimiento de *H. pylori*. La infiltración de células inflamatorias y la liberación de enzimas hidrolíticos en respuesta a la proliferación del microorganismo conducen a gastritis. (Murray y col., 1997).

El tejido gástrico con infección por *H. pylori* muestra siempre inflamación con infiltración de células mononucleares en la lámina propia. La respuesta de anticuerpos frente a la infección por *H. pylori* es común, sin embargo, el microorganismo se muestra capaz de evadirla cuando está protegido en la mucosa gástrica. Hay una hipótesis que explica porque en algunos casos no se desarrolla úlcera ante la infección de *H. pylori*, esto puede ser debido a que cuando se ha producido la colonización de la bacteria y la respuesta inflamatoria no ha sido capaz de eliminar al microorganismo, el sistema inmunitario puede controlar la inflamación, anulándola y permitir que la bacteria persista en el organismo o por el contrario, no es capaz de parar la inflamación, la cual causa un daño progresivo del tejido y como consecuencia su destrucción produciendo la úlcera.

I.4. Epidemiología.

16 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

Los estudios serológicos realizados en estados unidos han demostrado que la incidencia de infección por *H. pylori* entre individuos sanos es relativamente baja durante la niñez, pero aumenta hasta alrededor del 50% en adultos mayores. No obstante tan solo el 15% de las personas infectadas desarrolla una enfermedad en relación con esta infección (Boixeda de Miguel y col., 2000). La infección aparece antes en los sujetos de clase socioeconómica baja y en los países subdesarrollados. *H. pylori* se identifica del 70 al 100% de los pacientes con gastritis, úlcera gástrica y úlcera duodenal, mientras que es infrecuente en los sujetos sin evidencia histológica de gastritis. No se han descrito ningún reservorio animal y no se ha demostrado la infección a través de alimentos o agua. Aunque no se conoce el mecanismo de transmisión, se ha descrito agrupación familiar de los casos. Se considera probable que los hombres representen el principal reservorio de infección y que ésta se transmita de persona a persona.

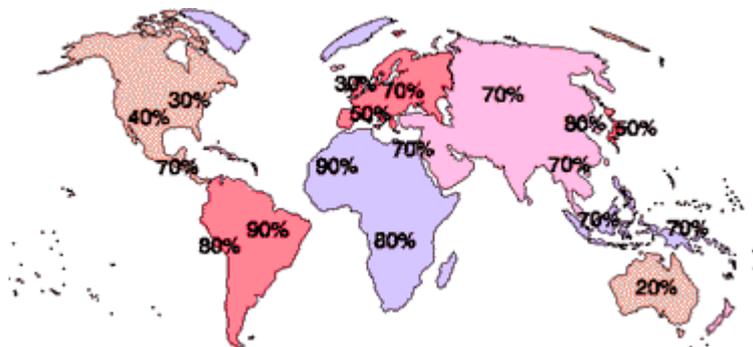


Figura 3. Epidemiología de *H. pylori* a nivel mundial (www.helico.com)

I.5. Síndromes clínicos.

Cada vez existen más pruebas clínicas de que *H. pylori* es el agente etiológico de prácticamente todos los casos de gastritis tipo B (Brenziaglia y col., 2000; Murray y col., 1997). La evidencia incluye la asociación de prácticamente el 100% entre gastritis e infección por la bacteria, infección experimental tanto en el hombre como en animales, y

resolución histológica de la patología cuando se emplea terapia específica para erradicar el microorganismo. Datos convincentes implican también a *H. pylori* en la úlcera péptica (tanto gástrica como duodenal), y la eliminación del microorganismo conduce a la cicatrización de las úlceras y disminuye de forma significativa las recidivas (generalmente inferior al 5%). La eliminación de la bacteria también se acompaña de la curación de la gastritis y de una drástica mejoría en la calidad de vida del paciente, por último representa una importante disminución en los costes económicos cuando se compara con los tratamientos “clásicos” antisecretores gástricos. Puesto que la gastritis precede al desarrollo de adenocarcinomas gástricos, se están realizando extensos estudios epidemiológicos y experimentales para aclarar el papel de *H. pylori* en la patogenia de estas neoplasias, hoy día se acepta que este microorganismo está relacionado con el adenoma gástrico. La infección por *H. pylori* incrementa 9 veces al riesgo de desarrollar un adenocarcinoma gástrico, como se han demostrado diversos meta-análisis. En 1994, la Agencia Internacional para la Investigación del cáncer clasificó a *H. pylori* como agente carcinogénico tipo-1, es decir con relación demostrada en dicho cáncer en manos. Por otro lado, la prevalencia de *H. pylori* es superior al 90% en los linfomas gástricos tipo MALT (tejido linfoide asociado a mucosas) de bajo grado y su erradicación se acompaña de la regresión del tumor en estadios precoces. Actualmente se está estudiando su papel en el desarrollo de una dolencia muy frecuente: la enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), que se produce cuando el ácido gástrico asciende por el esófago, un equipo suizo de investigación afirmó en *The Lancet* que los síntomas tardan el doble en aparecer en pacientes con ERGE si se erradica la bacteria de su organismo. Se ha postulado también su relación con la dispepsia funcional, la cardiopatía isquémica, algunas enfermedades dermatológicas (rosácea y urticaria), el retraso del crecimiento en el niño, etc.; sin embargo estas relaciones no están demostradas.

I.6. Prevención y control.

La prevención y el control de la enfermedad por *H. pylori* son difíciles debido al carácter ubicuo del microorganismo.

18 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

En la primera semana de marzo de 2003, salió a la luz un artículo publicado en *Nature Genetics*, en el que un equipo japonés identificaba la proteína de *H. pylori* (la citotoxina vacuolada A) responsable de las úlceras gástricas. La identificación de proteínas que medien la infección por esta bacteria podría conducir al desarrollo de vacunas contra las úlceras gástricas.

I.7. Diagnóstico.

Desde que se descubriera este microorganismo en 1983 se han ido sucediendo numerosas publicaciones en las que se han ido proponiendo diversas indicaciones en donde se debiera erradicar este microorganismo, distintas técnicas para realizar el diagnóstico de la infección y muy distintos y variados esquemas terapéuticos para erradicar *H. pylori*.

En 1999 el Club Español para el estudio de *H. pylori* organizó una Conferencia de Consenso (Boxeda de Miguel y col., 2000) con los objetivos de:

- Clarificar la utilización de los diferentes métodos diagnósticos de la infección,
- Establecer las indicaciones precisas de su diagnóstico y tratamiento, y
- Evaluar el tratamiento más adecuado para esta infección.

En dicho consenso se aceptaron una serie de indicaciones de erradicación de la infección por *H. pylori* en los siguientes casos:

- Úlcera péptica (gástrica o duodenal) complicada o no durante el episodio agudo.
- Paciente con antecedente demostrado de úlcera péptica (gástrica o duodenal).
- Linfoma gástrico "tipo MALT" en estadios precoces (E11).
- Pacientes gastrectomizados por cáncer gástrico con estómago residual.

Manifestándose expresamente la no indicación de erradicación en aquellas personas asintomáticas, aunque estén infectadas por la bacteria, y en el caso de las enfermedades

extradigestivas que se han tratado de relacionar con esta infección, como por ejemplo la dispepsia funcional no ulcerosa.

1.7.1. Métodos Diagnósticos.

Tradicionalmente los métodos utilizados para el diagnóstico de la infección por *H. pylori* se han dividido en invasivos y no invasivos en función de que precisen o no de la realización de una endoscopia para la toma de biopsias de la mucosa gástrica.

En los pacientes tratados con inhibidores de la bomba de protones, antagonistas H₂ de la histamina (anti-H₂) a altas dosis, antibióticos o compuestos de bismuto, la concentración de bacterias puede estar muy disminuida dando lugar a falsos resultados negativos en las pruebas diagnósticas, por lo que en estos casos se recomienda aplazar la realización de la prueba diagnóstica un mínimo de 8 días en el caso de los antiseoretos gástricos y preferiblemente un mes cuando se hayan empleado los otros medicamentos.

1.7.1.1. Métodos directos o invasivos (Murray y col., 1997, Boixeda de Miguel y col., 2000).

A) Histopatología.

H. pylori se detecta mediante examen histológico de biopsias gástricas. Aunque es posible ver el microorganismo en las muestras teñidas con hematoxilina y eosina o con Gram, resulta más sensible la tinción argéntica de Warthin-Starry.

B) Prueba de la ureasa rápida.

La prueba de ureasa proporciona el método más rápido para la detección de *H. pylori*. Se puede realizar directamente en la muestra clínica o después de aislar el microorganismo. La abundante cantidad de ureasa producida por el germen permite detectar la alcalinidad al cabo de 1-2 horas.

20 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

C) Cultivo.

El crecimiento del organismo requiere un medio enriquecido con sangre, hemina o carbón. Este suplemento protege la bacteria frente a los radicales libres de oxígeno, el peróxido de hidrógeno y los ácidos grasos presentes en los medios habituales (como en el caso de *Campylobacter*). El cultivo no se ha demostrado sensible a menos que se recojan y procesen múltiples biopsias de mucosa gástrica. Eso se debe a la distribución heterogénea de gérmenes, así como a los efectos inhibidores de los antibióticos, antisépticos y otros agentes bacteriostáticos empleados durante la endoscopia. El cultivo no suele emplearse de modo rutinario, restringiéndose su uso para la determinación de las resistencias antibióticas en los pacientes que persiste la infección tras sucesivos tratamientos y en investigación clínica.

D) Identificación.

La identificación preliminar de los aislamientos se basa en el crecimiento en condiciones selectivas, la morfología microscópica típica y la detección rápida de actividad oxidasa, catalasa y ureasa.

1.7.1.2. Métodos indirectos o no invasivos (Murray y col., 1997, Boixeda de Miguel y col., 2000).

A) Prueba del aliento con urea marcada con [¹³C] o [¹⁴C].

Esta es la técnica más empleada y fiable para el control de la erradicación y para el diagnóstico inicial de la infección en aquellos pacientes que no precisen de la realización de una endoscopia, cuya primera descripción fue realizada por Graham y col. en 1987. Se basa en la capacidad ureásica del *H. pylori* hidrolizando la urea presente en el jugo gástrico, liberando CO₂, e iones amonio. Este último recubre al germen neutralizando el ácido e incrementando el pH del mucus gástrico hasta 6-7 en las zonas próximas al microorganismo, permitiéndole sobrevivir e iniciar la colonización.

El CO₂, liberado difunde a través de la mucosa gástrica a la circulación general y de aquí al plexo capilar alveolar y a la luz de los alvéolos eliminándose con el aire espirado.

El método utilizado en la actualidad es el *European standard method for the urea breath test*, que ha presentado diversas variaciones en los últimos años con el fin de hacerlo más simple y adecuarlo en el tiempo sin que se produzcan alteraciones en su sensibilidad y especificidad. Después de un periodo de ayuno de por lo menos seis horas, y en reposo relativo, se hace expulsar el aire espirado a través de una pajita en dos tubos contenedores del aliento (*exetainers*) hasta la aparición de aire condensado en su interior. A continuación se administra una solución de 4,2 g de ácido cítrico disuelto en 200 cc de agua, con un edulcorante para mejorar el sabor. Con esta solución se toma un comprimido de urea marcada. Su finalidad es la de producir un enlentecimiento del vaciamiento gástrico, que permita un contacto más prolongado de las bacterias con la urea. Además, la distribución de esta solución se realiza de forma homogénea por la cavidad gástrica, permitiendo valorar de forma uniforme la presencia del *Helicobacter pylori*. A los 30 min el paciente vuelve a soplar en otros tubos *exetainer*. La lectura de una muestra basal y otra posterior se realiza por espectrometría de masas.

Valores superiores a 5 unidades delta () se consideran positivos. En niños, y en adultos después de haber recibido tratamiento erradicador, se valora bajar el *cut off* a 3,5 unidades o incluso menos. La prueba es fácil de realizar, es bien tolerada por los pacientes, y se puede repetir en un mismo paciente tantas veces como sea necesario.

La causa principal de los falsos negativos es el tratamiento previo con inhibidores de la bomba de protones y /o antibióticos; hasta 15 días antes de la prueba se considera que deben evitarse estos fármacos. Los pacientes gastrectomizados o con aclorhidria también son susceptibles de dar lugar a falsos negativos, los primeros por un vaciamiento gástrico demasiado rápido, y los segundos por presentar un jugo gástrico con un pH demasiado alcalino que haría disminuir la actividad ureásica de las bacterias. Los falsos positivos son más raros generalmente se deben a la presencia, en los tramos superiores del tracto digestivo, de otras bacterias con actividad ureásica, sobre todo las procedentes de la orofaringe, en cuyo caso el incremento de la eliminación de [¹³C] se hace de forma precoz. Realizar la prueba a las pocas horas de haber practicado una gastroscopia con toma de

22 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

biopsias puede falsear los resultados, debido a la pequeña hemorragia que tiene lugar, que afectaría a la especificidad de la prueba.

El test del aliento con urea-[¹³C], ha sido validado con los otros métodos diagnósticos, presentando una sensibilidad y especificidad próxima al 100% lo que le convierte en el método de elección para el diagnóstico de la infección por *H. pylori* sobre todo para el control de la erradicación tras el tratamiento. También en niños y adultos jóvenes, evitando muchas endoscopias innecesarias.

B) Serología en sangre.

También en el diagnóstico inicial puede emplearse la serología en sangre mediante la técnica de ELISA, si bien esta técnica tiene el inconveniente de que debe validarse previamente en cada zona y que no es útil para el control de erradicación, pues se precisa un mínimo de 6 meses para que se produzca un descenso en el título de anticuerpos en sangre. La prueba no se puede emplear para diferenciar entre infección anterior y actual. Además, el título de anticuerpos no guarda relación con la gravedad de la enfermedad ni con la respuesta a la terapia. Como ya se ha dicho, la infección por *H. pylori* estimula una reacción inmune humoral persistente (probablemente causada por contacto continuo con la bacteria).

D) Detección de antígenos en heces.

Los test serológicos en heces son útiles para el diagnóstico inicial (especialmente en niños), aunque tienen una alta incidencia de falsos positivos en los controles post-tratamiento.

1.7.2. Elección de la prueba diagnóstica.

En los pacientes en los que se diagnostica por endoscopia o estudio radiológico la presencia de una úlcera por primera vez, el diagnóstico de la posible infección por *H. pylori* deberá establecerse mediante la prueba rápida de la ureasa o la prueba del aliento con urea marcada, respectivamente. No obstante, en este último caso si no se dispone de la prueba

del aliento puede establecerse el diagnóstico inicial mediante un test serológico tipo ELISA. Sin embargo, si el resultado de la prueba rápida de la ureasa o del estudio serológico es negativo deberá confirmarse el resultado con otra técnica diagnóstica, pudiéndose utilizar el examen histológico o la prueba del aliento con urea marcada. Si el resultado de esta segunda prueba fuera positivo, se deberá instaurar un tratamiento erradicador considerando al resultado de la primera prueba diagnóstica un falso negativo. Si por el contrario persistiera la negatividad, el paciente deberá ser tratado con antisecretores gástricos y deberán estudiarse otras posibles causas de la úlcera péptica distintas a la infección por *H. pylori*.

En todos aquellos pacientes con una historia previa de enfermedad ulcerosa confirmada por endoscopia o radiología la infección por *H. pylori* se confirmará mediante un método no invasivo, a ser posible con la prueba del aliento con urea marcada.

I.8. Tratamiento en España.

I.8.1. Pautas de tratamiento.

Los primeros intentos de tratar la infección de *H. pylori* con un solo antibiótico tuvieron éxito en la eliminación de la úlcera pero no al prevenir la recurrencia de la infección después del tratamiento. Estos antibióticos por sí solos erradicaban completamente la bacteria *in vitro* pero *in vivo* solo disminuían el número de *H. pylori*. Esto se debe a que en los pacientes la bacteria se encuentra dentro de la capa mucosa gástrica o en el lugar de la inflamación, que son de difícil acceso para el antibiótico, y además el medio ácido del estómago puede afectar a la estabilidad de algunos antibióticos y otros principios activos (Salyers y col., 1994, Erah y col., 1997). Por lo tanto, actualmente, se utiliza la combinación de varios fármacos para luchar contra esta infección. El objetivo de este trabajo ha sido el de aumentar la efectividad de la amoxicilina prolongando su tiempo de permanencia en el estómago, y como consecuencia incrementando su tiempo de contacto con la bacteria, para lograr la total erradicación de la misma. Para ello se han estudiado diversos sistemas de

24 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

liberación sostenida de amoxicilina y se ha evaluado el tránsito gástrico en voluntarios sanos.

Actualmente tan sólo 3 grupos de fármacos resultan ser realmente eficaces, utilizados en combinación, frente a *H. pylori*, y son los siguientes:

- Inhibidores de la bomba de protones:
 - Omeprazol
 - Lansoprazol
 - Pantoprazol
- Compuestos de bismuto:
 - Subsalicilato de bismuto
 - Ranitidina-citrato de bismuto
- Antibióticos:
 - Amoxicilina
 - Macrólidos: claritromicina
 - Nitroimidazoles: metronidazol y tinidazol
 - Tetraciclina

Hoy día solo se aceptan pautas que cumplan los siguientes criterios:

- Que logren índices de erradicación superiores al 90%.
- Que los efectos secundarios sean inferiores al 5%.
- Que sean de fácil cumplimiento por el paciente.
- Que induzcan bajas tasas de resistencia antibiótica.
- Que sean de corta duración (entre 7-10 días).
- Que sean de bajo coste.

Los factores principales que condicionan el éxito de un tratamiento erradicador son: la duración del tratamiento, las resistencias antimicrobianas y el grado de cumplimiento por parte del paciente. Con independencia de la pauta terapéutica elegida para tratar la infección, es muy importante dedicar un tiempo para instruir al paciente sobre la forma y la

importancia de cumplir adecuadamente el tratamiento prescrito en cuanto a duración, dosis y espaciamiento, con todo ello se logra aumentar el potencial efecto terapéutico de la pauta utilizada. Un segundo factor son las resistencias primarias a los antibióticos empleados, las cuales son muy frecuentes para el metronidazol (en nuestro país, aunque es variable según distintas zonas, pueden alcanzar el 40%) y algo menores para la claritromicina (en España alrededor del 9%), siendo excepcionales las resistencias a la amoxicilina y a la tetraciclina. Con relación a la duración del tratamiento la mayoría de los estudios terapéuticos concluyen que son suficientes 7 días de tratamiento, no obstante en EEUU se ha propuesto prolongar la duración hasta 10-14 días.

Los criterios anteriormente mencionados sólo los cumplen en la actualidad tres tipos de combinaciones que son las siguientes:

α **Triple clásica**: es la basada en la combinación de dos antibióticos (metronidazol y tetraciclina, esta última puede ser sustituida por amoxicilina) con un compuesto de bismuto. Es una pauta de bajo coste y bien investigada, que sin embargo puede causar efectos secundarios, aunque en general son poco importantes y no son responsables de una falta de seguimiento del tratamiento por parte del paciente. La eficacia de erradicación obtenida con esta pauta es muy alta cuando las cepas son sensibles al metronidazol, pero cuando las cepas son resistentes las tasas de erradicación son más bajas. Esta pauta no debe emplearse a pesar de su bajo precio en nuestro país como pauta inicial debido a la alta tasa de cepas resistentes al metronidazol; además hay que tener en cuenta sus principales inconvenientes como son el elevado número de comprimidos que el paciente debe ingerir y la duración del tratamiento que debe prolongarse a dos semanas. La tasa de erradicación de esta pauta clásica es muy alta, cercana al 90%.

α **Triple**: es la combinación de dos antibióticos (amoxicilina, claritromicina y/o metronidazol) con un inhibidor de la bomba de protones (IBP). Esta pauta tiene la ventaja de una menor duración de tratamiento (7 días) y un bajo nivel de efectos secundarios, pero el inconveniente de que son poco efectivas en presencia de cepas resistentes a la claritromicina y que cuando fallan, las resistencias secundarias son muy frecuentes. En nuestro país la combinación más recomendada es la de un IBP junto a amoxicilina y

26 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

claritromicina, que está considerada como la pauta de primera en la erradicación de *H. pylori*. La asociación de amoxicilina y metronidazol, ya sea dos o tres veces al día, es poco eficaz cuando las cepas son resistentes al metronidazol y la duración de la pauta es de 7 días; por ello en áreas de alta resistencia al metronidazol se recomienda prolongar el tratamiento de esta combinación a 14 días, si bien es preferible en estas zonas evitar esta asociación. Adamsson y col. (1999) han descrito que un tratamiento basado en amoxicilina, metronidazol y omeprazol es preferible a uno basado en claritromicina, metronidazol y omeprazol, desde un punto de vista ecológico, ya que con la amoxicilina se producen cambios menos pronunciados en el surgimiento y duración de cepas resistentes en la microflora gástrica de enfermos infectados por *H. pylori*. Una nueva variante de pauta triple, que realmente no es una pauta triple en sentido estricto, es la que sustituye el IBP por ranitidina-citrato de bismuto. Esta última pauta obtiene una menor supresión ácida gástrica pero asocia el efecto antimicrobiano del bismuto a los antibióticos. Con esta pauta puede prevenirse la inducción de resistencias bacterianas cuando los tratamientos fracasan y la tasa de curación es algo mayor en los pacientes con cepas resistentes a las obtenidas cuando se utiliza la combinación con IBP. Las tasas de curación con estas pautas en nuestro medio están alrededor del 85%.

La terapia triple, la cual incluye dos antibióticos y un inhibidor de la bomba de protones, es la que más se utiliza actualmente para el tratamiento de *Helicobacter pylori*. Recientemente, se ha descrito que los inhibidores de la bomba de protones aumentan la concentración local de los antibióticos en el estómago, lo que puede contribuir a una acción sinérgica corroborada en la terapia erradicadora de *H. pylori* (Kees y col., 2000 y Atherton y col., 1996).

α **Cuádruple**: consiste en la asociación de un IBP con la triple clásica (tetraciclina, metronidazol y un compuesto de bismuto). La duración de esta pauta es de 7 a 14 días. Los antibióticos suelen ser sustituidos por amoxicilina y claritromicina respectivamente. Con esta pauta se logran tasas de curación muy elevadas (superiores al 90%).

Las pautas **duales** combinando un IBP con un antibiótico, muy populares hasta hace pocos años, hoy en día están abandonadas, a pesar de ser bien toleradas, por su baja

efectividad erradicadora. No obstante, la pauta combinando ranitidina-citrato de bismuto con claritromicina durante 14 días es efectiva y con pocos efectos secundarios y superior a otros tratamientos duales, por lo que puede utilizarse en pacientes alérgicos a la penicilina. Sin embargo, hay que hacer notar que esta pauta es en realidad una pauta triple pues combina tres fármacos, ranitidina, bismuto y claritromicina.

Tabla 2. Pautas erradicadoras de la infección por *H. pylori* que han demostrado ser eficaces (Boixeda de Miguel y col., 2000).

Duración (días)	Fármacos		
Terapias incluyendo claritromicina			
7-10	IBP 20 mg /12h	Claritromicina 500mg/12h	Amoxicilina 1g/12h
7-10	RCB 400mg/12h	Claritromicina 500mg/12h	Amoxicilina 1g/12h
14	RCB 400mg/12h	Claritromicina 500mg/12h	
Terapias incluyendo metronidazol (o tinidazol)			
14	Comp. de bismuto/6h	Metronidazol 400-500mg/6-8h	Tetraciclina 500mg/6h
7-10	IBP/12h	Metronidazol 400-500mg/6-8h	Amoxicilina 500mg/6-8h
4-7	IBP/12h	Metronidazol 400-500mg/6-8h SBC/6h	Tetraciclina 500mg/6h
Terapias incluyendo claritromicina más metronidazol (o tinidazol)			
7	IBP /12h	Claritromicina 500mg/12h	Metronidazol 400-500mg/12h
7	RCB 400mg/12h	Claritromicina 500mg/12h	Metronidazol 400-500mg/12h

RBC=Ranitidina-citrato de bismuto; SBC=Subcitrato de bismuto coloidal; IBP= Inhibidor de la bomba de protones.

1.8.2. Elección de la pauta erradicadora.

La elección de la pauta a emplear inicialmente viene determinada por la prevalencia local en las resistencias antimicrobianas a metronidazol y claritromicina. Estas resistencias no solo varían entre países sino también entre distintas zonas geográficas dentro de un mismo país. En España la tasa de resistencias a claritromicina es inferior al 10%, mientras que la tasa de resistencia al metronidazol es muy elevada, por ello el tratamiento debe iniciarse con un IBP más amoxicilina y claritromicina durante 7 días. Si este tratamiento inicial falla debe instaurarse como tratamiento de “rescate” la pauta cuádruple. Si esta segunda terapia erradicadora falla, la recomendación habitual propuesta por las múltiples reuniones de Consenso sobre el tema, es realizar un cultivo y antibiograma a fin de pautar un tercero e incluso un cuarto tratamiento de “rescate” para lograr tasas de erradicación próximas al 100%. Sin embargo, esta actitud no ha sido refrendada científicamente y en el mejor de los casos se logra erradicar un 50% de los pacientes aún no erradicados; además, la selección de los antibióticos es compleja aunque la tendencia general es evitar tratamientos que incluyan claritromicina o metronidazol si el paciente ya ha recibido dichos fármacos. Según la opinión de varios autores (Boixeda de Miguel y col., 2000) una alternativa válida en asistencia primaria y en pacientes con úlcera no complicada es evitar el empeoramiento terapéutico y esperar la introducción de nuevas pautas erradicadoras alternativas, siendo necesario en estos pacientes pautar un tratamiento antisecretor clásico de mantenimiento para evitar las recidivas ulcerosas.

En los pacientes alérgicos a la penicilina, la pauta inicial será la asociación de un IBP con metronidazol y claritromicina, pudiéndose utilizar también la combinación de ranitidina-citrato de bismuto con claritromicina.

Tabla 3. Secuencia en la elección de la pauta erradicadora de la infección por *H. pylori* (según la Conferencia Española de Consenso sobre la infección por *Helicobacter pylori*)

<p>A) Pautas de primera elección (recomendadas en España):</p> <p>1. IBP (omeprazol 20mg, lansoprazol 30mg, pantoprazol 40mg)/12h</p> <p>Amoxicilina 1g/12h</p> <p>Claritromicina 500mg/12h</p> <p>2. Ranitidina-citrato de bismuto 400mg/12h</p> <p>Amoxicilina 1g/12h</p> <p>Claritromicina 500mg/12h</p> <p>- En caso de alergia a la penicilina, la amoxicilina será sustituida por metronidazol 500mg/12h.</p> <p>La duración de todos estos tratamientos es de 7 días.</p>
<p>B) Tratamiento de “rescate” (en España):</p> <p>IBP (omeprazol 20mg, lansoprazol 30mg, pantoprazol 40mg)/12h</p> <p>Subcitrato de bismuto 120mg/6h</p> <p>Tetraciclina 500mg/6h</p> <p>Metronidazol 500mg/8h</p> <p>La duración de este tratamiento es de 7 días.</p>

I.9. Principios activos utilizados en este trabajo.

A continuación se va a realizar una descripción de los fármacos utilizados en este trabajo, los cuales son: la amoxicilina como antibiótico contra *H. pylori*; el omeprazol que aumenta el pH intragástrico inhibiendo la bomba de protones por vía sistémica y el almagato, el cual es un antiácido que aumenta también el pH del fluido gástrico actuando por vía local no sistémica.

I.9.1. AMOXICILINA.

La amoxicilina es un antibiótico β -lactámico semisintético derivado de la penicilina

La amoxicilina existe en el mercado en dos formas, que son las siguientes:

- soluble en disolventes acuosos: amoxicilina de sodio.
- insoluble en disolventes acuosos: amoxicilina trihidrato.

30 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

- Características físico químicas de la amoxicilina.

- Amoxicilina de sodio.

Solubilidad: Muy soluble en agua, bastante soluble en etanol, muy poco soluble en acetona y prácticamente insoluble en cloroformo y eter (Xu y col., 1999).

Conservación: En un envase hermético. Si la sustancia es estéril, en un envase estéril, hermético y con cierre inviolable (Real Farmacopea Española, 2002).

- Amoxicilina trihidrato.

Solubilidad (mg/ml): en agua 4,0; metanol 7,5; en etanol absoluto 3,4. Insoluble en hexano, benceno, etil acetato, acetonitrilo (*The Merck Index*, 2001). La solubilidad en agua depende del pH. En el rango de pH de 4 a 8 ésta varía de 4,2 a 9,0 mg/ml (Bhattacharyya y col., 1978).

- Ensayo de disolución:

En este trabajo se destaca la importancia de los estudios de velocidad de disolución (descritos en el **capítulo IV**) y la importancia del vaciamiento gástrico con los parámetros farmacocinéticos encontrados *in vivo*.

La USP 24 (2000) describe un método de disolución para cápsulas y otro para comprimidos.

- Método de velocidad de disolución para cápsulas de amoxicilina (USP 24, 2000):

Medio de disolución: agua; 900 ml.

Aparato 1: 100 rpm, para cápsulas que contienen 250 mg de amoxicilina.

Aparato 2: 75 rpm, para cápsulas que contengan 500 mg de amoxicilina.

Tiempo. 60 minutos.

Procedimiento: Determinar la cantidad de $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ disuelto a través de las absorbancias ultravioletas en una longitud de onda de máxima absorción de 272 nm.

Tolerancia: no menos del 80% de la cantidad pesada de $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ estará disuelta a los 60 minutos.

- Método de velocidad de disolución para comprimidos de amoxicilina (USP 24, 2000):

Medio de disolución: agua; 900 ml.

Aparato 2: 75 rpm.

Tiempo. 90 minutos.

Determinar la cantidad de $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ disuelto a través de un método de HPLC descrito en el capítulo de material y métodos:

- Estabilidad.

La degradación de la amoxicilina es la típica que sufren todas las penicilinas. En medio alcalino se descompone primeramente por apertura del anillo β -lactámico, y se convierte en ácido peniciloico. Este último compuesto pierde CO_2 y forma ácido peniloico. En medio ácido la amoxicilina se hidroliza primero a ácido penicilánico, el cual absorbe a 320 nm, y sirve como reacción para distinguir ente amoxicilina y ampicilina. Compuestos que se forman en posteriores hidrólisis son: ácido penílico, ácido penáldico, penicilamina y peniloaldeído.

Las sustancias en las que se degrada la amoxicilina sódica son las siguientes: ácido 6-aminopenicilánico; (5S) ácido amoxiloico y (5R) ácido amoxiloico; (5S, 6R) ácido amoxiciloico y (5R, 6R) ácido amoxiciloico; L-amoxicilina; 2-hidroxi-3-(4-hidroxi) fenilpirazina; 4-hidroxifenilglicilamoxicilina; amoxicilina (5R) piperazina-2',5'-diona y amoxicilina (5S) piperazina-2',5'-diona; N-pivaloil-4-hidroxifenil-glicina y dímero de amoxicilina (Valvo y col., 1999).

32 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

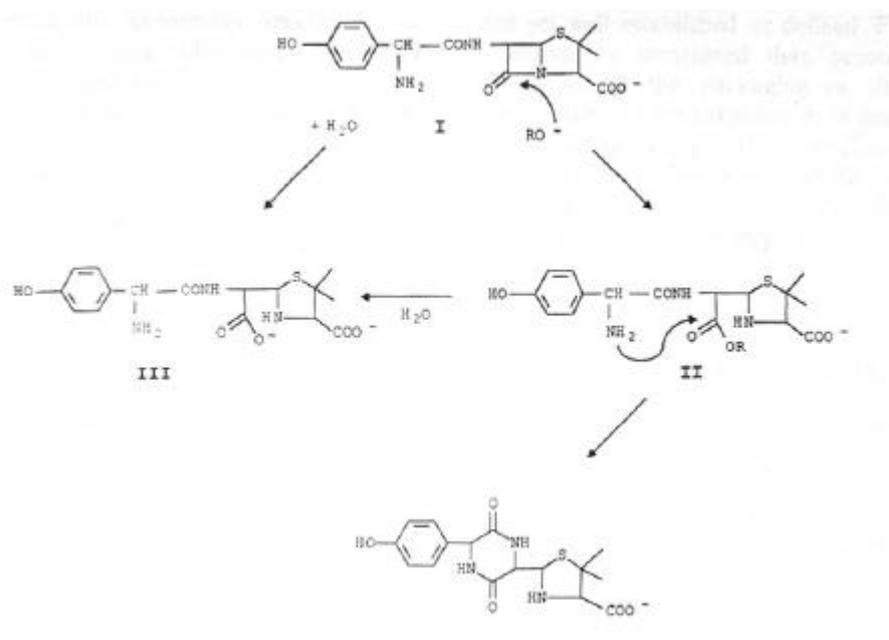


Figura 4. Mecanismo nucleofílico de degradación de la amoxicilina sódica: (I) amoxicilina sódica; (II) amoxiciloil ester; (III) ácido amoxiciloico; (IV) piperazinediona (Valvo y col., 1997).

Dosis orales de amoxicilina trihidrato de 125 y 250mg/5ml presentan valores mayores al 90% de actividad después de 2 semanas a temperatura ambiente o a 4°C. Aunque, la solubilidad en pH 6 es de sólo 4,2 mg/ml (21 mg/5ml), de las soluciones mantenidas durante 7 días a temperatura ambiente, solo el 50% de la amoxicilina permanece intacta, y el 100% de las mantenidas a 4°C. Por lo tanto, si la amoxicilina insoluble es más estable que el material disuelto la estabilidad de la dosis oral depende de la falta de solubilidad de la amoxicilina. La amoxicilina materia prima seca, y los polvos de administración oral secos, y cápsulas pueden retener su actividad durante 5 años, aunque las fechas de caducidad suelen ser de 3 años (Bhattacharyya y col., 1978).

- **Propiedades biofarmacéuticas y farmacocinéticas de la amoxicilina.**

- *Absorción.*

La amoxicilina es resistente a su inactivación por el ácido gástrico (Martindale, 1999). Erah y col. (1997) estudiaron la degradación de la amoxicilina en medio gástrico (pH 2,0) y

observaron que la semivida de degradación de la amoxicilina en este medio era de $15,2 \pm 0,3$ horas. Por lo tanto la amoxicilina es lo suficientemente estable en un pH normal gástrico para mantener su eficacia terapéutica en el tratamiento de las infecciones causadas por *H. pylori*, cuando se administra por separado, ya que su semivida de degradación es mayor a las 12 horas en este pH.

Este antibiótico se absorbe completamente y más rápidamente que la ampicilina cuando se da por la cavidad bucal. Las concentraciones plasmáticas máximas alcanzan valores de 5 g/ml y han sido observadas a la hora y dos horas después de una dosis de 250 mg, con cantidades detectables presentes hasta las 8 horas. Doblando la dosis se puede doblar la concentración plasmática. La presencia de comida en el estómago no aparece disminuir la cantidad total absorbida (Martindale, 1999). Si embargo se ha visto que este factor influye en la efectividad del fármaco, Atherton y col. (1996) describieron que la administración de una suspensión de amoxicilina, en combinación con omeprazol antes de las comidas fue más efectiva en la erradicación de *H. pylori* que tomando el tratamiento después, por lo tanto en este caso tuvo más importancia la acción sistémica del antibiótico que la local, ya que estos autores habían comprobado que dando el principio activo antes de las comidas se alcanzaban mayores concentraciones plasmáticas y menos concentración de amoxicilina en el ámbito gástrico local.

Cuando la amoxicilina es administrada en forma de sal sódica (amoxicilina sódica) por medio de inyección, se alcanzan similares concentraciones plasmáticas a las que se obtiene tras su administración oral.

- *Distribución.*

Un 20% del fármaco se une a proteínas plasmáticas. Y las semividas plasmáticas alcanzan unos valores de 1 a 1,5 horas. La semivida puede ser más larga en neonatos y en personas ancianas, en caso de insuficiencia renal la semivida llega a ser de 7 a 20h. La amoxicilina se distribuye ampliamente alcanzando variadas concentraciones en tejidos y fluidos. Atraviesa la placenta y pequeñas cantidades se excretan a través de la leche materna. Una pequeña cantidad de fármaco atraviesa la barrera hematoencefálica a menos que las meninges se encuentren inflamadas.

34 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

- Metabolización y excreción.

Este principio activo es metabolizado en una cantidad limitada en ácido peniciloico, el cual es excretado en la orina. Aproximadamente un 60% de la amoxicilina es excretada sin cambios en la orina en 6 horas tras sufrir una filtración glomerular y una secreción tubular. Se ha observado una concentración en la orina de 300 g/ml después de ser administrada una dosis de 250 mg. El probenecid retarda la excreción renal. La amoxicilina se puede eliminar por hemodiálisis. Se han descrito la aparición de altas concentraciones en bilis, alguna cantidad puede ser excretada en heces (Martindale, 1999).

- Propiedades farmacodinámicas y farmacológicas de la amoxicilina.

Es un antibiótico beta-lactámico. Su acción bactericida es similar a la bencilpenicilina, pero al tener grupos aminos en su estructura puede penetrar mejor en la pared de las bacterias gramnegativas, y por lo tanto tiene un espectro de actividad mucho mayor. Es activa frente a organismos grampositivos como: *Streptococcus plteumoniae*, *Enterococcus faecalis* y *Listeria monocytogenes*. También es activa frente a bacterias gramnegativas como *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *N. meningitidis*. Es más activa que la bencilpenicilina frente a algunos bacilos gramnegativos como *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis*.

Las concentraciones mínimas inhibitorias para bacterias sensibles grampositivas son de 0,02 a 1,5 g/ml y para gramnegativos: 0,03 a 3 g/ml

Se ha descrito que la amoxicilina es más activa *in vitro* que la ampicilina contra *Enterococcus faecalis*, *Helicobacter pylori* y *Salmonella spp*, pero menos activa contra *Shigella spp*. Su elevada actividad frente a *H. pylori* hace que sea incluida en tratamientos de terapia triple en la que se combina amoxicilina y claritromicina con un inhibidor de la bomba de protones (Martindale, 1999).

Se inactiva por β -lactamasas, y se ha descrito la existencia de una completa resistencia cruzada entre este principio activo y la ampicilina. Se puede incrementar el espectro de actividad de la amoxicilina con la administración concomitante de ácido clavulánico, un

inhibidor de β -lactamasas, además éste puede incrementar la actividad de la amoxicilina contra varias especies que generalmente no eran consideradas sensibles a este antibiótico, entre las cuales se incluyen: *Bacteroides*, *Legionella*, *Nocardia spp.* y *Burkholderia (Pseudomonas) pseudomallei*. Aunque *Ps. Aeruginosa*, *Serratia marcescens* y otras bacterias gram negativas permanecen resistentes.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) proporciona cierta idea de la eficacia de un agente quimioterápico. La CMI₉₀ de la amoxicilina contra *Helicobacter pylori* es: 0,12 mg/L (Atherton y col., 1996). Esta CMI de la amoxicilina depende frente a *H. pylori* del pH del medio. Así Erah y col (1997) dicen que la CMI₉₀ en pH neutro es de 0,06 mg/L. A diferencia de la mayoría de las bacterias sensibles a la amoxicilina en las que se ha visto que su actividad antimicrobiana de la amoxicilina (expresada como CMI) permanece estable en diferentes pH (Erah y col., 1997).

- Uso de sistemas de liberación controlada.

Los antibióticos β -lactámicos poseen una vida media muy corta, lo cual produce una demanda de administración del principio activo muy frecuente. Debido al hecho de que la amoxicilina, como muchos β -lactámicos, es mayoritariamente activo frente a infecciones microbianas extracelulares y su unión a proteínas séricas es baja, hay una directa correlación entre su concentración en el lugar de la infección, en los fluidos extravasculares, y su concentración plasmática. Por lo tanto, se puede establecer una relación directa entre las concentraciones plasmáticas *in vivo* y la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual se define como la más baja concentración capaz de inhibir cualquier crecimiento bacteriano visible (Brenziaglia y col., 2000), obtenida en ensayos *in vitro*. Actualmente se tiende a la administración de sistemas orales de administración sostenida, que aumentaría el tiempo de acción sobre la CMI *in vivo*, comparándose con formas de administración convencionales (cápsulas, etc..) (Hoffman y col., 1998).

El desarrollo de sistemas de liberación sostenida de amoxicilina deberá tener en cuenta la cinética no lineal de absorción que sigue este principio activo y su pobre absorción colónica.

36 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

Al aumentar la concentración de β -lactámicos hasta cuatro veces la concentración mínima inhibitoria (concentración terapéutica) se aumenta la efectividad bactericida de estos antibióticos. No se consiguen mejoras en la efectividad al seguir incrementando la concentración de amoxicilina. La penetración en los tejidos no presenta ninguna relación directa con las concentraciones plasmáticas, y en los casos en los que el patógeno es intracelular el aumento de antibiótico en el plasma no contribuirá a la erradicación de la bacteria. Existe una correlación directa entre el tiempo que se mantienen las concentraciones de amoxicilina por encima de las concentraciones terapéuticas y los resultados clínicos. Al contrario que los aminoglicósidos, la cinética del efecto bactericida es lenta y requiere un mantenimiento prolongado de concentraciones efectivas del principio activo para conseguir el comienzo de la acción. La amoxicilina, como otros muchos β -lactámicos, no posee efecto post-antibiótico, y si lo tiene es muy corto, contra especies *Enterobacteriaceae* o *Pseudomonas*. El crecimiento bacteriano vuelve a ocurrir rápidamente después de la caída de las concentraciones de amoxicilina por debajo de las CMI. Por lo tanto el principal objetivo de la dosificación de cada antibiótico β -lactámico es prevenir el intervalo sin principio activo entre las dosis, para que no sean lo suficientemente largos como para que la bacteria reanude su crecimiento.

- Usos y administración de la amoxicilina.

La amoxicilina es el análogo 4 hidroxilo de la ampicilina y es usada en una similar variedad de infecciones. Estas incluyen: actinomicosis, infecciones del tracto biliar, bronquitis, endocarditis (principalmente en la profilaxis), gastroenteritis (incluida salmonelosis, pero no sigelosis), gonorrea, enfermedad de Lyme, infecciones bucales, otitis media, neumonía, infecciones del bazo, profilaxis de la infección por *Pneumococo*, fiebre tifoidea y paratifoidea, e infecciones del tracto urinario. El ácido clavulánico, inhibidor de las β -lactamasas, amplía el espectro antimicrobiano de la amoxicilina, y se puede usar una combinación de los dos fármacos cuando existe el riesgo de que aparezcan resistencias a la amoxicilina, por ejemplo en infecciones del tracto respiratorio causadas por *Haemophilus influenzae* o *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*. La amoxicilina se da como parte del tratamiento contra *H. pylori* (Martindale, 1999).

- *Administración y dosis.*

La amoxicilina se administra oralmente en forma de trihidrato y parenteralmente en forma de sal sódica, expresando su dosis como cantidad equivalente a amoxicilina.

La dosis oral usual de amoxicilina es de 250 a 500mg cada 8 horas. Niños de hasta 10 años pueden tomar de 125 a 250mg cada 8 horas, y si tienen menos de 20 kg de peso tomarán una dosis diaria de 20 a 40 mg/kg.

En el tratamiento de erradicación de *H. pylori* se suele administrar dosis de amoxicilina de 1 g cada 12 h asociado a claritromicina en dosis de 500 mg cada 12h y a un inhibidor de la bomba de protones en dosis de 20 mg/12h.

Dosis más altas de amoxicilina se usan en determinados casos, por ejemplo en gonorreas, todavía sensibles a este medicamento, el tratamiento consistirá en una única dosis de 3g de amoxicilina junto con 1g de probenecid. Una dosis de 3g, cada 8, 10 o 12 horas, puede ser usada en abscesos dentales o en infecciones o en infecciones agudas del tracto urinario. Para la profilaxis de la endocarditis, en pacientes susceptibles a la amoxicilina, el tratamiento consiste en 2 o 3g 1 hora después de una intervención dental con o sin anestesia local. Una pauta posológica de 3g de amoxicilina cada 12 horas se puede usar en pacientes con infecciones severas o recurrentes del tracto respiratorio. Si es necesario, niños entre 3 y 10 años, con otitis media tomarán 750mg / 12horas.

La amoxicilina es administrada por vía intramuscular o por inyección intravenosa en dosis de 500mg cada 8 horas. En infecciones severas, 1g de amoxicilina puede administrarse cada 6 horas por medio de una inyección lenta intravenosa de 3 a 4 minutos de duración o por infusión que dure de 30 a 60 minutos. Niños de hasta 10 años se les puede administrar por vía parenteral de 50mg a 100mg/kg de peso diarios en varias tomas.

Las dosis de amoxicilina se deben reducir en insuficiencia renal severa (Martindale, 1999).

1.9.2. OMEPRAZOL.

Probablemente es el inhibidor de la bomba de protones más utilizado en el tratamiento de erradicación de *H. pylori*. Su uso supera a otros tratamientos que emplean sales de bismuto. Su elevada utilización ha sido la causa de su selección para los estudios en voluntarios sanos que nos permitan conocer el comportamiento *in vivo* de nuestro complejo poliiónico asociados a tratamientos convencionales de erradicación de *H. pylori*, donde se incluye un agente elevador del pH gástrico.

Existe ya un acuerdo casi general de que el 95-100% de las úlceras duodenales y el 70% de las gástricas están asociadas a infección por *H. pylori*, y que el tratamiento de los procesos ulcerosos donde se diagnostique infección por dicha bacteria (por biopsia, análisis serológicos o determinación de urea en la respiración) debe de consistir en una terapia de erradicación.

La extensión a la práctica clínica diaria de las técnicas de diagnóstico de *Helicobacter* facilitará la selección de los pacientes, pero de todas formas hay clínicos que opinan que hay razones de coste-efectividad (dada la casi universal asociación del *H. pylori* con la úlcera) que justifican el tratamiento empírico de erradicación en todos los pacientes que no presenten indicios claros de otra etiología.

Los tratamientos de erradicación más empleados consisten en la combinación de antibióticos con inhibidores de la secreción ácida gástrica. Eventualmente, también son empleadas las sales de bismuto.

Dentro de los inhibidores de la secreción ácida, las principales opciones farmacológicas son los inhibidores de la bomba de potasio/hidrogeniones y antagonistas H₂. Entre los primeros, pueden utilizarse indistintamente omeprazol, lansoprazol, rabeprazol o pantoprazol en terapias triples con dos antibióticos durante una semana. Se piensa que la elevación del pH estomacal potencia la acción de los antibióticos (por crear un medio adverso a la bacteria, o por impedir la hidrólisis de antibióticos sensibles al ácido, como la amoxicilina o la claritromicina) aunque es posible que el omeprazol tenga alguna acción

bactericida propia. Entre los antagonistas H₂ el más empleado es la ranitidina, aunque no hay motivos farmacológicos para no emplear otros fármacos de este mismo grupo.

Las sales de bismuto han sido usadas tradicionalmente como antiulcerosos, tienen acción bactericida por contacto frente a *Helicobacter*. También está registrada la ranitidina bismuto citrato, un complejo que aglutina el antisecretor y la sal de bismuto en una sola sustancia, que ha permitido desarrollar una posología propia, más cómoda que la de las sales de bismuto por separado.

La necesidad de politerapia origina un dilema terapéutico. Por un lado, la probabilidad de erradicación es tanto mayor cuantos más medicamentos compongan el régimen. Pero usar muchos fármacos obliga a tomar un gran número de comprimidos al día y tiene una incidencia elevada de efectos secundarios, sobre todo de tipo gastrointestinal. Los regímenes muy complicados pueden tener riesgo de fracaso porque el paciente no cumple la prescripción.

Las pautas de primera elección que se recomienda utilizar en España consisten en el empleo de un inhibidor de la bomba potasio junto con amoxicilina y claritromicina, o ranitidina-citrato de bismuto asociada a estos dos antibióticos. En caso de alergia a las penicilinas, la amoxicilina deberá ser sustituida por metronidazol. La duración de una semana de tratamiento con esta pauta es probablemente la mejor desde una perspectiva de coste-efectividad.

Cuando ha fracasado el tratamiento anteriormente descrito, se recomienda la administración de una terapia de una semana de duración a base de un inhibidor de la bomba potasio/hidrogeniones, bismuto, tetraciclina y metronidazol. Probablemente, no es necesario realizar un cultivo antes de indicar un segundo tratamiento erradicador tras el fracaso de un primero.

La combinación de omeprazol (u otro inhibidor de la bomba de potasio/ hidrogeniones) con amoxicilina y metronidazol, administrada durante una semana en dos dosis diarias, es menos eficaz que otras alternativas terapéuticas, motivo por el cual no se considera de primera elección.

40 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

El tratamiento previo con un inhibidor de la bomba de potasio/hidrogeniones no parece reducir la eficacia posterior de las terapias triples con estos antiseoretos gástricos asociados a dos antibióticos. Esto implica que no es preciso suspender el tratamiento previo con antagonistas de la bomba potasio/hidrogeniones a la hora de establecer un tratamiento erradicador de *Helicobacter pylori*.

- Acción y mecanismo

El grupo de los inhibidores de la bomba de hidrogeniones basan su eficacia antiulcerosa en la inhibición de la «Bomba potasio/hidrogeniones», que constituye el elemento principal del mecanismo secretor de ácido en el estómago. La inhibición enzimática es irreversible. Por tanto el efecto terapéutico dura mucho más de lo que podría esperarse de la corta semivida biológica de los medicamentos, y permite incluso la administración una vez al día.

Actúan inhibiendo el mecanismo único por el cual las células parietales gástricas liberan hidrogeniones (H_3O^+) al jugo gástrico, intercambiándolos por K^+ , con independencia del estímulo que haya sufrido la célula parietal.

Estos fármacos son protonados en el entorno ácido de los canaliculos de las células parietales, dando lugar a un proceso de reorganización molecular, determinante para la formación de los verdaderos agentes inhibidores de la ATPasa. Fundamentalmente, son un ácido sulfénico y la correspondiente sulfenamida cíclica, ambos susceptibles de un ataque nucleofílico de un grupo tiólico (-SH) de la propia ATPasa, formando un puente disulfuro (-S-S-) covalente y, por tanto, un complejo molecular químicamente estable y biológicamente inactivo.

El esomeprazol es un estereoenantiómero M omeprazol, concretamente el S. Su eficacia como inhibidor del sistema enzimático H_3O^+/K^+ ATPasa es similar en potencia al del omeprazol racémico (mezcla de los dos isómeros, R y S), que contenga una cantidad equivalente del isómero S.

I.9.3. ALMAGATO.

El almagato es un antiácido no sistémico, que al neutralizar la acidez del jugo gástrico, trata de reducir la acción química irritante sobre la mucosa gástrica lesionada y, con ello, el dolor. Su acción es eminentemente sintomática.

El almagato es el hidroxicarbonato hidratado de aluminio y magnesio, que neutraliza el HCl de forma rápida y prolongada, siendo más eficaz la suspensión que los comprimidos; los iones aluminio y magnesio no se absorben. Neutraliza también la pepsina y los ácidos biliares. La dosis es de 3-6 g/ día (7,5 ml = 1 g), aunque en casos agudos de úlcera péptica se puede llegar a 6-8 g/ día, repartidos después de las comidas y al acostarse (Flórez, 1992).

I.9. Bibliografía.

- Adamsson I., Nord C.E., Lundquist P., Sjostedt S. y Edlund C. Comparative effects of omeprazole, amoxycillin plus metronidazole versus omeprazole, clarithromycin plus metronidazole on the oral, gastric and intestinal microflora in *Helicobacter pylori*-infected patients. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 44(5). 629-40 (1999).
- Atherton J.C.; Cullen D.J.E.; Kirk G.E.; Hawkey C.J.; Spiller R.C. Enhanced eradication of *Helicobacter pylori* by pre-versus post-prandial amoxycillin suspension with omeprazole: Implications for antibiotic delivery. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 10: 631-635 (1996).
- Bhattacharyya P.K. y Winifred M.C. Amoxicilin pg 20-41. Analytical profiles of Drug substances. Vol. 7. Ed. Florey K. 1978.

42 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

- Boixeda de Miguel D. y Martín de Arguila C. Tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud* 24 (6): 141-146 (2000).
- Brenciaglia M.I., Fornara A.M., scaltrito M.M. y Dubini F. *Helicobacter pylori*: cultivability and antibiotic susceptibility of coccoid forms. *International Journal of Antimicrobials Agents* 13: 237-241 (2000).
- Erah P.O., Goddard A.F., Barret D.A., Shaw P.N. y Spiller R.C. The stability of amoxycillin, clarithromycin and metronidazole in gastric juice: relevance to the treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 39: 5-12 (1997).
- Flórez J. *Farmacología Humana*. 2ªEd. Ediciones Científicas y Técnicas S.A. España, 1992.
- Graham D.Y., Klein P.D., Evans D.J. et al. *Campylobacter pylori* detected non invasively by the urea breath test. *Lancet* 1: 1177-1187 (1987).
- Hoffman A., Danenberg H.D., Katzhendler I., Shuval R., Gilhar D. y Friedman M. Pharmacodynamic and pharmacokinetic rationales for the development of an oral controlled-release amoxicillin dosage form. *Journal of Controlled Release* 54: 29-37 (1998).
- Kees F.; Holstege A.; Ittner K.P.; Zimmermann M.; Lock G.; Scholmerich J.; Grobecker H. Pharmacokinetic. Interaction between proton pump inhibitors and roxithromycin in volunteers. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 14: 407-412 (2000).
- Martindale, the complete drug reference. Thirty-second edition. Parfitt K. Royal Pharmaceutical Society, London, England, 1999.

- The Merck Index, an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 13th ed. Merck & Co., Inc. White house Station, NJ, USA, 2001.
- Murray P.R., Kobayashi G.S., Pfaller M.A. y Rosenthal K.S. Microbiología Médica. 2nd ed. Hancourt Brace, 1997.
- Prescott L.M., Harley J.P. y Klein D.A. Microbiología. 4th ed. McGraw Hill Interamericana, 2000.
- Real Farmacopea Española, segunda edición. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, 2002.
- Salyers A.A. y Whitt D.D. Bacterial Pathogenesis, a Molecular Approach. 1st ed. ASM Press, Washington, D.C., 1994.
- United States Pharmacopoeia, 24 edition, United States Pharmacopoeia Convention, Rockville, 2000.
- Valvo L., Alimonti S., Alimenti R., De Sena C., Ciranni Signoretti E., Draisci R. Y Giannetti L. Investigation of a new amoxicillin sodium impurity unstable in solution. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 15: 487-493 (1997).
- Valvo L., Manna, Alimenti R., Alimonti S., Bertocchi P. y Ciranni E. Amoxicillin sodium-potassium clavunate: evaluation of gamma radiation induced effects by liquid chromatography on both the individual drugs and their combination. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 21: 9-14 (1999).
- Xu Q.A. y Trissel L.A. Stability-Indicating HPLC Methods for Drug Analysis. American Pharmaceutical Association. Pharmaceutical Press, London, England, 1999.

44 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

I.11. Direcciones de Internet.

- European *Helicobacter pylori* Study group: <http://www.helicobacter.org/>
- The *Helicobacter pylori* foundation: <http://www.helico.com/>
- *Helicobacter pylori*, retos para el siglo XXI: <http://www.helicobacterspain.com/>

CAPÍTULO II: HIDROGELES COMO SISTEMAS DE RETENCIÓN GÁSTRICA.

Para la erradicación de *Helicobacter pylori* es necesario aumentar el tiempo de contacto de los antibióticos con la bacteria. Para ello, en primer lugar, los antibióticos deben alcanzar el lugar de la infección. En el caso de *H.pylori* esto es bastante difícil de conseguir, porque la bacteria se localiza en lugares de difícil acceso llamados “lugares santuario” como zonas extragástricas, regiones del estómago y partes microscópicas como las criptas gástricas (Erah y col., 1997). El antibiótico tiene que superar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del patógeno, durante un periodo prolongado. En el caso de la amoxicilina, al carecer ésta de efecto postantibiótico sobre este microorganismo, la concentración con valores superiores a la CMI debe mantenerse durante más tiempo en el lugar de la infección. Para lograr mantener la concentración de amoxicilina de una manera sostenida, durante suficiente tiempo, se pueden emplear formulaciones farmacéuticas de liberación controlada. En este capítulo se va a empezar a describir la anatomía y fisiología de la motilidad del estómago, a continuación se enumerarán los principales sistemas de retención gástrica, y por último se describirán los hidrogeles como uno de estos tipos de formulaciones.

II.1. Anatomía del estómago.

El estómago es un órgano musculoso en el que se diferencian cuatro áreas principales: cardias, fondo, cuerpo y píloro. No existen grandes diferencias entre estas cuatro zonas, aunque su función es distinta. El estómago tiene una longitud media de 20 cm y un valor medio de diámetro de 15 cm. Se representa un estómago con sus partes en la **figura 5**.

48 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*



Figura 5. Partes del estómago (Tortora y col., 1998).

El estómago presenta gran capacidad de almacenamiento y mezcla. Las dos primeras regiones, el fondo y el cuerpo son capaces de sufrir una gran expansión para acomodar comida sin un gran incremento en la presión intragástrica. El recubrimiento del estómago está desprovisto de microvellosidades, pero tiene un considerable número de pliegues que contribuyen a su capacidad de almacenamiento. Así, el cuerpo y el fondo sirven de reservorio de la comida ingerida y la región pilórica es la responsable de mezclar y moler el contenido gástrico. Bajo condiciones de ayunas el estómago es una bolsa vacía con un volumen residual de 50 ml y contiene una pequeña cantidad de fluido gástrico (pH= 1-3) y aire.

Una característica anatómica común de las partes del estómago son las cuatro capas concéntricas que lo forman. Comenzando desde la superficie luminal estas capas son: mucosa, submucosa, muscular externa y serosa.

La mucosa es una capa con distinta estructura según su distinta funcionalidad. Las células epiteliales de la mucosa gástrica son renovadas en un estómago normal a la velocidad de medio millón de células por minuto. Por lo que la capa epitelial superficial se renueva cada 1-3 días. Cubriendo estas células epiteliales hay una capa de mucus.

El epitelio de la mucosa es cilíndrico simple y contiene muchos canales estrechos, denominados criptas gástricas, que se extienden hasta la lámina propia. En la base de las criptas se encuentran las aberturas de las glándulas gástricas. Las glándulas contienen cuatro tipos de células secretoras: las células principales (cimógenas) que secretan pepsinógeno y lipasa gástrica; las células parietales (oxínticas) que secretan el ácido clorhídrico y el factor intrínseco; las células mucosas que secretan mucus y por último las células G que secretan la hormona gastrina a la sangre. El mucus se extiende y cubre no solo la superficie de la mucosa del estómago sino también el resto del tracto gastrointestinal. El espesor de las capas de mucus varía de unas regiones a otras, en el estómago oscila entre 1,0-1,5 mm de espesor. El valor medio de pH del estómago es 1,5 aunque el rango es 1-3,5. En algunas patologías y en personas mayores puede alcanzar incluso un valor de 6 (Ritschel, 1991).

Bajo condiciones fisiológicas, la absorción gástrica de la mayoría de los principios activos es insignificante como resultado de su limitada área superficial (0,1-0,2 m²) por la falta de vellosidades en la mucosa superficial, y el corto tiempo de residencia de la mayoría de los principios activos en el estómago. El contenido del estómago es vaciado a través del píloro en la región proximal duodenal del intestino delgado. En el hombre, el cruce gastroduodenal, controla el paso unidireccional desde el estómago al duodeno, aunque alguna vez existe reflujo duodeno gástrico en animales (Chien, 1992).

II.2. Motilidad gastrointestinal.

El tracto gastrointestinal está siempre en continuo estado de motilidad. Existen dos modelos de motilidad, el modo digestivo y el modo interdigestivo.

La motilidad gastrointestinal interdigestiva se caracteriza por un modelo cíclico que se origina en el anteintestino y se propaga al íleon terminal y que consta de 4 fases:

- I. Periodo de ausencia de contracción.
- II. Periodo de contracciones intermitentes.

50 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

- III. Periodo de contracciones regulares con máxima frecuencia que migra distalmente.
- IV. Periodo de transición entre la fase III y la fase I.

Un ciclo completo de las fases tiene una duración media de 90-120 minutos en hombres y perros. Ciertos estados como el sobrecrecimiento bacteriano, estados de ansiedad, y variación diurna y así como sus combinaciones, pueden influir en la duración de cada fase individual y del ciclo total. La fase III tiene un papel de guardián y sirve para expulsar todos los materiales indigestos desde el estómago y el intestino delgado.

Consecuentemente, un sistema de liberación controlada en el tracto gastrointestinal diseñado para permanecer durante el estado de ayunas debería ser capaz de resistir la acción guardián de la fase III cuando se intenta prolongar el tiempo de retención gastrointestinal.

La actividad cíclica motora de la motilidad gastrointestinal interdigestiva está asociada también con las actividades secretoras gástrica, pancreática y biliar del tracto gastrointestinal. Bajo condiciones de ayunas, las actividades migratorias y secretoras del estómago, intestino delgado y grueso, páncreas e hígado, cambian periódicamente para mejorar los medios mecánicos y químicos requeridos para el guardián gastrointestinal. La alimentación produce una interrupción del ciclo de motilidad interdigestiva y la aparición de un curioso modelo de contracción, llamada contracción postprandial, que puede ser inducida en perros por un contenido gástrico con un volumen tan pequeño como 150 ml de agua. Una comida normal puede cambiar el modelo de motilidad desde un estado de ayuno a alimentado por una duración superior a 8 horas dependiendo del contenido calórico de la comida ingerida (Chien, 1992).

II.3. Tránsito gastrointestinal.

El tiempo de tránsito es uno de los mayores factores fisiológicos limitantes en el desarrollo de formas farmacéuticas de liberación controlada en el tracto gastrointestinal, que están dirigidas a la administración una vez al día. Los modelos de tránsito gastrointestinal dependen de que la persona esté en estado alimentado o de ayuno. Además el estado físico de la forma farmacéutica (sólida o líquida), también influye en el tiempo de tránsito a través del tracto gastrointestinal.

II.3.1. Estado de ayuno.

El vaciamiento gástrico de líquidos en este estado depende del volumen administrado. Para un volumen pequeño (<100 ml) se controla por la actividad fásica existente (los líquidos son vaciados al terminar la fase II, antes de la llegada de la fase III). Para volúmenes mayores de 150 ml, los líquidos se vacían por cinéticas de descarga, que en perros es de 40-50 minutos para volúmenes pequeños y sólo de 8-12 minutos para volúmenes mayores.

La diferencia observada podría ser debida al hecho que un volumen pequeño no afecta al modelo de motilidad existente en el estómago, pero un volumen grande convierte el estado ayuno en estado alimentado y así empieza la motilidad alimentaria. El modelo de vaciamiento de líquidos en el estado de ayuno es independiente de la presencia de algún sólido indigerible en el estómago. Así para prolongar el vaciamiento gástrico de formas farmacéuticas de liberación gastrointestinal debería ser administrado con un pequeño volumen de líquidos (Davis, 1981).

Los sólidos indigeribles son vaciados del estómago en función de su tamaño. Sólidos con tamaño de partícula pequeño (<1mm) se pueden vaciar con los líquidos pero si el tamaño es de 2 mm o mayor no se vacían hasta la llegada de la próxima actividad de la fase III, y se vacían conjuntamente como un bolus. En perros en ayunas el vaciamiento gástrico de sólidos es independiente del tamaño, densidad y características de superficie. Dependiendo de la proximidad del tiempo de ingestión a la siguiente fase III, una forma sólida de dosificación puede permanecer en un estómago en ayunas entre 0-120 minutos.

52 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

Durante la fase I de la motilidad interdigestiva, cuando las contracciones están al mínimo, hay un movimiento pequeño o no hay movimiento de líquido o sólidos a través del intestino. En la fase II y III, el flujo de materiales en el lumen intestinal llega a ser progresivamente más rápido, y ocurre la segregación de sólidos y líquidos, aunque los líquidos tienden a migrar durante la fase II y los sólidos durante la fase III. Puede que la actividad motora del intestino delgado en la fase III no sea lo suficientemente fuerte para mover los sólidos. Durante el ayuno hay un movimiento relativo entre la forma farmacéutica en el intestino delgado y el fluido luminal, que puede atribuirse a las fuerzas de corte y al movimiento fluido constante alrededor de la forma farmacéutica, lo que provoca la diferencia entre la biodisponibilidad *in vivo* y la cesión *in vitro* del principio activo desde la forma farmacéutica.

Para formas de dosificación multiparticulares, una vez que se han vaciado las partículas en el intestino desde el estómago como un bolus, sólo hay una pequeña extensión de partículas en el intestino. Sin embargo, una vez en el colon, las partículas muestran tendencia a dispersarse, quizá como resultado de la alta viscosidad del contenido luminal en esta región.

II.3.2. Situación post-prandial.

Al ingerir alimentos, el fondo del estómago se expande para acomodar la comida sin un incremento apreciable en la presión intragástrica. Los líquidos se vacían a una mayor velocidad que los sólidos y la velocidad es controlada por mecanismos de feed-back desde el duodeno e íleon (Davis, 1981).

Los sólidos nos son vaciados a menos que tengan un tamaño de partícula de 2 mm o menor. Hay un mecanismo de tamización en el estómago lleno, el cual está influenciado por la viscosidad de la comida. La molienda y mezcla ocurren en la zona antral, así las formas farmacéuticas tienden a residir en esta área si son grandes. Los sistemas multiparticulares, sin embargo, se dispersan y se vacían con la comida y así consiguen un grado de distribución considerable (Chien, 1992).

La secreción gástrica también comienza a continuación de la ingestión de alimentos, y su volumen depende de la naturaleza y el volumen de la comida ingerida. El volumen vaciado es remplazado por secreción gástrica y así el volumen gástrico puede permanecer constante durante la primera hora de vaciamiento gástrico. El tiempo total para el vaciamiento gástrico varía en el intervalo de 2-6 horas. En el intestino delgado, el contenido se mueve más rápido en el estado alimentado que en la fase III del estado de ayunas, lo que facilita el tránsito de las partículas más pequeñas. El tiempo de tránsito intestinal para sólidos y líquidos, de acuerdo a su naturaleza, está alrededor de 3-4 horas en ambos estados. Esta constancia en el tránsito intestinal puede ser importante en la liberación de principio activo en el colon.

Los estudios de tránsito gastrointestinal en formas farmacéuticas como comprimidos y cápsulas, han demostrado un modelo de tránsito similar al de los nutrientes. La mayoría de las formas de dosificación tomadas oralmente en el estado de ayunas se vacían solo en el siguiente estado de ayuno (Coupe y col., 1991). Sin embargo, las formas farmacéuticas disgregables y las partículas pequeñas son vaciadas independientemente de la comida. En todos los casos el tiempo de tránsito del intestino delgado es 3-4 horas (Chien, 1992).

Como conclusión, el tiempo total de tránsito de alimentos y formas de dosificación en humanos desde el estómago al cruce ileocecal es de aproximadamente 3-6 horas en el estado de ayuno y de 6-10 horas en el estado alimentado. Esto pone un límite de 10 horas para la liberación de principios absorbidos únicamente desde la región del intestino delgado. Y es de destacar la importancia del momento de administración de forma farmacéutica con relación a la ingesta de comida.

II.4. Formas farmacéuticas de retención gástrica.

Existen numerosos principios activos que se degradan a valores altos de pH o se absorben mal en las regiones distales del intestino como captopril o riboflavina (Khan, 1995). Una estrategia para aumentar el tiempo de permanencia en el estómago es la

54 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

administración conjunta con comida que prolongaría la retención de la forma farmacéutica en el estómago, otra estrategia sería la administración de formas farmacéuticas sólidas con un tamaño mayor de 5 mm para evitar que se vacíe del estómago. Si el sujeto está comiendo continuamente durante todo el día la forma de dosificación no será vaciada hasta que se restablezca el estado de ayunas (Davis, 1981).

También existe la posibilidad de administrar conjuntamente con sustancias que retrasen el vaciamiento gástrico como los ácidos grasos que dificultan la apertura del píloro (Ritschel, 1991) o como la propantelina que enlentece el tránsito intestinal (Chien, 1992). También influyen otros factores fisiológicos en el tránsito gastrointestinal como la edad, el ejercicio físico, la hora de administración de la forma farmacéutica, las horas de sueño y la posición corporal, pero su importancia no es significativa.

Se buscan recursos tecnológicos para alcanzar una buena biodisponibilidad oral, para lo que se deben desarrollar formas farmacéuticas que permitan un mayor tiempo de permanencia en el lugar de absorción de los principios activos, a la vez que sea cómoda para el paciente y factible en la industria. Entre los sistemas que retrasan el vaciamiento de una forma farmacéutica del estómago se pueden citar los sistemas flotantes y los adhesivos (Khosla y col., 1989; Shun y col., 1993).

Algunas de las nuevas formas farmacéuticas desarrolladas con este fin, encontradas en una revisión bibliográfica (Chien, 1992; Ritschel, 1991) son:

1. Sistemas de liberación intragástrica por balance hidrodinámico, que prolonga la estancia en el tracto gastrointestinal.
2. Sistemas de liberación intragástrica flotantes, que presentan una cámara de flotación con vacío o con un gas.
3. Sistemas de liberación gastrointestinal hinchables, con una cámara que contiene un líquido que gasifica a temperatura corporal.
4. Sistemas de liberación osmóticamente controlados.
5. Sistemas con tamaño de partícula controlado.

6. Sistemas bioadhesivos de liberación gástrica, con polímeros, naturales o sintéticos, capaces de producir una interacción adhesiva con una membrana biológica como puede ser la pared gástrica.

II.4.1. Sistemas de liberación intragástrico por balance hidrodinámico, que prolonga la estancia en el tracto gastrointestinal.

Estos sistemas son formas farmacéuticas que flotan debido a que la densidad aparente que poseen es inferior a la del fluido gástrico, así permanece flotando en el estómago sin verse afectada por el vaciamiento gástrico. Básicamente, un sistema con balance hidrodinámico es una forma farmacéutica sólida que contiene entre un 20 y un 75% de uno o mas hidrocoloides como son hidroxietilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa y carboximetilcelulosa sódica. También se puede conseguir incorporando a la formulación diluyentes de baja densidad (Ritschel, 1991). La formulación debe cumplir los siguientes criterios:

- debe formar una barrera de gel con suficiente cohesión
- debe mantener una densidad menor que la del contenido gástrico (1,004-1,010)
- debe disolverse lo suficientemente lento como para servir de reservorio del principio activo.

En contacto con el fluido gástrico el polímero comienza a hincharse y forma una barrera de gel alrededor de toda superficie cuyo espesor va aumentando con el tiempo. Esta barrera de gel controla la penetración del fluido gástrico y la velocidad de liberación del principio activo. La forma farmacéutica mantiene una densidad aparente menor que la unidad lo que le permite flotar dentro del estómago durante más de seis horas (Chien, 1992).

II.4.2. Sistemas de liberación intragástrica flotantes, que presentan una cámara de flotación con vacío o con un gas.

Estos sistemas incorporan una cámara de flotación en la cual se ha hecho vacío o en los que se ha incorporado aire o gas. El principio activo se adiciona en un compartimiento microporoso con aberturas en la parte superior e inferior, pero con las paredes laterales completamente cerradas para prevenir un contacto directo con la mucosa del estómago. El

fluido gástrico penetra por las aberturas, disuelve el principio activo y se libera de la forma farmacéutica.

II.4.3. Sistemas de liberación gastrointestinal hinchables, con una cámara que contiene un líquido que gasifica a temperatura corporal.

Estas formas farmacéuticas contienen una o más cámaras hinchables que contienen un líquido que gasifica a la temperatura del cuerpo. El principio activo se encontraría en un reservorio del que iría difundiendo hacia el fluido gástrico (Ritschel, 1991). Se realiza cargando la cámara hinchable con un reservorio de principio activo (que puede ser una matriz polimérica impregnada de principio activo), y entonces se encapsula en una cápsula de gelatina.

Después de la ingestión oral se disuelve la cápsula y la cámara hinchable se hincha automáticamente reteniendo así el reservorio de principio activo en el estómago y el principio activo se va cediendo al fluido gástrico. La cámara hinchable contiene un filamento polimérico bioerosionable que se va disolviendo gradualmente en el fluido gástrico provocando finalmente que la cámara hinchable ceda el gas y continúe el tránsito gastrointestinal.

II.4.4. Sistemas de liberación osmóticamente controlados.

Estos dispositivos son aquellos que presentan una cámara de flotación con un gas formado a partir de un sólido, como carbonatos o bicarbonatos, contenidos en una matriz plástica. Al ponerse en contacto esta matriz con el fluido gástrico se satura la matriz porosa por el gas, lo que le permite flotar. El reservorio de principio activo está encerrado en un compartimiento impermeable a vapores y líquidos y con un orificio para la liberación de principios activos. El compartimiento osmóticamente activo contiene una sal osmóticamente activa encerrada en una membrana semipermeable.

En el estómago el agua penetra a través de la membrana al compartimiento osmóticamente activo para disolver la sal, creándose una presión osmótica que fuerza al compartimiento del principio activo a reducir su volumen y activar la cesión del principio

activo a través del orificio. El soporte flotante se erosiona con el tiempo dejando entonces de flotar y siendo expulsado del estómago (Chien, 1992).

Otro sistema sería una matriz bicapa, en la que una capa sería una mezcla de dióxido de carbono y la otra capa lo constituye un polímero hidrofílico. El dióxido de carbono atrapado en el hidrocoloide gelificado es liberado por la acción del fluido gástrico, manteniendo así el comprimido flotando. El polímero hidrófilo va cediendo lentamente el principio activo (Khan, 1995).

II.4.5. Sistemas con tamaño de partícula controlado.

Al administrar una forma farmacéutica con comida a perros sólo se vacían del estómago cuando se reduce el tamaño a aproximadamente 2 mm. Si son de mayor tamaño sólo se vacían con las contracciones de la fase III del estomago en ayunas. Las partículas pequeñas se vacían poco a poco del estómago en estado alimentado, sin embargo, en el estado de ayunas sale del estómago como un bolus. La naturaleza de la comida es el mayor factor de vaciamiento gástrico en el estado alimentado. Al aumentar el tamaño de la forma farmacéutica aumenta la variabilidad en el tiempo de vaciamiento gástrico (Chien, 1992).

II.4.6. Sistemas bioadhesivos de liberación gástrica.

Este tipo de sistemas incluye en la formulación un polímero con capacidad para adherirse a un tejido biológico durante un periodo de tiempo prolongado de tiempo. El polímero controlaría también la liberación del principio activo (Duchêne y Poncel, 1989; Harris y col., 1989; Zala y col., 1995).

II.5. Consideraciones generales de hidrogeles.

Los hidrogeles son estructuras basadas en redes poliméricas tridimensionales, hidrofílicas, capaces de absorber grandes cantidades de agua o de fluidos biológicos. Las redes están compuestas por homopolímeros (con la misma clase de monómeros) o copolímeros (con distintos tipos de monómeros), y son insolubles debido a la presencia de entrecruzamientos químicos (enlaces covalentes) o físicos (presentados por los complejos interpoliméricos y que son debidos a interacciones secundarias no covalentes como interacciones de Van der Waals, hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y electrostáticas). Estos entrecruzamientos proporcionan la estructura de la red y su integridad física. Estos hidrogeles poseen compatibilidad termodinámica con el agua, lo que les permite hincharse en medio acuoso (Pepas y col., 2000 y Peniche y col., 1998).

Hay numerosas aplicaciones de estos sistemas poliméricos, en concreto, en los sectores de la medicina y farmacia. Los hidrogeles se parecen al tejido vivo más que ninguna otra clase de biomaterial sintético. Esto es debido a su alto contenido en agua, y a su consistencia suave, similar al tejido natural. Además, el alto contenido en agua contribuye a su biocompatibilidad. Por lo tanto, los hidrogeles pueden emplearse como lentes de contacto, membranas para biosensores, componentes de corazones artificiales, materiales para piel artificial y sistemas de administración de fármacos.

II.5.1. Clasificación de hidrogeles.

Los hidrogeles se pueden clasificar según diferentes criterios, los cuales son los siguientes:

- La naturaleza de sus grupos funcionales: neutros o iónicos.
- Sus características mecánicas y estructurales: afines o compatibles laxas.

- El método de preparación: red homopolimérica o copolimérica.
- La estructura física de la red: amorfas, semicristalinas, estructuras unidas por puentes de hidrógeno, estructuras supermoleculares y agregados hidrocoloidales.

Los hidrogeles pueden mostrar también un comportamiento de hinchamiento que depende de las características del medio externo. Estos polímeros son hidrogeles que responden a ciertos estímulos fisiológicos, y como consecuencia los complejos poliméricos pueden romperse o hincharse como resultado de los cambios en el medio externo. Estos sistemas tienden a mostrar cambios drásticos en sus valores de hinchamiento. Algunos de los factores que influyen en estos polímeros que responden a ciertos estímulos fisiológicos incluyen: el pH, la temperatura, la fuerza iónica y las radiaciones electromagnéticas.

II.5.2. Monómeros y estructura de los hidrogeles.

II.5.2.1. Monómeros.

Una buena manera para clasificar los hidrogeles es según la naturaleza de sus grupos laterales. La naturaleza química y el número de los grupos pueden ser controlados con precisión eligiendo las entidades químicas o monómeros que se emplearán en la síntesis de los polímeros.

Los hidrogeles se han usado también como vehículos de principios activos que pueden interactuar con la mucosa que recubre el tracto gastrointestinal, el colon, la vagina y la mucosa nasal, y otras partes del cuerpo gracias a su habilidad para prolongar sus tiempos de permanencia en el lugar de administración. Primeramente se ha pensado que esta interacción entre los polímeros y las glicoproteínas de la mucosa tiene lugar mediante puentes de hidrógeno. Consecuentemente, materiales que contienen una alta densidad de grupos carboxílicos e hidroxílicos pueden ser prometedores para este tipo de aplicaciones. Los monómeros más usados para la síntesis de polímeros mucoadhesivos incluyen ácido acrílico y metacrílico. También se han utilizado otros polímeros, como el polietilenglicol

60 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

(PEG), como promotores de la adhesión. El PEG ha mostrado alargar la semivida biológica y reducir la reacción inmunológica producida por ciertas sustancias de alto peso molecular.

II.5.2.2. Estructura de la red polimérica.

El que un hidrogel sea adecuado como sistema de administración de principios activos en una determinada zona depende en gran medida de su estructura polimérica.

Los parámetros más importantes para caracterizar la red polimérica de los hidrogeles son los siguientes:

- *La fracción volumétrica del polímero ($\phi_{2,s}$)*, cuando éste se encuentra en la fase de hinchamiento, es la medida de la cantidad de fluido absorbido y retenido por el hidrogel.
- *Peso molecular de la cadena polimérica entre dos entrecruzamientos (que pueden ser físicos o químicos) consecutivos (M_c)*: es la medida del grado de entrecruzamiento del polímero. Debido al proceso aleatorio de polimerización solo se puede calcular un valor medio de M_c .
- *Tamaño de malla (ξ)* es la distancia correlativa entre dos entrecruzamientos o uniones adyacentes, la cual proporciona la medida del espacio disponible o accesible entre las cadenas macromoleculares para la difusión del principio activo. Es un valor medio.

Hay dos técnicas que sirven para elucidar la estructura de los hidrogeles, las cuáles son las siguientes:

- *Teoría del equilibrio del hinchamiento*: la estructura de los hidrogeles que no contienen grupos iónicos puede ser analizada por la teoría de Flory-Rehner. Esta teoría termodinámica afirma que un gel polimérico entrecruzado, el cual cuando es sumergido en un fluido donde se le permite alcanzar un equilibrio con el ambiente externo, está sujeto a dos fuerzas opuestas: la fuerza termodinámica de mezclado y la fuerza retroactiva de las cadenas poliméricas.

- *Teoría de la elasticidad:* los hidrogeles parecen materiales plásticos naturales, ya que al someterles a una fuerza presentan propiedades elásticas. Un hidrogel sometido a una deformación relativamente pequeña, menor de un 20%, podrá recobrar su tamaño original de una manera rápida. Este comportamiento elástico de los hidrogeles puede ser utilizado para elucidar su estructura por medio de la teoría de la elasticidad plástica, aplicada a hidrogeles preparados en presencia de un solvente (Peppas y col., 1977).

II.5.3. Propiedades físicas, químicas y toxicológicas de los hidrogeles.

II.5.3.1. Factores que afectan al hinchamiento de los geles.

Entre estos factores se encuentra la proporción de entrecruzamiento, calculada como el cociente de los moles de agente entrecruzante entre los moles de polímero. Cuanta mayor sea esta relación menor será el grado de hinchamiento, ya que el entrecruzamiento impide la movilidad de las cadenas poliméricas. También influye la estructura química del polímero, ya que al tener grupos hidrofílicos favorecerá el grado de hinchamiento. En el caso de los hidrogeles que son sensibles a cambios en el medio externo, su hinchamiento dependerá de estímulos específicos, como variaciones de temperatura, pH, fuerza iónica, campos magnéticos o luz del medio.

II.5.3.2. Dinámica del hinchamiento.

La cinética de hinchamiento se puede clasificar como: controlada por difusión (fickiana), o controlada por la relajación (no fickiana). Cuando la difusión de agua hacia el interior del hidrogel ocurre mucho más deprisa que la relajación de las cadenas poliméricas la cinética de hinchamiento es controlada por la difusión.

II.5.3.3. Propiedades mecánicas.

Estas propiedades son muy importantes para las aplicaciones farmacéuticas de los hidrogeles. Al aumentar el grado de entrecruzamiento se obtienen geles más fuertes, se

62 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

tiene que alcanzar un grado óptimo para que el gel mantenga todavía sus propiedades elásticas. También influye la estructura química de los monómeros, ya que éstos pueden propiciar la formación de enlaces no covalentes como por ejemplo puentes de hidrógeno que aumenten la fuerza de la estructura polimérica.

II.5.3.4. Citotoxicidad y toxicidad in vivo.

Los cultivos celulares, conocidos como pruebas de citotoxicidad, pueden ser utilizados para evaluar la toxicidad de los hidrogeles. La mayoría de los problemas de toxicidad están asociados a restos de monómeros que no han reaccionado, agentes entrecruzantes o iniciadores de reacciones químicas que permanecen en la estructura del hidrogel, ya que no se han eliminado bien. Para solventar este problema se han modificado las reacciones de polimerización, para que sean extensivas, se ha llevado a cabo el lavado de hidrogeles para eliminar restos de agentes entrecruzantes, se han utilizado técnicas de polimerización que no necesitan de este tipo de agentes o iniciadores, o se han unido las cadenas poliméricas mediante uniones físicas.

II.5.4. Sistemas de cesión controlada con hinchamiento sensible a los estímulos exteriores.

La cesión controlada de principios activos desde hidrogeles poliiónicos puede responder a cambios en los parámetros ambientales, como: el pH, la temperatura y otros estímulos. Así, hidrogeles interpoliméricos como ácido poliacrílico/ alcohol polivinílico o ácido poli metacrílico unido a polietilenglicol pueden formar complejos reversibles según las condiciones de temperatura y de pH del medio externo (Shin y col., 1997 y Bell y col., 1996).

En el caso de algunos hidrogeles poliiónicos o polielectrolíticos, el equilibrio de hinchamiento y el tamaño de malla fueron causados por el porcentaje de componente iónico y por el grado de ionización del principio activo (Bell y col., 1996; Khare y col., 1993 y Bettini y col., 1995). Por ejemplo, Peniche y col. (1998) han verificado la habilidad de formar

complejos del ácido salicílico y derivados del ácido acrílico con ligandos polivalentes catiónicos como el quitosán. Asimismo, en copolímeros de ácido polimetacrílico unido a etilenglicol Bell y col. (1996) han descrito que la presencia de iones específicos modificaba la difusión del soluto.

Por otra parte, Gabrielli y col. 1998, estudiaron las propiedades de hinchamiento de hidrogeles de xilán y quitosán sometidos a la influencia de varios pH y concentraciones de cloruro sódico (0,075 M y 0,15 M). El efecto de adición de cloruro sódico podría ser explicado por el aumento de la cantidad total de iones que disminuye la relación entre los iones de dentro del hidrogel y el medio externo. Por lo tanto, en condiciones extremas de pH (pH=3 y pH=12) el grado de hinchamiento disminuye cuando la fuerza iónica del medio aumenta.

II.5.5. Tratamiento matemático de las cinéticas de cesión.

La mayoría de los modelos cinéticos teóricos están basados en ecuaciones de difusión. El fenómeno de difusión está íntimamente relacionado con la estructura del material a través el cual la difusión tiene lugar, por lo tanto la morfología de los materiales poliméricos juega un importante papel en la cesión de los principios activos.

La difusión consiste en la cesión de un principio activo desde un vehículo polimérico, que consiste en el movimiento del fármaco a través de la estructura del polímero. Este fenómeno está controlado por las limitaciones de la transferencia de masa a través de la demarcación entre el polímero y el medio externo.

En el nivel macromolecular la difusión de las moléculas de principio activo a través del vehículo polimérico puede ser descrita a través de las siguientes ecuaciones [1] y [2] de la ley de difusión de Fick:

$$J_i = -D_{ip} \frac{dc_i}{dx} \quad [1]$$

64 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = D_{ip} \frac{\partial^2 c_i}{\partial x^2} \quad [2]$$

La concentración y el flujo del los compuesto i están designados como c_i y J_i , respectivamente; D_{ip} es el coeficiente de difusión del compuesto i , en la matriz polimérica, y x y t son las variables independientes de posición y tiempo, respectivamente.

Las ecuaciones [1] y [2] describen la cesión de un principio activo desde un vehículo con una geometría plana. Se considera que el coeficiente de difusión es independiente de la concentración. J_i es un flujo con respecto a la velocidad media, u , de la masa del sistema.

Para incrementar el poder de predicción de la ecuación de la ley de Fick, se introdujeron algunas modificaciones para que el coeficiente de difusión dependiera de la concentración del compuesto (ver ecuación [3]), esta dependencia está afectada por las características estructurales del vehículo polimérico, por lo tanto hay variaciones en los coeficientes de difusión según la composición de la matriz polimérica o del sistema de cesión.

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial z} = \left(D_{ip}(c_i) \frac{\partial c_i}{\partial x} \right) [3]$$

Se pueden clasificar los sistemas de cesión controlada en las siguientes categorías:

- *Sistemas de difusión controlada.*
- *Sistemas controlados químicamente*
- *Sistemas de hinchamiento controlado*

II.5.5.1. Sistemas de difusión controlada.

Los sistemas reservorio de difusión controlada consisten en un principio activo contenido en un núcleo separado del medio externo por una membrana polimérica. El análisis de la cesión del fármaco a través de estos sistemas demostró ser de orden 0, es decir, que no dependía del tiempo, para geometrías planas, cilíndricas y esféricas.

Por ejemplo, las ecuaciones [4] y [5] dan la velocidad de cesión y la cantidad total de principio activo cedido para sistemas de geometría esférica.

$$\frac{dM_t}{dt} = \frac{4pD_{ip}K}{(r_e - r_i)/(r_e r_i)} (c_{i2} - c_{il}) \quad [4]$$

$$M_t = \frac{4pD_{ip}K(c_{i2} - c_{il})}{(r_e - r_i)/(r_e r_i)} \quad [5]$$

D_{ip} es el coeficiente de difusión independiente de la concentración, M_t es la cantidad de principio activo cedida a tiempo t , K es el coeficiente de partición del principio activo, y r_e y r_i son los radios externo e interno de la esfera, respectivamente. Finalmente, c_{i2} y c_{il} son las concentraciones de principio activo dentro y fuera de la matriz, respectivamente.

En comparación con las formulas para unas geometrías planas y cilíndricas, la cesión del fármaco puede ser controlada por la geometría del sistema. Asimismo, la cantidad de principio activo cedido está controlada por el grosor de la membrana, la diferencia de concentraciones a través de la membrana, las características termodinámicas del sistema por medio del coeficiente de partición y la estructura del polímero a través del coeficiente de difusión.

En los sistemas matriciales, que son también de difusión controlada, el principio activo puede estar disuelto o en forma de dispersión. La cesión del fármaco está modulada por la fórmula [3], con el coeficiente de difusión dependiente de la concentración. En este caso la fracción de principio activo cedida de estos sistemas matriciales poliméricos es proporcional a $t^{1/2}$.

II.5.5.2. Sistemas controlados químicamente.

Este tipo de sistemas se puede dividir en dos subclases de cesión controlada: i) sistemas erosionables: la velocidad de cesión del principio activo está controlada por la degradación o disolución del polímero; ii) sistemas con el principio activo unido a las

66 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

cadena polimérica por medio de enlaces que son lábiles hidrolíticamente o enzimáticamente, y la velocidad de cesión está controlada por la degradación de estas uniones.

A diferencia del segundo subgrupo (ii), en los sistemas erosionables tiene lugar una difusión normal, y el mecanismo de cesión del principio activo está gobernado por la supremacía de la difusión o de la erosión. Si la erosión de la matriz es más lenta que la difusión del fármaco a través de la red polimérica, la cesión se puede analizar utilizando las ecuaciones de la sección II.5.5.1. Por otra parte si el principio activo permanece incorporado dentro de la matriz debido a un bajo coeficiente de difusión, la cesión del fármaco estará controlado por la erosión. Hay dos tipos de erosión: homogénea o heterogénea, como consecuencia de si el grado de hidrofobicidad y morfología del polímero. Los polímeros hidrófilos absorben mucho agua, por lo tanto la erosión tendrá lugar en toda la matriz polimérica (homogénea), en cambio, en los polímeros hidrófobos, la erosión sólo tiene lugar en la superficie, o heterogéneamente, porque el agua no penetra dentro de la matriz polimérica, estos últimos siguen una cinética de orden 0.

II.5.5.3. Sistemas de hinchamiento controlado.

Estos sistemas consisten en matrices hidrófilas, y que la cesión del principio activo está controlada por la entrada de moléculas de solvente, que producen el hinchamiento de la matriz polimérica. En estos sistemas los fármacos están disueltos o formando una dispersión en los polímeros en estado cristalino o vítreo. Inmediatamente después de ponerse en contacto con los fluidos biológicos la matriz polimérica comienza a hincharse y se pueden observar dos fases distintas en el polímero: una fase interior vítrea y una fase plástica que se encuentra hinchada. Las moléculas de principio activo son capaces de difundir a través de la fase elástica del polímero. Por lo tanto, la cesión del fármaco está controlada por la velocidad y posición de la interfase entre la parte cristalina y la plástica, ya que el fármaco no difunde a través de la fase cristalina. En la interfase ocurre un importante fenómeno de relajación de las cadenas poliméricas que afecta a la cesión del principio activo.

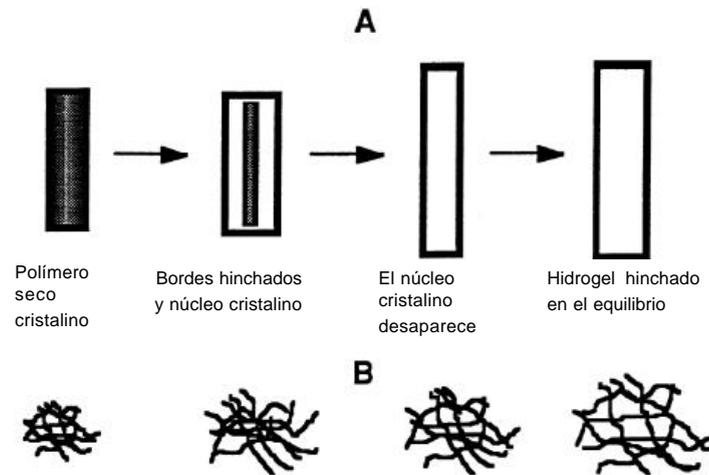


Figura 6. Descripción de la relajación de un polímero durante la entrada de agua a una sistema en forma de bloque (A), y en el nivel molecular (B). Las regiones sombreadas representan las regiones poliméricas cristalinas (Brazel y Peppas, 1999).

Las consecuencias de este fenómeno se pueden determinar ajustando los resultados de velocidad de disolución a la ecuación [6] y determinando el exponente, n .

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n \quad [6]$$

Es muy importante que se aplique esta ecuación sólo al primer 60% de la cantidad total cedida de fármaco. M_t y M_∞ son las cantidades de fármaco cedidas a tiempo t y en el equilibrio, respectivamente; K es la constante de proporcionalidad y n es el exponente de difusión. Según el exponente de difusión n el principio activo sigue varios mecanismos de transporte (ver **tabla 4**).

Tabla 4. Interpretación de los mecanismos de difusión a través de los datos de cesión del fármaco a partir de películas poliméricas (Peppas et al., 1985).

Exponente de difusión (<i>n</i>)	Mecanismo de transporte	Velocidad (dM/dt)
0,5	Difusión Fickiana	$t^{-0,5}$
0,5< <i>n</i> <1,0	Anómalo, no Fickiano	t^{n-1}
1,0	Transporte caso II	Orden 0 (independiente del tiempo)
<i>n</i> >1,0	Transporte super caso II	t^{n-1}

Empleando esta ecuación para analizar los datos de cesión de fármaco desde un sistema poroso probablemente presentará un $n < 0,5$, como consecuencia de la combinación de mecanismos de difusión a través de la matriz hinchada y difusión a través de poros llenos de agua (Peppas y col., 1985). Ahn y col. (2002) realizaron análisis de un comportamiento de difusión fickiana o no fickiana según el valor del coeficiente *n* en polímeros mucoadhesivos compuestos por quitosán y ácido poliacrílico.

II.5.6. Aplicaciones de los hidrogeles en la administración de principios activos.

Los hidrogeles pueden ser empleados como sistemas de transporte de fármacos al ser materiales muy diversos y versátiles, ya que pueden ser sintetizados a partir de multitud de precursores y de maneras muy diferentes para ajustar sus propiedades a la aplicación determinada. Los hidrogeles e pueden utilizar en la administración en la cavidad oral, en el tracto gastrointestinal, rectal, ocular, transdérmica y subcutánea.

La administración de principios activos en la cavidad oral tiene múltiples aplicaciones, entre las cuales se encuentra: enfermedades de la boca, como estomatitis, periodontitis, infecciones fúngicas y virales, y cánceres de la cavidad oral. Para conseguir la administración de fármacos en esta zona se deben obtener adhesiones que puedan resistir el copioso flujo de la saliva. Hay ya comercializadas formulaciones de este tipo en forma de comprimidos bioadhesivos (Aftach®).

Asimismo, se pueden emplear ungüentos basados en hidrogeles para el tratamiento de ciertas enfermedades en la cavidad oral. Y no solo se puede utilizar como un sistema de administración de fármacos sino como vehículo de administración de liposomas (que contienen el principio activo encapsulado en su interior), este último tiene la ventaja, frente a los ungüentos convencionales, que los liposomas alcanzan un mayor efecto local y menor concentración plasmática del principio activo, lo cual evita efectos secundarios no deseados.

De todas las posibles rutas de administración la vía oral es la más simple y segura. Sin embargo, el tracto gastrointestinal presenta entornos heteogéneos y complejos con diversas funciones adecuadas a los requerimientos fisiológicos. Pero por otra parte, esta complejidad proporciona una oportunidad única para diseñar hidrogeles con mecanismos que permitan controlar la liberación del fármaco.

En la administración rectal, los hidrogeles presentan propiedades bioadhesivas, que ayudan a lograr una cesión sostenida en el mismo lugar incrementando la biodisponibilidad de algunos principios activos que sufren un extensivo efecto de primer paso en el hígado.

En la administración ocular los hidrogeles presentan mayor retención en el ojo debido a sus propiedades elásticas, y por su alto contenido en agua producen un menor malestar en los pacientes. Concretamente, los hidrogeles que se forman *in situ*, son muy prometedores como sistemas de liberación ocular, ya que se dosifican en forma de líquido y se retienen durante tiempos prolongados como geles después de la dosificación.

Los hidrogeles también son adecuados para la administración de principios activos por vía subcutánea debido a que poseen una alta biocompatibilidad.

II.6. Hidrogeles de retención gástrica.

La administración específica de antibióticos en el estómago, empleando nuevas formulaciones galénicas, podría mejorar el tratamiento de *Helicobacter pylori*. *In vivo* la bacteria está asociada a la capa mucosa gástrica adherente, viviendo dentro, y por debajo

70 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

de ella, y adhiriéndose a las células gástricas epiteliales (Goddard y col., 1996). El fracaso de los tratamientos convencionales podría deberse a la falta de permeabilidad de los antibióticos a través de la capa mucosa, o porque se alcanzan concentraciones sub-terapéuticas en el lugar de la infección después de la administración de comprimido o cápsulas convencionales. Recientemente varios autores han señalado que hidrogeles unidos por enlaces químicos o físicos, con hinchamiento controlado por cambios en el pH, parecen ser muy útiles para la administración de antibióticos en el fluido ácido gástrico. Una de las ventajas más importantes de estos hidrogeles es que la formulación permanece durante más tiempo que las convencionales en el lugar diana (en el foco de la infección). Patel y col. (1996) y Risbud y col. (2000) han empleado hidrogeles liofilizados para la administración localizada de amoxicilina y metronidazol en el estómago. Además de estos autores otros han desarrollado hidrogeles basados en quitosán y unidos por enlaces covalentes para realizar un tratamiento localizado (Shanta y col., 2000).

Algunas mezclas heterogéneas de polímeros pueden ser empleadas para formas hidrogeles sin la necesidad de uniones covalentes, a través de interacciones electrostáticas entre polímero/ polímero y polímero/ principio activo (Noble y col., 1999; Bae y col., 1993; Chellat y col., 2000 y Dumitriu y col., 1998). La lenta erosión de estos hidrogeles no unidos por enlaces covalentes en medio acuoso es una ventaja que les convierte en un material biodegradable y más biocompatible que los hidrogeles que poseen uniones covalentes (Noble y col., 1999). Complejos poliiónicos no covalentes se forman entre la mayoría de los compuestos policationicos y polianiónicos. Algunos de los polímeros que muestran una complejación poliiónica son el quitosán con ácido poliacrílico (Wang y col., 1997).

Recientemente han sido estudiados ciertos aspectos de una posible interacción entre los grupos cargados o ionizados del polímero y del principio activo (Bettini y col., 1995; Khare y col., 1993 y Bell y col., 1996). Los resultados mostraron que cuando el tamaño de soluto aumentaba (Bell y col., 1996) y en principios activos altamente solubles en agua (Bettini y col., 1995) se observó una más baja difusividad. Sin embargo, no se han encontrado en la bibliografía consultada estudios sobre la influencia de soluciones con diferentes fuerzas iónicas, empleados en la preparación de hidrogeles liofilizados.

Alguno de los excipientes farmacéuticos más habituales en las formas de retención gástrica es el chitosán. Además los derivados del ácido poliacrílico (como el Carbopol® 974P NF) son también comúnmente utilizados en farmacia por vía oral. Por lo que a continuación se describen algunas de las características más interesantes de ambos compuestos.

II.6.1. Chitosán.

Es un polímero hidrofílico de origen natural sintetizado a partir del quitín, [(1-4)-2-acetamido-2-dioxi- β -D-glucano], que forma parte del exoesqueleto de crustáceos, insectos y también aparece en algunos tipos de hongos, mediante una N-deacetilación en condiciones alcalinas, es además un polímero catiónico de naturaleza polisacárida, de baja toxicidad y biocompatible (Illum y col., 1994; Wan y col., 1994; Aspden y col., 1995). Es un polímero básico ya que posee grupos funcionales aminos, y ofrece grandes posibilidades de ser modificado, de sufrir interacciones iónicas y reacciones de adición de otros compuestos (Peniche y col., 1998). Como polímero policatiónico ha sido usado para formar complejos polielectrolíticos con proteínas de naturaleza ácida presentes en una gran variedad de fluidos biológicos, con polianiones naturales como la carboximetilcelulosa, el ácido alginico, el sulfato de dextrano, el carboximetildextrano, heparina, carragenano y la pectina (Chellat y col., 2000). Asimismo, el chitosán carece de efectos irritantes, no produce alergia y es biocompatible con piel humana sana e infectada ya que posee una dosis letal, DL_{50} , muy elevada de 16 g/kg en ratones después de su administración intravenosa (Dodane y col., 1998).

Su hinchamiento es depende del pH del medio, hinchándose mucho a bajo pH (Patel y col., 1996). Se ha comprobado que el chitosán tiene cierta capacidad mucoadhesiva mediada por la interacción iónica entre la carga de los grupos amino del chitosán y la carga negativa de los residuos del ácido siálico en el mucus, lo cual ayudaría a la formulación a permanecer en el medio gástrico una vez sean degradadas las cápsulas. Esta capacidad mucoadhesiva se pierde rápidamente transcurridas unas horas (Illum y col., 1994 y Aspden y col., 1995).

Además el chitosán es soluble en una gran variedad de ácidos entre los que se encuentra el ácido acético formando geles, e insoluble en agua. Estos geles pueden ser

72 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

usados como barreras para la cesión controlada de los sustratos incorporados a la matriz (Wan y col., 1994; Aspden y col., 1995).

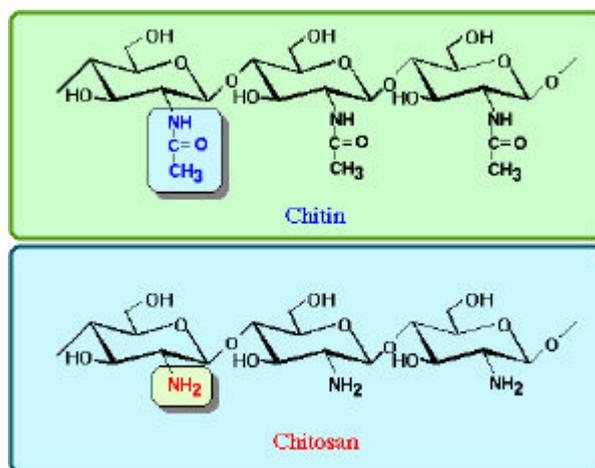


Figura 7. Estructura química del chitín y chitosán (fuente: www.user.chollian.net).

El chitosán sólo o en combinación con varios polímeros aniónicos ha sido empleado en muchos estudios de hidrogeles poliónicos a causa de sus buenas propiedades de cesión sostenida, biocompatibilidad y biodegradabilidad (Noble y col., 1999; Peniche y col., 1998; Gabrielli y col., 1998; Wang y col., 1997; Dumitriu y col., 1998; Sugimoto y col., 1998; Remuñán-López y col., 1998; Bae y col., 1993; Chellat y col., 2000 y Gupta y col., 2000). Este polímero posee grupos funcionales representados por los grupos aminos, se degrada fácilmente por enzimas y los productos de degradación no son tóxicos (Peniche y col., 1998; Remuñán-López y col., 1998; Bae y col., 1993 y Chellat y col., 2000).

II.6.2. Derivados del ácido poliacrílico: Carbopol[®] 974P NF o Carbomer 934 P.

El carbopol (carbomer), es un polímero derivado del ácido acrílico, entrecruzado con alil sucrosa o alilpentaeritritol, es soluble en agua, alcohol y glicerina (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2000), es un ácido débil y posee un gran peso molecular (aproximadamente 3500000 daltons) (Jacques y col., 1997). Algunos de estos polímeros, como el 934 P o el 974 P, poseen la capacidad de sostener la cesión de las drogas dispersas en la matriz y son aptos para su administración por vía oral.

Su utilización como matriz para la liberación controlada de drogas, y sus propiedades mucoadhesivas han sido ampliamente estudiadas (Singla y col., 2000). Como estos compuestos son polianiónicos poseen la capacidad de formar complejos poliónicos con otros policationes, como el chitosán (Wang y col., 1997). El hinchamiento del carbopol 934 P NF depende del pH del medio, proporciona una cesión sostenida del principio activo en medio gástrico, pero cede más rápidamente el fármaco en medios de pH más alto, es decir en el tracto intestinal (Kratz y col., 2000, Nakanishi y col., 1998, Slovin y col., 1997, Shin y col., 1996 y Meshali y col., 1996). Asimismo, estos compuestos han sido utilizados con éxito como agentes protectores de mucosa (Copeman y col., 1994).

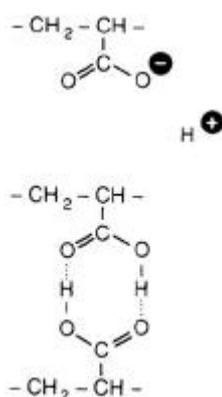


Figura 8. Estructura química del ácido acrílico. Este compuesto es un ácido débil, que se ioniza a $\text{pH} > 4,5$, y puede formar puentes de hidrógeno con otras moléculas de ácido acrílico (Annaka y col., 1992).

II.7. Bibliografía.

- Ahn J.S.; Choi H.K.; Cho C.S. Chun M; Ryu J.; Jung J.; Kim Y. And Cho CS. Release of triamcinolone acetate from mucoadhesive polymer composed of chitosan and poly(acrylic acid) *in vitro*. *Biomaterials* 23:1411-1416 (2002).

74 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

- Annaka M. y Tanaka T. Múltiple phases of polymer gels. *Nature*, 355 (30): 430-432 (1992).
- Aspden T.J; Illium L; Skaugrud. The absence of chitosan toxicity when applied to nasal mucosa. *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 22 (1995), Controlled Release Society, Inc.
- Bae Y. H., Kim S. W. Hydrogel delivery systems based on polymer blends, block-copolymers or interpenetrating networks. *Adv. Drug. Del. Rev.* 11: 109-135 (1993).
- Bell C. L. and Peppas N. A. Modulation of drug permeation through interpolymer complexed hydrogels for drug delivery applications. *J. Control. Release.*; 39: 201-207 (1996).
- Bettini R., Colombo P., Peppas N. A. Solubility effects on drug transport through pH-sensitive, swelling-controlled release systems: transport of theophylline and metoclopramide monohydrochloride. *J. Control. Release* 37: 105-111 (1995).
- Brazel C.S., Peppas N.A. Dimensionless analysis of swelling of hydrophilic glassy polymers with subsequent drug release from relaxing structures. *Biomaterials* 20: 721-732 (1999).
- Chellat F., Tabrizian M., Dumitriu S., Chornet E., Rivard C. H., Yahia L. Study of biodegradation behavior of chitosan-xanthan microspheres in simulated physiological media. *J. Biomed. Mater. Res.* 53: 592-599 (2000).
- Chien Y.W. Novel drug delivery systems. 2nd ed. Marcel Dekker Inc. Amsterdam, 1992.

- Coupe A.J., Davis S.S. y Wilding I.R. Variation in gastrointestinal transit of pharmaceutical dosage forms in healthy subjects. *Pharmaceutical research* 8 (3): 360-364 (1991).

- Davis S. Evaluation of the gastrointestinal transit and release characteristics of drugs. En: Johnson P. y Lloyd-Jones J-G. Drug delivery systems. Fundament and Techniques. Ellis Horwood Ltd, Chichester, England, 1981.

- Dodane V. y Vilivalam V.D. Pharmaceutical applications of chitosan. *PSTT* 1(6): 246-253 (1998).

- Duchêne D. y Ponchel G. Bioadhesion. A new pharmacotechnical method for improving therapeutic efficiency. *S.T.P. Pharma.* 5 (12): 830-838 (1989).

- Dumitriu S. and Chornet E. Inclusion and release of proteins from polysaccharide-based polyions complexes. *Advance Drug Del. Rev.* 31: 223-246 (1998).

- Erah P.O., Goddard A.F., Barret D.A., Shaw P.N. y Spiller R.C. The stability of amoxicillin, clarithromycin and metronidazole in gastric juice: relevance to the treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 39: 5-12 (1997).

- Gabrielli I., Gatenholm P. Preparation and properties of hydrogels based on hemicellulose. *J. Appl. Polym. Sci.* 69: 1661-1667 (1998).

- Goddard A. F. and Spiller R. C. The effect of omeprazole on gastric juice viscosity, pH and bacterial counts. *Aliment. Pharm. Therap* 10: 105-109 (1996).

76 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

- Gupta K.C., Ravi Kumar M.N.V. Drug release behavior of beads and microgranules of chitosan. *Biomaterials* 21: 1115-1119 (2000).
- Handbook of Pharmaceutical Excipients. 3^d ed. The Pharmaceutical Press-American Pharmaceutical Association (2000).
- Harris D., Fell J.T., Sharma H. Taylor D.C. y Linch J. Studies on potential bioadhesive systems for oral drug delivery. *S.T.P. Pharma* 5: 852-856 (1989).
- Illum L., Farraj N.F., Davis S.S. Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs. *Pharmaceutical Research*, 11 (8): 1186-1190 (1994).
- Jacques Y. y Buri P. An investigation of the physical behaviour of moisture-activated mucoadhesive hydrogels upon contact with biological and non-biological substrates. *Pharmaceutica Acta Helveticae* 72: 225-232 (1997).
- Khan M.C.I. Recent trends and progress in sustained or controlled oral delivery of some water soluble drugs: morphine salts, diltiazem and captopril. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 21(9): 1037-1070 (1995).
- Khare A. R. and Peppas N. A. Release behavior of bioactive agents from pH-sensitive hydrogels. *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.*; 4: 275-289 (1993).
- Khosla R., Feely L.C. y Davis S.S. Gastrointestinal transit of non-disintegrating tablets in fed subjects. *Int. J. Pharm.* 53: 107-117 (1989).
- Kratz K., Hellweg T., Eimer W. Influence of charge density on the swelling of colloidal poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) microgels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 170, 137-149 (2000).

- Meshali M.M., El-Sayed G.M., El-Said Y. y El-Aleem H.M. Preparation and evaluation of theophylline sustained release tablets. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 22(4): 373-376 (1996).
- Nakanishi T., Kaiho F. y Hayashi M. Improvement of drug release from carbopol 934 P formulation. *Chem. Pharm. Bull*, 46(1): 171-3 (1998).
- Noble L., Gray A. I., Sadiq L. and Uchegbu I. F. A non-covalently cross-linked chitosan based hydrogel. *Int. J. of Pharmaceutics* 192: 173-182 (1999).
- Patel V. R., and Amiji M. M. Preparation and characterization of freeze-dried chitosan-poly (ethylene oxide) hydrogels for site-specific antibiotic delivery in the stomach. *Pharmaceutical Research* 13: 588-593 (1996).
- Peniche C., Elvira C., San Roman J. Interpolymer complexes of chitosan and polymethacrylic derivatives of salicylic acid: preparation, characterization and modification by thermal treatment. *Polymer* 39: 6549-6554 (1998).
- Peppas N.A. Analysis of Fickian and Non-Fickian drug release from polymers. *Pharm. Acta Helv.* 60 (4): 110-111 (1985)
- Peppas N.A., Bures P., Leobandung W. Y Ichikawa H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50: 27-46 (2000).
- Peppas N.A., Merrill E.W. Crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels as swollen elastic networks. *J. Appl. Polym. Sci.* 21: 1763-1770 (1977).
- Remuñán-López C., Portero A., Vila-Jato J.L., Alonso M. J. Design and evaluation of chitosan/ ethylcellulose mucoadhesive bilayered devices for buccal drug delivery. *J. Control. Release* 55: 143-152 (1998).

78 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

- Risbud M. V., Hardikar A. A., Bhat S. V. and Bhonde R. R. pH-sensitive freeze-dried chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogels as controlled release systems for antibiotic delivery. *J. Control. Release* 68: 23-30 (2000).
- Ritschel W.A. Targeting in the gastrointestinal tract: new approaches. *Meth.Ind. Exp.Cli. Pharmacol.* 13 (5): 313-336 (1991).
- Shanta K. L., Harding D. R. K. Preparation and in-vitro evaluation of poly [N-vinyl-2-pyrrolidone-polyethylene glycol diacrylate]-chitosan interpolymeric pH-responsive hydrogels for oral drug delivery. *Int. J. Pharmaceutics* 207: 65-70 (2000).
- Shin H. S., Kim S. Y., Lee Y. M. Indomethacin release behaviors from pH and thermoresponsive poly (vinyl alcohol) and poly (acrylic acid) IPN hydrogels for site-specific drug delivery. *J. Appl. Polym. Sci.* 65: 685-693 (1997).
- Singla A.K., Chawla M. y Singh A. Potential Applications of Carbomer in Oral Mucoadhesive Controlled Drug Delivery System: A Review. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 26 (9): 913-924 (2000).
- Shun P.L., Pendharkar C.M., Mehta G.N., Karth M.G. y Feld K.M. Sucralfate as a bioadhesive gastric intestinal retention system: preliminary evaluation. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 19(19): 2519-2537 (1993).
- Slovin E.M., Robinson J.R. *In vivo* swelling kinetics of a series of hydrogel polymers in the cannulated gastrointestinal tract of the canine. *Int. Journal of Pharmaceutics*, 155 (1): 53-63 (1997).
- Sugimoto K., Yoshida M., Yata T., Higaki K., Kimura T. Evaluation of poly (vinyl alcohol)-gel spheres containing chitosan as dosage form to control gastrointestinal transit time of drugs. *Biol. Pharm. Bull.* 21: 1202-1206 (1998).

- Tortora G.J. y Grabowski S.R. Principios de Anatomía y Fisiología. 7ª ed. Harcourt Brace. España, 1998.
- Wan L.S.C., Lim L.Y. y Soh B.L. Drug release from chitosan beads. S.T.P. *Pharma Sciences*, 4 (3): 195-200 (1994).
- Wang H.; Li W.; Lu Y. and Wang Z. Studies on chitosan and poly (acrylic acid) interpolymer complexes. I. Preparation, structure, pH-sensitivity and salt sensitivity of complex-forming poly (acrylic acid): chitosan semiinterpenetrating polymer network. *J. Appl. Polym. Sci.* 65: 1445-1450 (1997).
- Zala Y.R., Samarth M.M. y Sanhavi N.M. Utility of mucoadhesive polymers in oral controlled release delivery of furosemide. 14th Pharm. Techn. Conf. 14 (2a): 490-508 (1995).

II.8. Direcciones de Internet.

- HAN, Sang-Mun, Ph. D. 's Chitin and Chitosan Sciences: <http://www.user.chollian.net>
- Noveon Pharmaceuticals: <http://www.pharma.noveoninc.com/>

CAPÍTULO III: EVALUACIÓN DEL VACIAMIENTO GÁSTRICO

La ruta de administración oral de un principio activo es la más simple y segura, ya que es la vía fisiológica de introducción de principios activos en el organismo, no presenta problemas de esterilidad, y el riesgo de daño en el lugar de administración es muy bajo. Asimismo, tiene una gran aceptación por parte de los pacientes, ya que es más fácil el cumplimiento del tratamiento. La eficacia de estos procesos de liberación y captación depende tanto de las características físico-químicas del principio activo (solubilidad, estabilidad en medios ácidos y alcalinos, permeabilidad a través de las membranas gastrointestinales) como de las variables fisiológicas del tránsito gastrointestinal.

En este trabajo se han desarrollado formas farmacéuticas de cesión controlada (cesión modificada) para el tratamiento local de *H. pylori*. Por medio de estos sistemas se quiere administrar el principio activo, logrando una cesión sostenida del antibiótico, durante la residencia gástrica de la formulación, en un lugar específico dentro del tracto gastrointestinal, como es el estómago. Por lo tanto es de gran interés estudiar el vaciamiento gástrico de estas formulaciones y comprobar si durante ese tiempo habrá porcentajes suficientes de antibiótico cedido en el medio gástrico. Esto se realizará correlacionando los resultados de residencia gástrica *in vivo* con los de cesión de amoxicilina *in vitro*.

III.1. El vaciamiento gástrico.

Es la respuesta de las paredes del estómago al estímulo que constituye la presencia de alimento en el estómago, vaciando su contenido al intestino delgado para una posterior digestión y absorción (Vázquez, 2002).

Su funcionamiento está regulado por un mecanismo de control constituido en parte por los propios nutrientes, por receptores localizados en el estómago e intestino delgado, y a través del sistema nervioso central vía vago y simpático, además de la actuación de algunas hormonas.

El vaciamiento de los líquidos depende de la presión generada por el fondo y el cuerpo gástrico, y no requiere la participación del peristaltismo antral. La velocidad depende de las características de la comida líquida, disminuyendo con el volumen, contenido graso, osmolaridad o acidez. La vagotomía al inhibir la relajación del cuerpo gástrico, acelera la evacuación de los líquidos.

El píloro interviene por un lado en la trituración de los sólidos y por otro permitiendo únicamente el paso de líquidos y de partículas menores de 1 mm. El píloro está a su vez, regulado por el antro y el duodeno.

La determinación del vaciamiento gástrico tiene en la práctica clínica un gran valor para el diagnóstico y tratamiento de muchas alteraciones del tracto digestivo. Alteración que se presenta en ocasiones como consecuencia de una enfermedad de base, como ocurre en la diabetes mellitus donde en fases avanzadas puede aparecer una gastroparesia secundaria. Otras veces se debe a un trastorno de la motilidad sin que haya una causa conocida; es el caso de la dispepsia funcional, que se presenta en la población general con una prevalencia superior al 20% (**tabla 5**).

Tabla 5. Síntomas de mal-vaciamiento gástrico (Vázquez, 2002).

Retraso en el vaciamiento	Vaciado rápido
Plenitud epigástrica	Plenitud epigástrica
Sensación de plenitud precoz	Sensación de plenitud precoz
Náuseas y vómitos	Náuseas y vómitos
Pérdida de peso	Pérdida de peso
Pirosis	Retortijones abdominales
Regurgitación	Diarrea
Eructos	Síntomas de hipovolemia
	Síntomas de hipoglucemia

Entre los métodos de valoración del vaciamiento gástrico existentes en la actualidad están, la radioescintigrafía, las técnicas ultrasónicas, de impedancia, imágenes obtenidas por resonancia magnética, pruebas en suero y prueba de aliento con isótopos estables.

III.1.1. Radioescintigrafía.

Consiste en marcar con un radioisótopo una comida de prueba, obteniendo por medio de una cámara de centelleo imágenes de las porciones del estómago y duodeno recorridas por esta comida marcada, en función del tiempo. Es una prueba muy sensible y está considerada como el *gold standard* (la técnica de referencia), pudiendo medir el vaciamiento de sólidos y líquidos. Su inconveniente es el de utilizar isótopos radiactivos a dosis superiores a 0,9 mGy, por lo que no se puede utilizar en niños, mujeres en edad fértil, ni repetirlo varias veces en un mismo paciente. Además, el equipo es complejo, requiere de instalaciones adecuadas y precisa de técnicos cualificados.

El tránsito gastrointestinal de formulaciones farmacéuticas como sistemas de administración colónica (Tuleu y col., 2002 y Wilding y col., 2000), formas farmacéuticas flotantes (Whitehead y col., 1998), resinas de intercambio iónico (Jackson y col., 2000) o comprimidos matriciales (Billa y col., 2000), normalmente es evaluado mediante radioescintigrafía. Por medio de esta técnica se pueden monitorizar formas farmacéuticas

marcándolas con una cantidad mínima de material radioactivo, de esta manera, las propiedades físicas del producto final no son alteradas de manera significativa.

III.1.2. Pruebas ultrasónicas.

Ofrecen imágenes, a intervalos de 1 cm, de cortes axiales del estómago. La suma de estas áreas nos permite conocer el vaciamiento gástrico.

III.1.3. Prueba en suero.

Se basa en la absorción del paracetamol cuya absorción tiene lugar en el duodeno después del vaciamiento gástrico. Muestras seriadas de suero permiten determinar la concentración de paracetamol en función del tiempo.

III.1.4. Prueba de aliento con [¹³C] ácido octanoico.

Se realiza con el [¹³C] que es un isótopo estable del C, no es radioactivo y se encuentra de forma habitual en la atmósfera, aunque en menor proporción que el [¹²C], del que se diferencia sólo en su masa. La utilización de este isótopo estable cobró relevancia con el descubrimiento de *Helicobacter pylori* como agente patógeno causante de la gastritis, úlcera duodenal y ser factor de riesgo importante en algunos tipos de cáncer gástrico. Si bien el test del aliento con urea-[¹³C] para el diagnóstico de la infección por *H. pylori*, es posible marcar otros sustratos con [¹³C] para el diagnóstico de la función hepática, función pancreática, vaciamiento gástrico y monitorización de medicamentos.

El ácido octanoico es un ácido graso de cadena media, soluble en la yema de huevo, donde permanece estable y fuertemente retenido en ella. Una vez en el duodeno es absorbido, llegando a través de la porta al hígado, donde es oxidado liberando CO₂, entre otros productos, pasa rápidamente a la circulación general y es eliminado con el aire espirado (Ghoos y col., 1993).

Es un hecho comprobado que el paso limitante es el vaciamiento gástrico y no el proceso post-gástrico posterior.

Las muestras se recogen, después de haber tomado las basales, se suele realizar cada 15 minutos durante cuatro horas, partiendo de la comida de prueba que contiene yema de huevo, donde se ha disuelto el ácido octanoico marcado y un número determinado de calorías, y con una concentración estándar de hidratos de carbono, lípidos y proteínas. El análisis de las muestras se realiza por espectrometría de masas, y consiste en la separación del [$^{12}\text{CO}_2$] del [$^{13}\text{CO}_2$] (con masa 44 y 45, respectivamente), expresando el resultado en unidades delta (δ), que es el tanto por mil de la relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de la prueba respecto a unos valores de referencia. Esta relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ se obtiene al inicio de la prueba y después de la ingesta del ácido octanoico marcado, siendo el resultado final la diferencia entre ambos.

Esta prueba también tiene interés en la determinación del efecto que algunos medicamentos realizan sobre el vaciamiento gástrico (Gardner y col., 2002, Netzer y col., 2002, Geboes y col., 2002, Talley y col., 2000, Evenopoeel y col., 1998 y ^aMaes y col., 1994), el efecto de la infección por *H. pylori* en pacientes con dispepsia funcional (Perri y col., 1998) o el que tiene la insuficiencia pancreática, la hiperémesis gravídica (Maes y col., 1999) e incluso en pacientes gastrectomizados para valorar el efecto *dumping* (Maes y col., 1998).

Las pruebas respiratorias con isótopos estables de utilidad en gastroenterología, con excepción de la prueba para la detección de la infección por *Helicobacter pylori*, todavía no son de uso rutinario en la práctica clínica. Son pruebas que, debido a su inocuidad, fácil realización y ser de gran ayuda en el diagnóstico y manejo de enfermedades muy frecuentes están adquiriendo un mayor auge en la práctica clínica.

III.2. Bibliografía.

- Billa N., Yuen K.H., Khader M.A., Omar A., Gamma-sintigraphic study of the gastrointestinal transit and *in vivo* dissolution of a controlled release diclofenac sodium formulation in xanthan gum matrices, *Int. J. Pharm.* 201 (1): 109-120 (2000).

88 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

- Evenepoel P., Claus D., Geypens B., Maes B., Hiele M., Rutgeers P. e Ghooos Y. Evidence for impaired assimilation and increased colonic fermentation of protein, related to gastric acid suppression therapy. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 12: 1011-1019 (1998).
- Gardner J.D., Rodriguez-Stanley S., Robinson M. Y Miner P.B. Cisapride inhibits meal-stimulated gastric acid secretion and pos-prandial gastric acidity in subjects with gastro-oesophageal disease. *Aliment Pharmacol Ther* 16: 18019-1829 (2002).
- Geboes K.P., Maes B., Luypaerts A., Evenepoel P., Rutgeerts P., Ghooos Y. y Geypens B. Magnesium chloride slows gastric emptying, but does not affect digestive functions. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 16: 1571-1577 (2002).
- Ghooos Y. F., Maes B.D., Geypens B.J., Mys G., Hiele M.I., Rutgeerts P.J., Vantrappen G., Measurement of gastric emptying rate of solid by means of a carbon-labeled octanoic acid breath test, *Gastroenterology* 104 (6) 1640-1647 (1993).
- Jackson S.J., Bush D., Washington N., Perkins A.C., Effect of resin surface charge on gastric mucoadhesion and residence of cholestyramine, *Int. J. Pharm.* 205 (1-2): 173-181 (2000).
- Maes B.D., Hiele M.I., Geypens B.J., Rutgeerts P.J., Ghooos Y.F., Vantrappen G., Pharmacological modulation of gastric emptying rate of solid as measured by the carbon labelled octanoic acid breath test: Influence of erithromycin and propantheline, *Gut* 35 (3): 333-337 (1994).
- Maes B.D., Hiele M.I., Geypens B.J., Ghooos Y.F. y Rutgeerts P.J. Gastric emptying of the liquid, solid and oil phase of a meal in normal volunteers and patients with Billroth II gastrojejunostomy. *European Journal of Clinical Investigation*, 28 (3): 197 (1998).

- Maes B.D., Spitz B., Ghoois Y.F., Hiele M.I., Evenepoel P., Rutgeerts P.. Gastric emptying in hyperemesis gravidarum and non-dyspeptic pregnancy. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 13: 237-243 (1999).

- Netzer P., Schmitt B. y Inauen W. Effects of ABT-229, a motilin agonist, on acid reflux, oesophageal motility and gastric emptying in patients with gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 16: 1481-1490 (2002).

- Perri F., Clemente R., Festa V., Annese V., Quitadamo M., Rutgeerts P., Andriulli A., Patterns of symptoms in functional dyspepsia: Role of *Helicobacter pylori* infection and delayed gastric emptying, *Am. J. Gastroenterol.* 93 (11) 2082-2088 (1998).

- Talley N.J., Verlinden M., Snape W., Beker J.A., Ducrotte P., Dettmer A., et al. Failure of a motilin receptor agonist (ABT-229) to relieve the symptoms of functional dyspepsia in patients with and without delayed gastric emptying: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther* 14: 1653-1661 (2000).

- Tuleu C., Basit A.W., Waddington W.A., Ell P.J. y Newton J.M. Colonic delivery of 4-aminosalicylic acid using amylose-ethylcellulose-coated hydroxypropylmethylcellulose capsules. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 16: 1771-1779 (2002).

- Vázquez Carrasco M^aA. Pruebas de aliento con isótopos marcados. *Salud Rural* 19 (5): 1-12 (2002).

- Whitehead L., Fell J.T., Collett J.H., Sharma H.L., Smith A.M., Floating dosage forms: an *in vivo* study demonstrating prolonged gastric retention, *J. Control. Release* 55 (1) (1998) 3-12.

90 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

- Wilding I.R., Kenyon C.J. y Hooper G.. Gastrointestinal spread of oral prolonged-release mesalazine microgranules (Pentasa) dosed as either tablets or sachet. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 14: 163-169 (2000).

CAPÍTULO IV: MATERIALES Y MÉTODOS.

IV.1. Materiales.

Para facilitar su localización se ha agrupado el material en:

- Materias primas.
- Reactivos empleados.
- Soluciones utilizadas.
- Especialidades farmacéuticas.

IV.1.1. Materias primas.

- ⇒ Amoxicilina trihidrato BP/USP. Calidad farmacéutica (Antibiotics, Madrid).
- ⇒ [¹³C]ácido octanoico, Isomed Lab. (Madrid)
- ⇒ Chitosán (de bajo peso molecular) (Fluka Biochemika) (Pm. 150000).
- ⇒ Carbopol[®] 974P NF (BF Goodrich, Ohio, USA)
- ⇒ Celulosa microcristalina Avicel PH 102 FMC[®].
- ⇒ Polivinilpirrolidona K29-31 ISP.

IV.1.2. Reactivos empleados.

- ⇒ Ácido acético glacial. Calidad PRS- Codex (Panreac[®] Química S.A., Barcelona).
- ⇒ Ácido clorhídrico 37% . Calidad PA (Panreac[®] Química S.A., Barcelona).
- ⇒ Hidróxido sódico PRS (Panreac[®] Química S.A., Barcelona).

IV.1.3. Especialidades farmacéuticas.

- ⇒ Almax[®] Forte, Almirall Prodesfarma (Barcelona).

94 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

- ⇒ Amoxicilina sódica BP/USP fue obtenida de inyectables comercializados por Normon (Madrid).
- ⇒ Omeprazol Normon (Madrid)

IV.2. Instrumental.

- ⇒ Agitador magnético Labinco[®] LD-10.
- ⇒ Aparato de disolución Vankel[®] VK700, con monitor VK 750D.
- ⇒ Balanza de precisión Metler[®], modelo AJ 100.
- ⇒ Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) Jasco (Tokyo, Japón) modular que consta de : Bomba Jasco PU-1580, detector UV Jasco UV-1575, autoinyector Gilson 231 XL (Middleton, WI, U.S.A.) e integrador Borwin[®].
- ⇒ Espectrofotómetro Beckman[®] DU-7.
- ⇒ Espectrómetro de masas ABCA (Automated Breath ¹³Carbon Analyser, Europe Scientific Lowe, Inglaterra).
- ⇒ Espectroscopio infrarrojo con Transformada de Fourier (IR-TF) Perkin[®], modelo Paragon 1000.
- ⇒ Liofilizador Telstar[®], modelo L-3.
- ⇒ Microscopio electrónico de barrido, Jeol[®] JSM 6400.

IV.3. Métodos analíticos.

A continuación se describen las distintas técnicas analíticas empleadas en este trabajo. Para facilitar su localización se han clasificado en:

- Método empleado en la preparación de las distintas formulaciones de complejos poliiónicos o hidrogeles y el proceso de liofilización.
- Métodos empleados en la caracterización física de las materias primas y formulaciones: microscopía electrónica de barrido e espectroscopía infrarroja.

- Técnicas analíticas para la cuantificación de la amoxicilina y de sus productos de degradación: cromatografía de líquidos de alta resolución y espectrofotometría U.V.
- Técnicas analíticas para la cuantificación del ácido octanoico en los ensayos *in vitro*: cromatografía de líquidos de alta resolución.
- Métodos empleados en el estudio farmacotécnico de hidrogeles: estudios de hinchamiento y estudio de velocidad de disolución de los complejos poliónicos.
- Métodos empleados en los ensayos *in vivo* de estudio de vaciamiento gástrico.
- Métodos estadísticos: métodos estadísticos utilizados en la comparación de los distintos resultados de los experimentos *in vivo*.

IV.2.1. Método empleado en la preparación de las distintas formulaciones de complejos poliónicos o hidrogeles.

IV.2.1.1. Preparación de los distintos hidrogeles o complejos poliónicos no covalentes.

Los polímeros que se utilizaron para la realización de los hidrogeles no covalentes liofilizados fueron: chitosan (CS) y Carbopol® 974P NF (PAA). Se añadió una cantidad constante de 250 mg de amoxicilina trihidrato o sódica por unidad de dosificación, a excepción de las formulaciones empleadas para los estudios de IR y las que se utilizan en los ensayos *in vivo*, donde no se adicionó principio activo.

Se ha estudiado el efecto de las distintas relaciones de ácido poliacrílico, chitosán y amoxicilina trihidrato (A) o sódica (A-NA), la fuerza iónica y el volumen de los medios formadores de los hidrogeles.

- Preparación de los distintos hidrogeles o complejos poliónicos no covalentes con el fin de estudiar la influencia de la solubilidad del principio activo y de la proporción de chitosán y ácido poliacrílico en las propiedades de cesión e hinchamiento de los mismos.

96 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

El método de preparación de estos hidrogeles fue el siguiente: se gelifica el ácido poliacrílico en 25,0 ml de ácido acético 1,75 M, a continuación se añadieron 250 mg de amoxicilina trihidrato o sódica en el mismo medio. Se adicionó el chitosán disolviéndolo poco a poco mediante una agitación continua. El hidrogel fue neutralizado con hidróxido sódico 3,0 M hasta alcanzar un intervalo de pH entre 4.5 y 5.5 y el volumen fue ajustado hasta 40 ml en todas las formulaciones. Los complejos interpoliméricos fueron colocados en placas petri de 100,0 ml con un diámetro de 100,0 mm. Finalmente, los hidrogeles fueron liofilizados con un liofilizador Liolabar 7 (Telstat Inc Madrid). Los diferentes hidrogeles después de ser sometidos a una liofilización presentaron volúmenes similares. Las muestras liofilizadas fueron cortadas para conseguir un tamaño de 2 x 2 mm². En la **tabla 6** se representan distintas relaciones de PAA:CS:A y PAA:CS:A-NA.

- Estudio de la influencia de la fuerza iónica del medio formador del hidrogel.

En la segunda parte de este estudio, se seleccionaron tres diferentes relaciones poliméricas PAA:CS:A (1:2.5:2), PAA:CS:A (1:5:2) y PAA:CS:A (2.5:5:2) para obtener hidrogeles a partir de distintos medios con las siguientes concentraciones de ácido acético: 1,75, 3,50 y 5,25 M. A continuación fueron neutralizados con Na OH 3,0 M, y ajustados a un volumen de 40 ml, como en las formulaciones anteriores. Por último fueron liofilizados y cortados para conseguir un tamaño de 2 x 2 mm².

- Estudio de la influencia del volumen del medio formador del hidrogel.

En la última parte de este trabajo, se seleccionó una relación polimérica realizada en medios con distinta fuerza iónica: (1:5:2)-1,75M y (1:5:2)-5,25M. A continuación se obtuvieron hidrogeles a partir de soluciones de ácido acético e hidróxido sódico que mantenían la misma cantidad de reactivo pero en un volumen menor (26,66 ml) o mayor (53,22 ml).

Tabla 6. Relaciones chitosán: PAA: amoxicilina, expresadas en g:g. Las formulaciones representadas en verde son los hidrogeles que solo contienen CS y amoxicilina trihidrato; las negras son complejos poliiónicos de CS y PAA con amoxicilina trihidrato; las azules son los complejos poliiónicos con amoxicilina sódica; las rojas son los hidrogeles sin principio activo utilizados en los ensayos *in vivo* y en los estudios por espectroscopia IR; las moradas son los complejos poliiónicos realizados con medios de diferente fuerza iónica, y por último las naranjas son las que son obtenidas a partir de medios con distintos volúmenes.

Formulaciones	PAA	CS	AMOXICILINA
PAA:CS:A (0:2,5:2)-1,75M	0	2,5	2,0
PAA:CS:A (0:5:2)-1,75M	0	5,0	2,0
PAA:CS:A (0:7,5:2)-1,75M	0	7,5	2,0
PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75M	1,0	2,5	2,0
PAA:CS:A (2,5:2,5:2)-1,75M	2,5	2,5	2,0
PAA:CS:A (5:2,5:2)-1,75M	5,0	2,5	2,0
PAA:CS:A (1:5:2)-1,75M	1,0	5,0	2,0
PAA:CS:A (2,5:5:2)-1,75M	2,5	5,0	2,0
PAA:CS:A (5:5:2)-1,75M	5,0	5,0	2,0
PAA:CS:A (1:7,5:2)-1,75M	1,0	7,5	2,0
PAA:CS:A-NA (1:2,5:2)-1,75M	1,0	2,5	2,0
PAA:CS:A-NA (1:5:2)-1,75M	1,0	5,0	2,0
PAA:CS:A-NA (1:7,5:0)-1,75M	1,0	7,5	2,0
PAA:CS:A (1:2,5:0)-1,75M	1,0	2,5	0
PAA:CS:A (2,5:5:0)-1,75M	2,5	5,0	0
PAA:CS:A (1:2,5:2)-3,50M	1,0	2,5	2,0
PAA:CS:A (1:2,5:2)-5,25M	1,0	2,5	2,0
PAA:CS:A (1:5:2)-3,50M	1,0	5,0	2,0
PAA:CS:A (1:5:2)-5,25M	1,0	5,0	2,0
PAA:CS:A (2,5:5:2)-3,50M	2,5	5,0	2,0
PAA:CS:A (2,5:5:2)-5,25M	2,5	5,0	2,0
PAA:CS:A (1:5:2)-1,75M-26,66ml	1,0	5,0	2,0
PAA:CS:A (1:5:2)-5,25M-53,22ml	1,0	5,0	2,0
PAA:CS:A (1:5:2)-1,75M-26,66ml	1,0	5,0	2,0
PAA:CS:A (1:5:2)-5,25M-53,22ml	1,0	5,0	2,0

IV.2.1.2. Proceso de liofilización.

Durante el proceso de liofilización podemos distinguir las siguientes etapas: congelación, desecación primaria y desecación secundaria. Distintos estudios previos, han llevado a seleccionar una etapa de congelación instantánea que se obtiene mediante la congelación brusca con nitrógeno líquido, seguida de un periodo de congelación de 10 horas a una temperatura de $-40\pm 0,1^{\circ}\text{C}$. A continuación se aplica un vacío con una presión que llega a 0,05 mBares. El cambio térmico en esta etapa va de -40 a $0\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ y dura aproximadamente 37 horas. Produciéndose posteriormente un incremento de temperatura entre 0 y $30\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ cuya duración es de unas 6 horas. Este proceso se caracteriza por sus bajas presiones que fluctuaron desde 1 mBares al comienzo de la etapa de desecación primaria, hasta 0,2 mBares al final del proceso.

IV.2.2. Métodos empleados en la caracterización física de las materias primas y formulaciones.

IV.2.2.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM).

Esta técnica permite evaluar la apariencia, morfología y tamaño de las estructuras originadas como consecuencia del proceso de liofilización.

El estudio de la morfología de las distintas muestras se realizó mediante un microscopio electrónico de barrido modelo Jeol® JSM 6400. Las muestras se fijan al portamuestras, sometiéndose a continuación, a un proceso de recubrimiento con una capa de oro de aproximadamente 15 nm que permitirá su observación por SEM.

IV.2.2.2. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (IRTF).

La estructura de los distintos enlaces a escala molecular puede ser estudiada mediante la técnica de espectroscopía infrarroja. El aparato empleado en esta técnica es un Perkin-4000. La transformada de Fourier permite cuantificar en diferentes regiones del espectro infrarrojo un determinado tipo de enlaces.

Se realiza una dilución adecuada con bromuro potásico, procediendo a su homogeneización en un mortero. Mediante un proceso de presión obtenemos una "pastilla" que será sometida a un barrido en el infrarrojo entre unas longitudes de onda de 400 a 4000 cm^{-1} .

IV.2.3. Técnicas analíticas para la cuantificación de la amoxicilina y de sus productos de degradación.

IV.2.3.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Esta técnica permite analizar cuantitativamente las diferentes muestras. El método utilizado es el descrito por la USP 24 (USP 24, 2000).

Se emplea un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) Jasco (Tokyo, Japón) modular que consta de: Bomba Jasco PU-1580, detector UV Jasco UV-1575 a 230 nm y un autoinyector Gilson 231 XL (Middleton, WI, U.S.A.).

Como fase estacionaria se emplea una columna de fase reversa Hypersyl ODS 5 μm (Symta, Madrid, Spain) 150 x 4.6 mm.

Las condiciones de la fase móvil son las siguientes:

- Flujo de 0,4 ml/min.
- Composición: diluyente: acetonitrilo (96:4)
- El diluyente se realiza pesando 13,6 g de fosfato potásico monovalente (KH_2PO_4) en 2 litros de agua destilada, y a continuación se ajusta con una solución de 45% (peso/peso) de hidróxido potásico hasta alcanzar un pH de $5,0 \pm 0,1$.
- Volumen de inyección de 100 μl .
- Rango de concentración seleccionado: 0-20 $\mu\text{g/ml}$.
- Temperatura del ensayo: ambiente, 20°C.

En el análisis cuantitativo, las muestras se toman del medio de disolución y se inyectarán directamente en el cromatógrafo después de filtrarlas con un filtro de 0,45 μm

100 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

(Millipore). A continuación será preciso comparar los tiempos de retención obtenidos, con los correspondientes de las muestras patrones, de modo que ambos deben coincidir.

Este análisis será empleado en los estudios de estabilidad de las distintas formulaciones ya que en el método de espectroscopía ultravioleta existen interferencias con los productos de degradación.

También se ha utilizado la técnica de HPLC para realizar un estudio de riqueza de los hidrogeles antes de someterlos bajo condiciones de degradación.

IV.2.3.2. Espectrofotometría UV.

Para poder cuantificar las concentraciones del principio activo, amoxicilina trihidrato o amoxicilina sódica, en los ensayos de velocidad de disolución, se ha puesto a punto un método rápido y sencillo como es la técnica de espectrofotometría ultravioleta (UV).

La longitud de onda seleccionada para la realización del ensayo espectrofotométrico en medio simulado gástrico fue de 228,5 nm y de 228 nm para la amoxicilina trihidrato y la amoxicilina sódica, respectivamente, debido a que en ambas la amoxicilina en su forma no soluble y en su forma ionizada presenta el máximo de absorción, y en ellas no se muestran interferencias con otros componentes de la formulación empleados en este trabajo. Y en pH 4,0 la longitud de onda seleccionada fue de 227,5 nm para la amoxicilina trihidrato.

IV.2.4. Técnicas analíticas para la cuantificación del ácido octanoico en los ensayos in vitro de velocidad de disolución.

Esta técnica permite analizar cuantitativamente las diferentes muestras.

Se emplea un cromatógrafo Jasco (Tokyo, Japan) con detector UV a 209 nm.

Como fase estacionaria se emplea una columna de fase reversa Hypersyl ODS 5 μm (Symta, Madrid, Spain) 150 x 4.6 mm.

Las condiciones de la fase móvil son las siguientes:

- Flujo de 1 ml/min.
- Composición: acetonitrilo- 10^{-3} M solución de fofato potásico monobásico, ajustada con una solución al 5% (v/v) de ácido ortofosfórico a pH 4.4 ± 0.5 (50:50 v/v)
- Volumen de inyección de 100 μ l.
- Rango de concentración seleccionado: 0 a 227,5 g/ml.
- Temperatura: ambiente, 20°C.

En el análisis cuantitativo, las muestras se toman del medio de disolución y se inyectarán directamente en el cromatógrafo previamente filtradas por un filtro de 0,45 μ m (Millipore). A continuación será preciso comparar los tiempos de retención obtenidos, con los correspondientes de las muestras patrones, de modo que ambos deben coincidir.

IV.2.5. Métodos empleados en el estudio farmacotécnico de hidrogeles.

IV.2.5.1. Ensayos de hinchamiento.

Los hidrogeles liofilizados se someten a un ensayo de hinchamiento en 450 ml de HCl 0,1N (pH 1,2) o de medio a pH 4,0, la temperatura a la cual se realiza el ensayo es de $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$. En estos estudios se utiliza el aparato 1 (Vankel[®]) descrito en la Real Farmacopea Española (2002). Se pesan los cestillos secos antes de comenzar el ensayo. La velocidad de giro de los cestillos es de 100 rpm. Cada quince minutos se toman las muestras del medio de disolución y se colocan encima de papel de filtro para eliminar el exceso de humedad superficial y se pesan. El grado de hinchamiento (S_w) se calcula con la siguiente formula:

$$S_w = W_s/W_d$$

Donde W_s es el peso del hidrogel hinchado y W_d es el peso del hidrogel seco. Todos los resultados representan la media \pm desviación estandar de tres muestras por cada formulación. El ensayo se lleva a cabo durante 5 horas.

102 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

IV.2.5.2. Ensayos de velocidad de disolución.

En estos estudios se utiliza el aparato 1 (Vankel[®]) descrito en la Real Farmacopea Española (2002) con una velocidad de rotación de los cestillos de 100 rpm. Se utiliza como medio de disolución 450 ml de HCl 0,1N (pH 1,2) o de medio a pH 4,0. El sistema se termostatiza a 37±0,1°C. A intervalos de tiempo determinados, se toman muestras de 5 ml. Estas muestras se filtran a través de filtros de 0.45 µm Millipore y se analizan los porcentajes de amoxicilina cedida usando un espectrofotómetro UV-VIS Beckman DU[®]-7. Los datos de cantidad acumulada cedida de amoxicilina trihidrato o sódica, representan la media de tres medidas de experimentos independientes.

Para investigar con mayor precisión el efecto que tiene el tipo de estructura del complejo poliiónico en la cesión de la amoxicilina, los resultado fueron analizados según la siguiente ecuación (Ahn y col.,2002):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n$$

M_t y M_∞ son las cantidades de fármaco cedidas a tiempo t y en el equilibrio, respectivamente; K es la constante de proporcionalidad y n es el exponente de difusión.

IV.2.6. Métodos empleados en los ensayos in vivo de estudio de vaciamiento gástrico.

Se realizaron dos tipos de experimentos *in vivo* con la prueba del aliento de [¹³C]ácido octanoico. En el primero se compararon los parámetros de vaciamiento gástrico de dos formulaciones de hidrogeles (PAA:CS:A (1:2,5:0)-1,75M y PAA:CS:A (2,5:5:0)-1,75M) con respecto a una formulación de referencia (compuestas por un 97% de celulosa microcristalina y un 3% de polivinilpirrolidona. En el segundo experimento *in vivo* se estudió el efecto que ejercen dos tipos de fármacos que incrementan el pH intragástrico (omeprazol y almagato) sobre el vaciamiento gástrico de un hidrogel seleccionado (PAA:CS:A (2,5:5:0)-1,75M). Ambos estudios fueron realizados en 12 voluntarios sanos (8 mujeres y 4 hombres); edad media, 32 años (rango de 26-42 años). Ninguno había padecido ningún tipo de

enfermedad gastrointestinal ni cirugía, o estaba tomando alguna medicación. Cada voluntario fue estudiado en 4 ocasiones diferentes con un periodo de descanso de 10 días entre cada experimento para evitar posibles interacciones.

En todos los experimentos cada formulación fue dosificada en dos cápsulas de gelatina del número cero, y se tomaron junto con una comida estándar. Las muestras se recogieron, después de haber tomado las basales, a tiempos predeterminados durante seis horas. El análisis de las muestras se realiza por espectrometría de masas, usando un espectrómetro ABCA (Automated Breath ¹³Carbon Analyser, Europe Scientific). Se asumió que la producción de CO₂ fue de 300 mmol/m² de la superficie del cuerpo por hora. Las curvas con el [¹³CO₂] recuperado en el aliento están expresadas como el porcentaje de recuperación de [¹³C]/h. Los parámetros de vaciamiento gástrico, semivida de vaciamiento gástrico y fase lag, fueron calculados ajustando las curvas de recuperación de [¹³C]/h por medio de dos modelos matemáticos. Por lo tanto estos parámetros sólo dependen de las curvas y no del CO₂ endógeno producido. El parámetro que se empleó fue el que obtuvo los mejores datos de ajuste, con menores errores en uno u otro modelo matemático (Ghoos y col., 1993 y Maes y col., 1999).

El protocolo que se siguió en todos los ensayos *in vivo* fue el siguiente:

- Comida estándar: un huevo, dos rebanadas de pan, 5 g de mantequilla y 150 ml de agua.
- Formulaciones, tanto los complejos poliónicos PAA:CS:A (1:2,5:0)-1,75M y PAA:CS:A (2,5:5:0)-1,75M como la formulación de referencia fueron marcadas con 91 mg (=100 l) de ¹³C-ácido octanoico.
- Condiciones de la prueba: realizada después de una noche en ayuno, comida y formulación consumidas en 10 minutos.
- Modelos matemáticos para ajustar los datos:

Fórmula 1:

$$y = at^b e^{-ct}$$

Fórmula 2:

$$y = mkb e^{-kt} (1 - e^{-kt})^{b-1}$$

IV.2.7. Métodos estadísticos.

En la mayoría de las determinaciones se representa su *valor medio* (de tres valores). La variabilidad asociada a estos valores medios experimentales se ha representado mediante la *desviación estandar "n-1"*.

En los estudios *in vivo* debido a la distribución sesgada de los resultados, éstos están expresados como mediana e intercuartiles superior e inferior. Los parámetros gástricos: $t_{1/2 b}$ y $t_{lag b}$, fueron comparados usando un test no paramétrico Mann-Whitney (Wilcoxon). En todos los casos se ha empleado un nivel de confianza del 95% para calcular el intervalo en que se encuentra el valor real de la población.

IV.3. Bibliografía.

- Ahn J.S.; Choi H.K.; Cho C.S. Chun M; Ryu J.; Jung J.; Kim Y. And Cho CS. Release of triamcinolone acetonide from mucoadhesive polymer composed of chitosan and poly(acrylic acid) *in vitro*. *Biomaterials* 23:1411-1416 (2002).
- Ghoo Y. F., Maes B.D., Geypens B.J., Mys G., Hiele M.I., Rutgeerts P.J., Vantrappen G., Measurement of gastric emptying rate of solid by means of a carbon-labeled octanoic acid breath test, *Gastroenterology* 104 (6) 1640-1647 (1993).
- Maes B.D., Spitz B., Ghoo Y.F., Hiele M.I., Evenepoel P., Rutgeerts P.. Gastric emptying in hyperemesis gravidarum and non-dyspeptic pregnancy. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 13: 237-243 (1999).
- Real Farmacopea Española, segunda edición. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, 2002.

- United States Pharmacopoeia, 24 edition, United States Pharmacopoeia Convention, Rockville, 2000.

CAPÍTULO V: VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.

Según las “Normas de Buena Fabricación y Control de Calidad de Productos Farmacéuticos”, la validación se debe aplicar no sólo a los procesos de fabricación, sino también a los métodos de análisis y control.

En las Normas de Correcta Fabricación y Control de Calidad de los Medicamentos (NCF, 2002), se define la validación como “La obtención de pruebas, convenientemente documentadas, demostrativas de que un método de fabricación o control es lo suficientemente fiable como para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos”, o lo que es lo mismo “Es la obtención de pruebas de que cualquier procedimiento, proceso, equipo, material, actividad o sistema, produce en realidad el resultado previsto”.

Gracias a la validación se consigue un alto grado de confianza y seguridad en el método analítico y en la calidad de los resultados, así como permite un conocimiento profundo de sus características de funcionamiento. Tras validar el método analítico, se obtiene una disminución del número de fallos y repeticiones con el consiguiente ahorro de los costes asociados.

En este capítulo se realizará la validación de los siguientes métodos analíticos:

- Análisis de ácido octanoico por HPLC.
- Análisis de amoxicilina por HPLC
- Análisis de amoxicilina por espectrofotometría directa.

V.1. Análisis de Ácido Octanoico por HPLC.

Este método analítico será empleado para la cuantificación del ácido octanoico, en los ensayos de velocidad de disolución medio simulado gástrico de aquellas formulaciones seleccionadas para los estudios *in vivo*.

V.1.1. Selectividad.

La *selectividad* es la capacidad de detectar al analito sin interferencias de otros compuestos (tanto de excipientes como de impurezas etc...). Se estudia la *selectividad* con los distintos componentes del hidrogel: quitosán y ácido poliacrílico inyectando alícuotas de muestras placebo, donde se observa la ausencia de interferencias para el tiempo de retención de 5,4 minutos que corresponde al ácido octanoico (ver **figuras 9 y 10**).

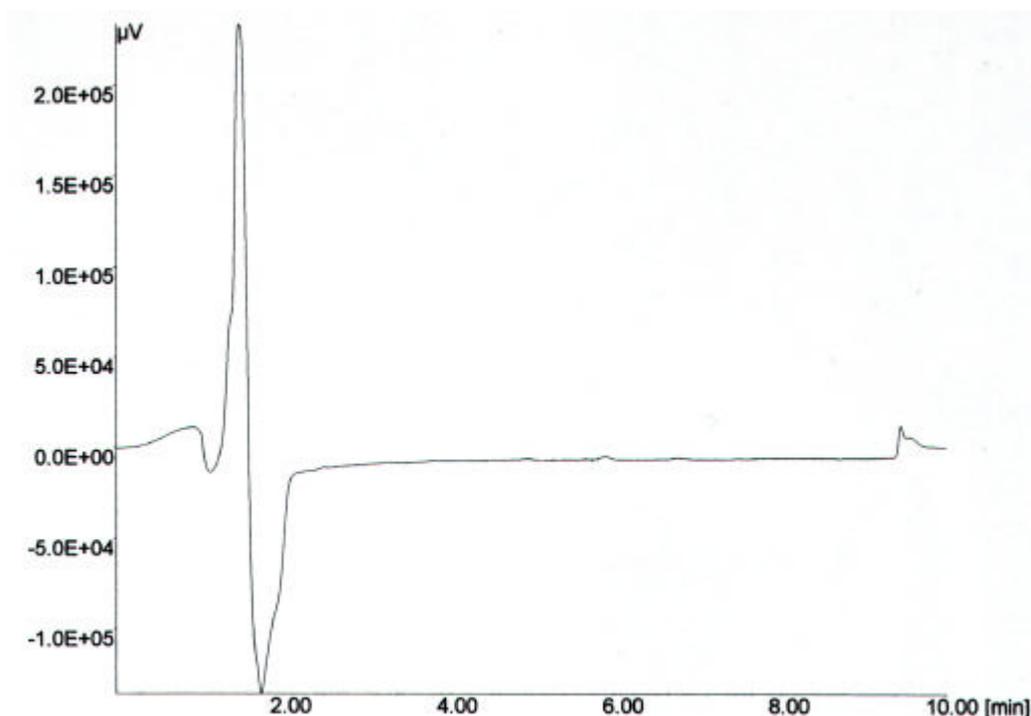


Figura 9. Cromatograma de muestra de hidrogel blanco (PAA:CS:A 1:2,5:0-1,75M).

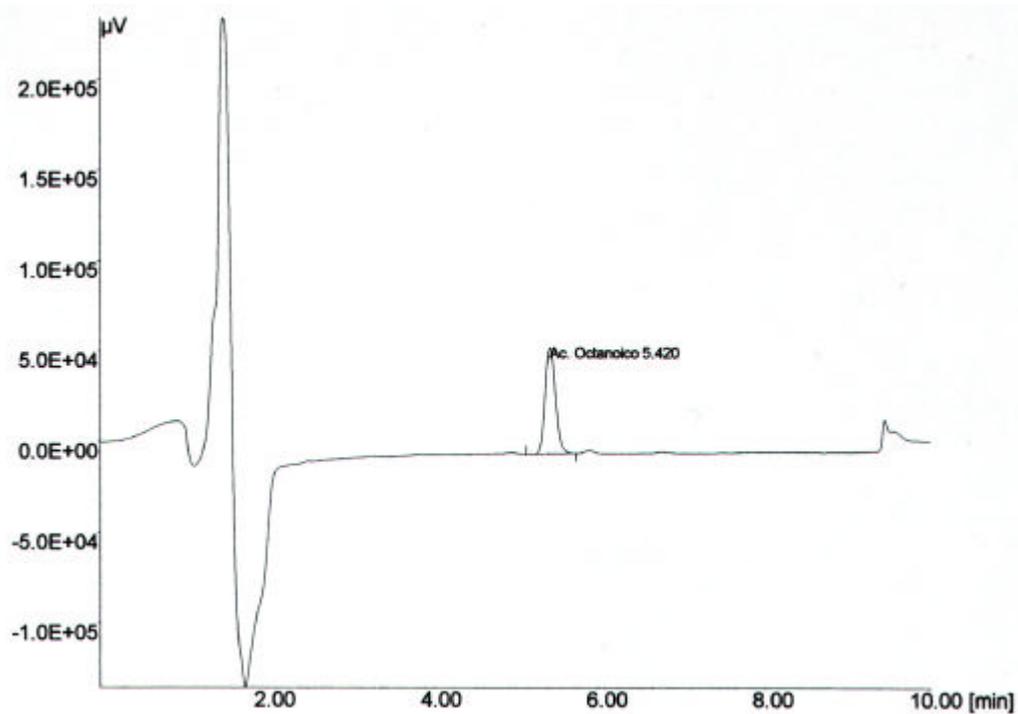


Figura 10. Cromatograma de muestra de hidrogel blanco (PAA:CS:A 1;2,5:2-1,75M) al que se le incorpora 227,5 g/ml de ácido octanoico.

V.1.2. Linealidad.

Se estudia la capacidad de este método para obtener resultados proporcionales a las concentraciones del analito dentro de un intervalo determinado. Su determinación se realiza para seis concentraciones distintas a partir de una solución madre. Sus resultados se muestran en la **figura 11** obteniéndose la siguiente recta de regresión:

$$\text{Área} = A + B \times C$$

$$\text{Área} = 11016,20 + 1976,73 \times C$$

$$r = 0,9994 \quad r^2 = 0,99889$$

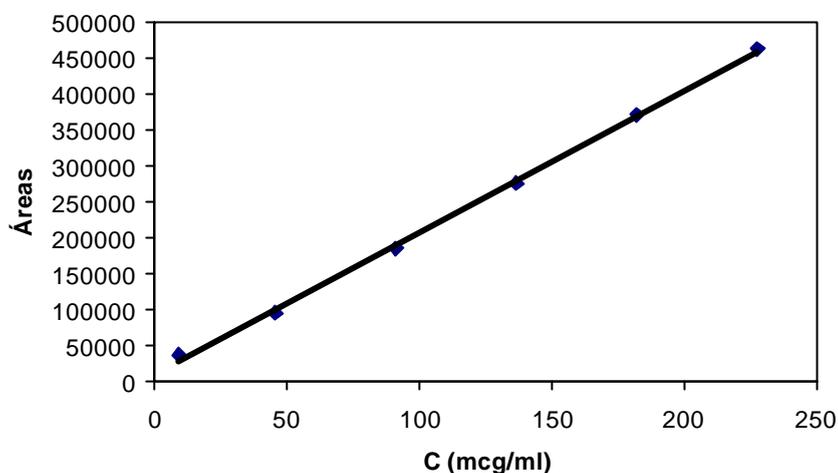


Figura 11. Recta de calibrado de ácido octanoico en HCl 0,1 N.

Los buenos resultados del coeficiente de correlación (r) y del coeficiente de determinación (r^2) han permitido considerar que este método es lineal para la cuantificación del ácido octanoico en el rango de concentración de 0 a 227,5 g/ml.

V.1.3. Precisión.

La precisión expresa el grado de acercamiento (grado de dispersión) entre resultados individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples muestras. La precisión da idea de los errores aleatorios.

La precisión se va a calcular a partir de los estudios de *repetibilidad* y *reproducibilidad*.

V.1.3.1. Repetibilidad.

La *repetibilidad* expresa la precisión del método de análisis cuando es realizado por el mismo analista bajo condiciones iguales en lo relativo a: reactivos, equipos y cortos intervalos de tiempo. Por tanto, mide las variaciones dentro de un mismo laboratorio. Se determina, analizando un número significativo de muestras de un lote homogéneo.

La *repetibilidad* del método se determina a través del coeficiente de variación (C.V.) Se preparan tres soluciones madres, analizándose una concentración de 182 g/ml que contiene un 100% de analito, 136,5 g/ml para la muestra que contiene un 75% y 227,5 g/ml para la muestra que representa un 125%. Los valores obtenidos en áreas y sus C.V. se representan en la **tabla 7**.

Tabla 7. Precisión del método mediante estudios de *repetibilidad* intra-días, para muestras que a las que se les adiciona un 75% (136,5 g/ml), un 100% (182 g/ml) y un 125% (227,5 g/ml) de ácido octanoico.

MUESTRAS	Áreas equivalentes a los porcentajes:		
	75%	100%	125%
1	283402,4	389223	493716,6
	292956,2	394167,2	496441,3
	298550,9	393977,6	501894,3
2	283367,8	375739,9	476019,1
	284208,1	380136,4	469927
	282670,2	377401,9	477581,8
3	304720,8	382093,3	485500,4
	307019,1	387573,8	489226
	280854,1	384314,2	500307,5
$\bar{x} \pm SD$	290861,1 \pm 10246,76	384958,6 \pm 6755,86	487846 \pm 11372,73
C.V.	3,52 %	1,75 %	2,33 %

Los valores de C.V. son, en este caso, como máximo del 3,52 %, lo que permite considerar que este método presenta una buena *repetibilidad* en el análisis del ácido octanoico.

V.1.3.2. Reproducibilidad.

La *reproducibilidad* expresa la precisión del método de análisis cuando es realizado por diferentes analistas y bajo condiciones ligeramente diferentes, entre las que cabe destacar: distintos laboratorios, reactivos de distintas marcas, equipos diferentes, etc. Por tanto mide las variaciones interlaboratorios, por distintos analistas y diferentes equipos, aplicando el

114 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

mismo procedimiento analítico. Es la medida de la precisión de un método analítico efectuada sobre la misma muestra, pero en condiciones diferentes.

Este ensayo se realizó midiendo tres muestras diferentes, que se corresponden con los porcentajes del 75, 100 y 125, durante 3 días diferentes, sus resultados se muestran en la **tabla 8**.

Tabla 8. Precisión del método mediante estudios de *reproducibilidad* inter-días para muestras a las que se les adiciona un 75% (136,5 g/ml), un 100% (182 g/ml) y un 125% (227,5 g/ml) de ácido octanoico.

DÍAS	Áreas equivalentes a los porcentajes:		
	75%	100%	125%
1	276964,5	372310,9	464355,8
	289407,8	386808,7	484558
	289317,2	383672,7	499594,9
2	283367,8	375739,9	476019,1
	284208,1	380136,4	469927
	282670,2	377401,9	477581,8
3	277183,2	381399,1	480534,6
	291031,6	381212,2	487292,1
	278143,6	381126,3	485898,9
$\bar{x} \pm SD$	283588,2 ± 5453,331	379978,7 ± 4309,568	480640,2 ± 10351,38
C.V.	1,92 %	1,13 %	2,15 %

Los valores de C.V. son, en este caso, como máximo del 2,15% lo que permite considerar que este método presenta una buena *reproducibilidad* inter-días en el análisis del ácido octanoico.

Al presentar en los casos de *repetibilidad* y *reproducibilidad* un C.V. menor del 5% se puede considerar este método como preciso.

V.1.4. Recuperación.

Muestra la capacidad del método analítico para dar los resultados más próximos al valor real. Este parámetro indica si existe interacción entre el principio activo y las soluciones empleadas en la lectura.

La *recuperación* se calculará mediante el coeficiente de variación (C.V.), para unas muestras placebo a las que se ha adicionado tres concentraciones diferentes de ácido octanoico. La muestra placebo para este estudio consistía en una mezcla de ácido poliacrílico y chitosán en la proporción 1:2,5 (p/p). Sus resultados se muestran en la **tabla 9**.

Tabla 9. Resultados del estudio de *recuperación* de ácido octanoico en presencia de una muestra placebo de ácido poliacrílico y chitosán en la proporción 1:2,5 (p/p) para muestras a las que se les adiciona un 75% (136,5 g/ml), un 100% (182 g/ml) y un 125% (227,5 g/ml) de ácido octanoico.

% de Ácido Octanoico adicionado a la muestra	% de Ácido Octanoico recuperado	% recuperado
Muestra + 75% Ác.O.	67,41	89,88
	71,07	94,76
	71,59	95,45
Muestra + 100% Ác.O.	94,76	89,88
	84,85	94,76
	95,46	95,46
Muestra + 125% Ác.O.	119,84	94,74
	126,35	99,88
	127,27	100,62
Nº de muestras		9
$\bar{x} \pm SD$		95,05 \pm 3,68
C.V.		3,87 %

La *recuperación* de esta técnica presenta valores de C.V. del 3,87 %. No hay retenciones ni pérdidas del analito.

V.2. Análisis de Amoxicilina Trihidrato por HPLC.

Este procedimiento analítico será empleado para la cuantificación de la amoxicilina en los análisis de estabilidad de los distintos hidrogeles empleados en este trabajo.

La lectura de las muestras por esta técnica de HPLC debe realizarse antes de 1 h después de su preparación. Las muestras en medio HCl 0,1N presentan una degradación importante. La cinética de degradación continua incluso en muestras congeladas observándose una pérdida importante de estabilidad de amoxicilina después de una semana de almacenamiento a -20°C .

Es un método de farmacopea, que se encuentra recogido en la USP 24, 2000. Al tratarse de un método de farmacopea no será preciso su validación realizándose únicamente pruebas de *selectividad* y precisión.

V.2.1. *Selectividad*.

La *selectividad* se ha determinado mediante la comparación de los cromatogramas de las soluciones de una formulación blanco sin principio activo (**figura 12**) y de una formulación con una cantidad conocida de amoxicilina (**figura 13**). Las mezclas de solventes, excipientes seleccionados no dan lectura en las condiciones de análisis utilizadas en este trabajo, permitiendo confirmar que las materias primas empleadas en las distintas formulaciones no interfieren en la cuantificación de la amoxicilina.

Durante los estudios de estabilidad se puede producir una degradación del principio activo, lo que obliga a estudiar también la posible interferencia de estos productos de degradación en el análisis de la amoxicilina. La identificación de los posibles picos que aparezcan en la muestra se realizará frente a soluciones madres de amoxicilina parcialmente degradada (ver **figuras 14 y 15**).

118 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

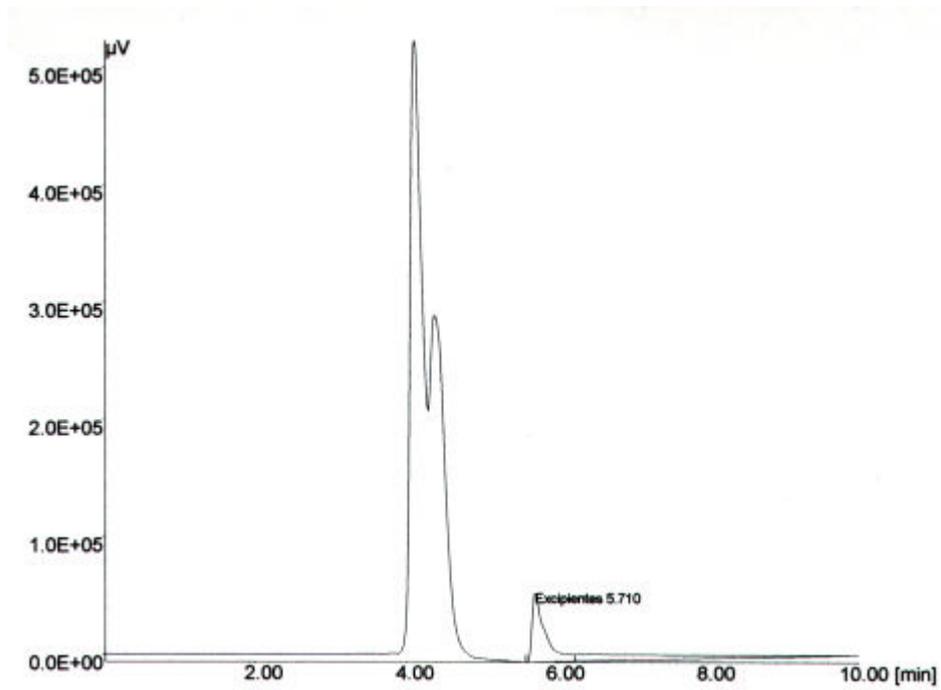


Figura 12. Cromatograma de muestra de hidrogel blanco (PAA:CS:A 1:2,5:0-1,75M).

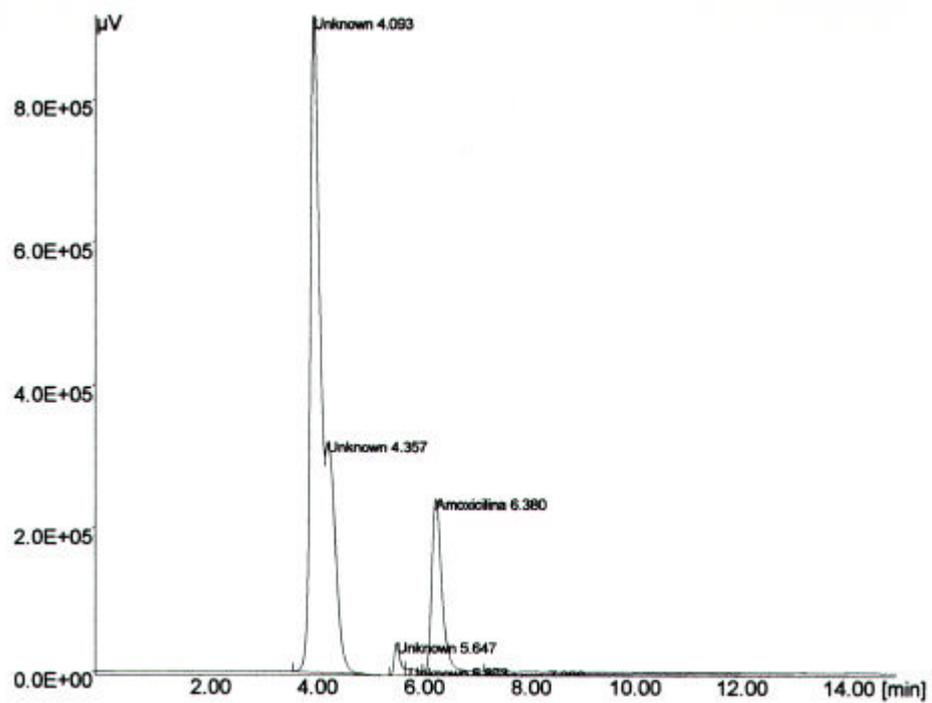


Figura 13. Cromatograma de muestra de amoxicilina (12,5 g/ml).

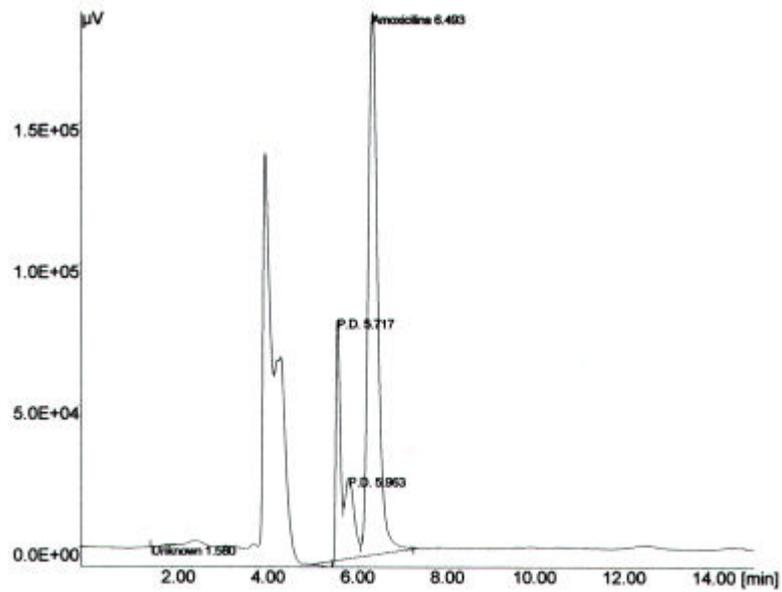


Figura 14. Cromatograma de muestra de 12,5 g/ml de amoxicilina parcialmente degradada a las 5h en un medio HCl 0,1N a 37°C.

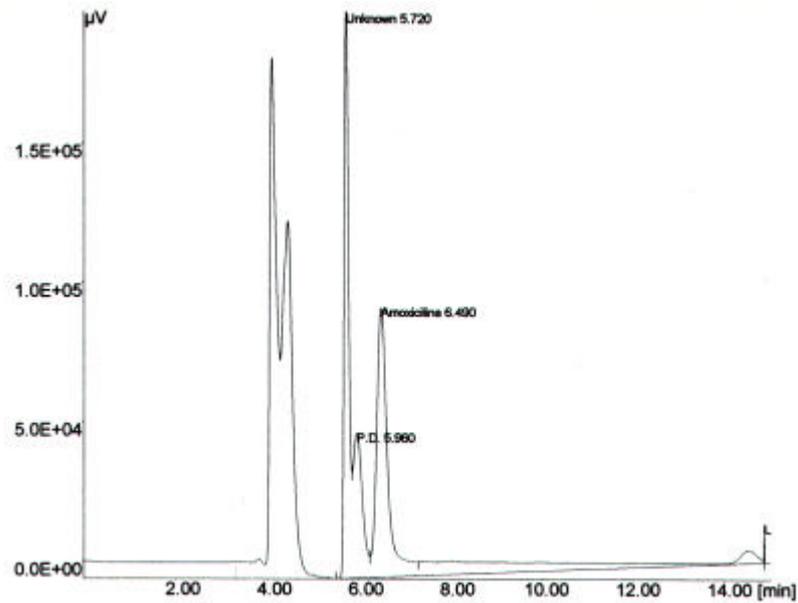


Figura 15. Cromatograma de muestra de 12,5 g/ml de amoxicilina parcialmente degradada a las 24h en un medio HCl 0,1N a 37°C.

V.2.2. Precisión.

La precisión se va a calcular a partir de los estudios de *repetibilidad* y *reproducibilidad*.

V.2.2.1. Repetibilidad.

La *repetibilidad* del método se determina a través del coeficiente de variación (C.V.) Se preparan tres soluciones madres, analizándose una concentración de 10 g/ml que contiene un 100% de analito, 7,5 g/ml para la muestra que contiene un 75% y 12,5 g/ml para la muestra que representa un 125%. Los valores obtenidos en áreas y sus C.V. se representan en la **tabla 10**.

Tabla 10. Precisión del método mediante estudios de *repetibilidad* intra-días para muestras que contienen un 75% (7,5 g/ml), un 100% (10,0 g/ml) y un 125% (12,5 g/ml) de amoxicilina.

MUESTRAS	Áreas equivalentes a los porcentajes:		
	75%	100%	125%
1	1228170	1665845	1961203
	1221670	1639628	1952750
	1197873	1628292	1936098
2	1228122	1666345	1972016
	1216500	1646117	1956493
	1203597	1632501	1943961
3	1241619	1669280	1975347
	1211341	1650867	1970436
	1189802	1641905	1946978
$\bar{x} \pm SD$	1215410,4±16473,91	1648975,5 ± 15194,1	1957253,5 ± 13626,1
C.V.	1,35	0,92	0,70

Los valores de C.V. son, en este caso, como máximo del 1,35 %, lo que permite considerar que este método presenta una muy buena *repetibilidad* en el análisis de la amoxicilina.

V.2.2.2. Reproducibilidad.

Este ensayo se realizó midiendo tres muestras diferentes, que se corresponden con los porcentajes del 75, 100 y 125, durante 3 días diferentes, sus resultados se muestran en la **tabla 11**.

Tabla 11. Precisión del método mediante estudios de *reproducibilidad* inter-días para muestras que contienen un 75% (7,5 g/ml), un 100% (10,0 g/ml) y un 125% (12,5 g/ml) de amoxicilina.

DÍAS	Áreas equivalentes a los porcentajes:		
	75%	100%	125%
1	1160741	1631852	1939309
	1155487	1626112	1934732
	1169696	1594682	1929822
2	1228170	1665845	1961203
	1221670	1639628	1952750
	1197873	1628292	1936098
3	1209732	1688084	2098233
	1195807	1680186	2078068
	1185779	1669835	2066573
$\bar{x} \pm SD$	1191661,6±25974,63	1647168,4±30563,05	1988532 ± 70429,18
C.V.	2,18 %	1,85 %	3,54 %

Los valores de C.V. son, en este caso, como máximo del 3,54 % lo que permite considerar que este método presenta una buena *reproducibilidad* inter-días en el análisis de la amoxicilina.

Al presentar en los casos de *repetibilidad* y *reproducibilidad* un C.V. menor del 5% podemos considerar este método como preciso.

V.2.3. Recuperación.

La *recuperación* se calculará mediante el coeficiente de variación (C.V.), para una muestra placebo a los que se ha adicionado tres concentraciones diferentes de amoxicilina trihidrato. La muestra placebo para este estudio consistía en una mezcla de ácido poliacrílico y quitosán en la proporción 1:2,5 (p/p). Sus resultados se muestran en la **tabla 12**.

Tabla 12. Resultados del estudio de *recuperación* de amoxicilina trihidrato en presencia de una muestra placebo de ácido poliacrílico y quitosán en la proporción 1:2,5 (p/p) para muestras que contienen un 75% (7,5 g/ml), un 100% (10,0 g/ml) y un 125% (12,5 g/ml) de amoxicilina.

% de Ámoxicilina adicionado a la muestra	% de Ámoxicilina recuperado	% recuperado
Muestra + 75% Amox.	75,19	100,25
	72,26	96,34
	72,74	96,98
Muestra + 100% Amox.	100,14	100,14
	96,61	96,61
	95,97	95,97
Muestra + 125% Amox.	113,77	91,02
	113,05	90,44
	113,05	90,14
Nº de muestras		9
$\bar{x} \pm SD$		95,32 \pm 3,91
C.V.		4,1%

La *recuperación* de esta técnica presenta valores de C.V. del 4,1 %. No hay retenciones ni pérdidas del analito.

V.3. Análisis de Amoxicilina por Espectrofotometría Directa.

Como los distintos ensayos de velocidad de disolución se han llevado a cabo en pH 1,12 y pH 4, se ha realizado la validación en los dos tipos de medios.

V.3.1. Estudio en medio ácido (pH=1,2).

En este medio de disolución se han ensayado distintas formulaciones con amoxicilina trihidrato y sódica.

V.3.1.1. Selectividad.

Se estudia la *selectividad* de la amoxicilina trihidrato y sódica con los distintos componentes del hidrogel: ácido poliacrílico y chitosán comparando los barridos de soluciones de principio activo con el barrido de una muestra placebo (**figura 16**), donde se observa la ausencia de interferencias para la longitud de onda de 228,5 y 228 nm que se corresponden con las máximas absorbancias de la amoxicilina trihidrato y sódica, respectivamente (ver **figuras 17 y 18**). Al comparar los barridos de la amoxicilina sódica y trihidrato (ver **figura 19**) no se encuentran diferencias entre los dos en las longitudes de onda donde la absorbancia es máxima. La pequeña diferencia en valores de absorbancia entre ambos tipos de amoxicilina puede ser atribuida a pequeñas diferencias de concentración y a las diferencias entre sus estructuras moleculares.

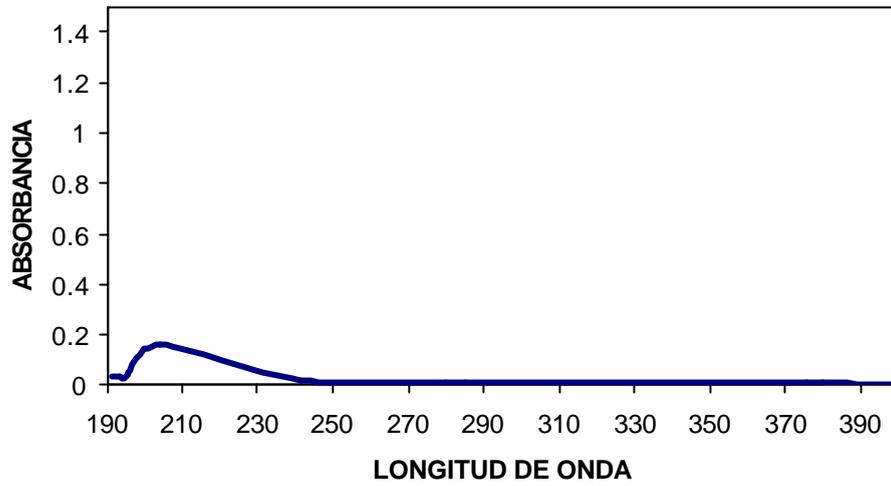


Figura 16. Barrido espectrofotométrico de muestra de hidrogel blanco (PAA:CS:A 1:2,5:0-1,75M)

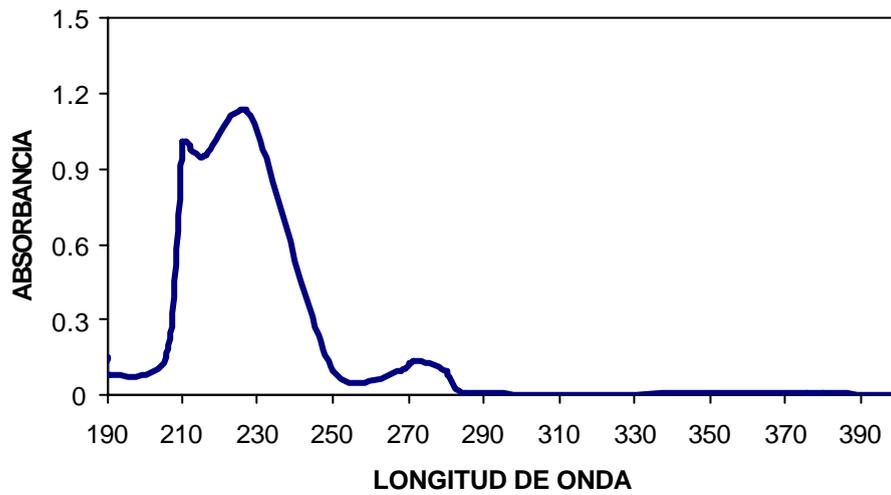


Figura 17. Barrido espectrofotométrico de muestra de amoxicilina sódica.

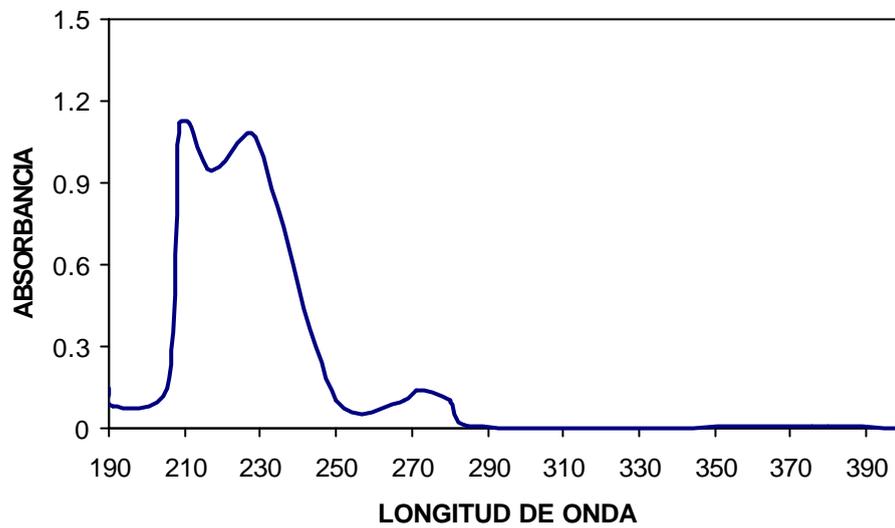


Figura 18. Barrido espectrofotométrico de muestra de amoxicilina trihidrato.

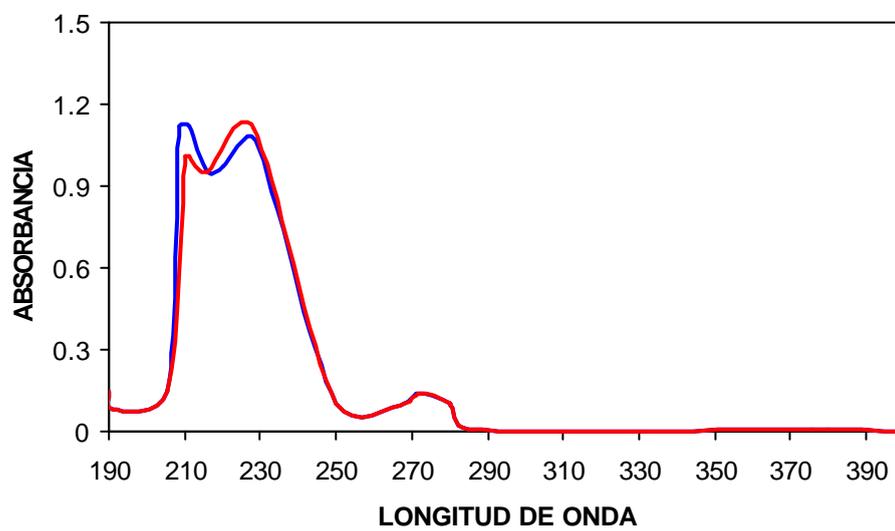


Figura 19. Barrido espectrofotométrico de muestra de amoxicilina trihidrato (—) y de amoxicilina sódica (—).

V.3.1.2. Linealidad.

Su determinación se realiza para seis concentraciones distintas a partir de una solución madre. Sus resultados se muestran en la **figura 20** para la amoxicilina trihidrato y una recta similar para la amoxicilina sódica (ver **figura 21**). Sus rectas de regresión son las siguientes:

Amoxicilina trihidrato:

$$\text{Área} = A + B \times C$$

$$\text{Área} = -0,0004 + 0,0222 \times C$$

$$r = 0,9992 \quad r^2 = 0,9986$$

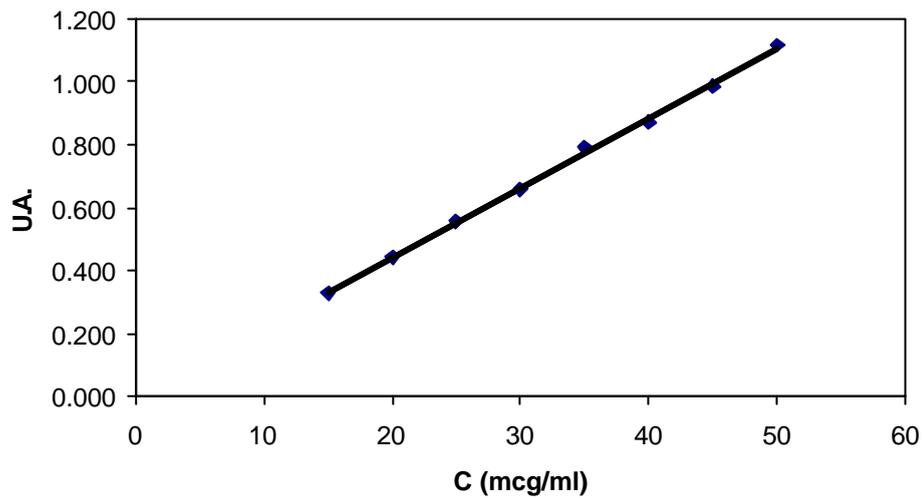


Figura 20. Recta de calibrado de amoxicilina trihidrato en HCl 0,1 N.

Amoxicilina Sódica:

$$\text{Área} = A + B \times C$$

$$\text{Área} = 0,0423 + 0,0214 \times C$$

$$r = 0,9997 \quad r^2 = 0,9996$$

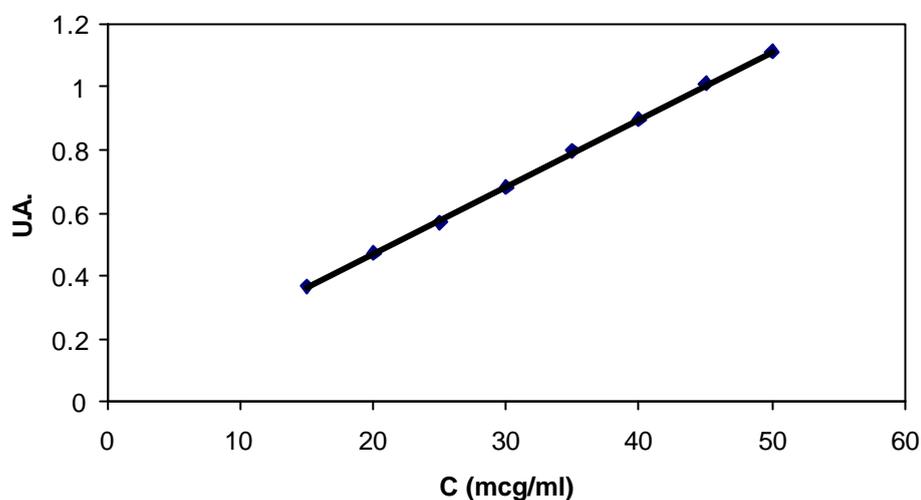


Figura 21. Recta de calibrado de amoxicilina sódica en HCl 0,1 N.

Los buenos resultados del coeficiente de correlación (r) y del coeficiente de determinación (r^2) han permitido considerar que este método es lineal para la cuantificación del en el rango de concentración de 0 a 50 g/ml.

V. 3.1.3. Precisión.

La precisión se va a calcular a partir de los estudios de *repetibilidad* y *reproducibilidad*.

Repetibilidad.

La *repetibilidad* del método se determina a través del coeficiente de variación (C.V.) Se preparan tres soluciones madres, analizándose una concentración de 40 g/ml que contiene un 100% de analito, 30 g/ml para la muestra que contiene un 75% y 50 g/ml para la muestra que representa un 125%. Los valores obtenidos en unidades de absorbancia y sus C.V. se representan en la **tabla 13**.

Tabla 13. Precisión del método mediante estudios de *repetibilidad* intra-días para muestras que contienen un 75% (30 g/ml), un 100% (40 g/ml) y un 125% (50 g/ml) de amoxicilina.

MUESTRAS	Áreas equivalentes a los porcentajes:		
	75%	100%	125%
1	0,6454	0,8466	1,0447
	0,6457	0,8476	1,0480
	0,6471	0,8483	1,0461
2	0,6943	0,8889	1,1007
	0,6937	0,9079	1,1063
	0,7039	0,8989	1,0690
3	0,6749	0,9034	1,0996
	0,6801	0,9029	1,0983
	0,6794	0,9019	1,0973
$\bar{x} \pm SD$	0.6738± 0.0226	0.8829 ± 0.0266	1.0788 ± 0,0266
C.V.	3,36 %	3,06 %	2,46 %

Los valores de C.V. son, en este caso, como máximo del 3,06 %, lo que permite considerar que este método presenta una buena *repetibilidad* en el análisis de la amoxicilina.

Reproducibilidad.

Este ensayo se realizó midiendo tres muestras diferentes, que se corresponden con los porcentajes del 75, 100 y 125, durante 3 días diferentes, sus resultados se muestran en la **tabla 14.**

130 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

Tabla 14. Precisión del método mediante estudios de *reproducibilidad* inter-días para muestras que contienen un 75% (30 g/ml), un 100% (40 g/ml) y un 125% (50 g/ml) de amoxicilina.

DÍAS	Áreas equivalentes a los porcentajes:		
	75%	100%	125%
1	0,6786	0,8669	1,0667
	0,6790	0,8709	1,0590
	0,6821	0,8704	1,0529
2	0,6749	0,9034	1,0996
	0,6801	0,9029	1,0983
	0,6794	0,9019	1,0973
3	0,6517	0,8459	1,0681
	0,6551	0,8503	1,0691
	0,6471	0,8504	1,0769
$\bar{x} \pm SD$	0.6697 \pm 0,0141	0.8736 \pm 0.0236	1.0764 \pm 0.0177
C.V.	2,10 %	2,70 %	1,65 %

Los valores de C.V. son, en este caso, como máximo del 2,70 % lo que permite considerar que este método presenta una buena *reproducibilidad* inter-días en el análisis de la amoxicilina.

Al presentar en los casos de *repetibilidad* y *reproducibilidad* un C.V. menor del 5% se puede considerar este método como preciso.

V.3.1.4. Recuperación.

La *recuperación* se calculará mediante el coeficiente de variación (C.V.), para una muestra placebo a los que se ha adicionado tres concentraciones diferentes de ácido octanoico. La muestra placebo para este estudio consistía en una mezcla de ácido poliacrílico y chitosán en la proporción 1:2,5 (p/p). Sus resultados se muestran en la **tabla 15**.

Tabla 15. Resultados del estudio de *recuperación* de amoxicilina trihidrato en presencia de una muestra placebo de ácido poliacrílico y chitosán en la proporción 1:2,5 (p/p) para muestras que contienen un 75% (30 g/ml), un 100% (40 g/ml) y un 125% (50 g/ml) de amoxicilina.

% de Ámoxicilina adicionado a la muestra	% de Ámoxicilina recuperado	% recuperado
Muestra + 75% Amox.	70,77	94,37
	72,32	96,42
	72,30	96,40
Muestra + 100% Amox.	102,69	102,69
	102,34	102,34
	102,32	102,32
Muestra + 125% Amox.	122,99	98,39
	115,04	92,03
	115,11	92,08
Nº de muestras		9
$\bar{x} \pm SD$		97,45 \pm 4.27
C.V.		4,38 %

La *recuperación* de esta técnica presenta valores de C.V. del 4,38 %. No hay retenciones ni pérdidas del analito.

V.3.2. Estudio en medio de pH 4,0.

V.3.2.1. Selectividad.

Se estudia la *selectividad* de la amoxicilina trihidrato con los distintos componentes del hidrogel: ácido poliacrílico y chitosán comparando los barridos de soluciones de principio activo con el barrido de una muestra placebo (**figura 22**), donde se observa la ausencia de interferencias para la longitud de onda de 227,5 nm que se corresponde con la máxima absorbancia de la amoxicilina trihidrato (ver **figura 23**).

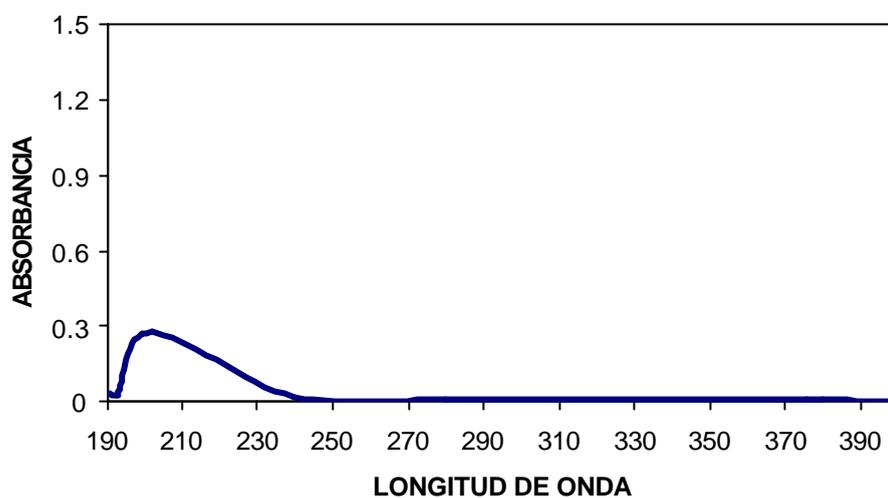


Figura 22. Barrido espectrofotométrico de muestra de hidrogel blanco (PAA:CS:A 1:2,5:0-1,75M)

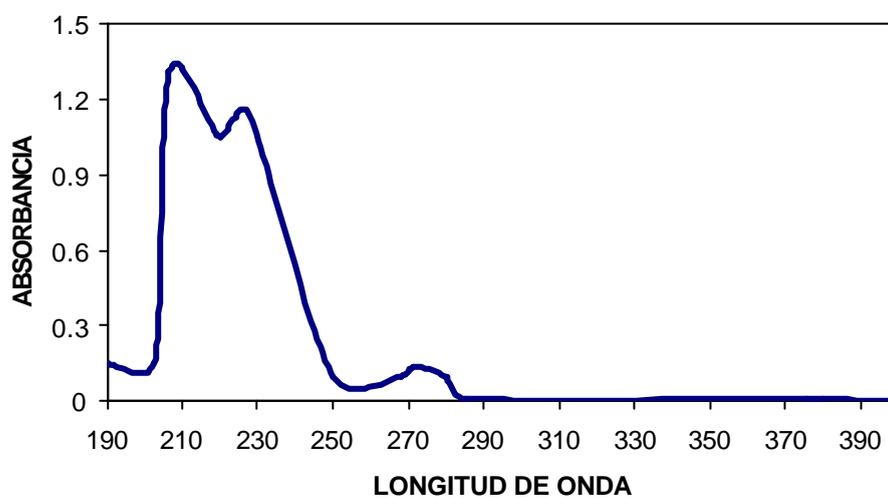


Figura 23. Barrido espectrofotométrico de muestra de amoxicilina en pH 4.

V.3.2.2. Linealidad.

Se estudia la capacidad de este método para obtener resultados proporcionales a las concentraciones del analito dentro de un intervalo determinado. Sus resultados se muestran en la **figura 24** obteniéndose la siguiente recta de regresión:

$$\text{Área} = A + B \times C$$

$$\text{Área} = 0,0175 + 0,0241 \times C$$

$$r = 0,9992 \quad r^2 = 0,9985$$

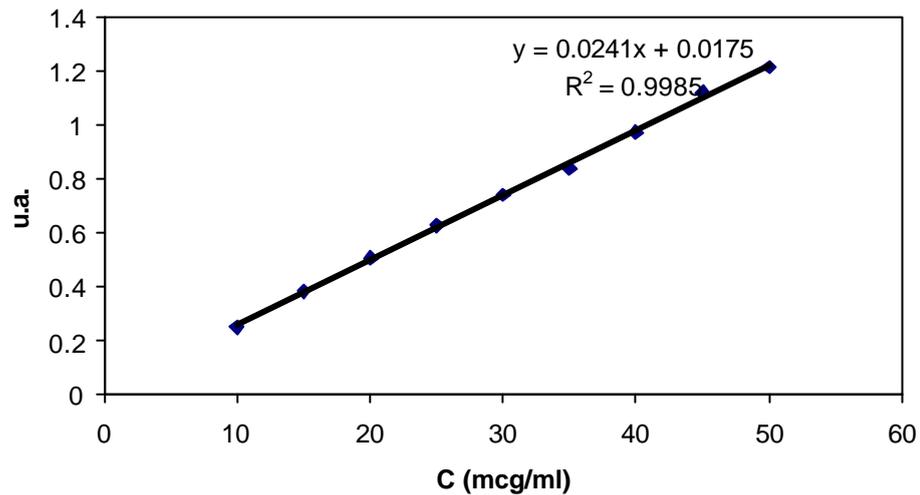


Figura 24. Recta de calibrado de amoxicilina trihidrato en pH 4.

Los buenos resultados del coeficiente de correlación (r) y del coeficiente de determinación (r^2) han permitido considerar que este método es lineal para la cuantificación en el rango de concentración de 0 a 50 g/ml.

134 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

V. 3.2.3. Precisión.

La precisión se va a calcular a partir de los estudios de *repetibilidad* y *reproducibilidad*.

Repetibilidad.

La *repetibilidad* del método se determina a través del coeficiente de variación (C.V.) Se preparan tres soluciones madres, analizándose una concentración de 40 g/ml que contiene un 100% de analito, 30 g/ml para la muestra que contiene un 75% y 50 g/ml para la muestra que representa un 125%. Los valores obtenidos en unidades de absorbancia y sus C.V. se representan en la **tabla 16**.

Tabla 16. Precisión del método mediante estudios de *repetibilidad* intra-días para muestras que contienen un 75% (30 g/ml), un 100% (40 g/ml) y un 125% (50 g/ml) de amoxicilina.

MUESTRAS	Áreas equivalentes a los porcentajes:		
	75%	100%	125%
1	0,7277	0,9299	1,1314
	0,7184	0,9234	1,1410
	0,7274	0,9286	1,1296
2	0,7281	0,9360	1,1206
	0,7171	0,9266	1,1220
	0,7156	0,9321	1,1187
3	0,7353	0,9140	1,1597
	0,7161	0,9324	1,1534
	0,7200	0,9381	1,1519
$\bar{x} \pm SD$	0,7228 \pm 0,0069	0,9290 \pm 0,0072	1,1364 \pm 0,0155
C.V.	0,96 %	0,77 %	1,36 %

Los valores de C.V. son, en este caso, como máximo del 1,36 %, lo que permite considerar que este método presenta una muy buena *repetibilidad* en el análisis de la amoxicilina.

Reproducibilidad.

Este ensayo se realizó midiendo tres muestras diferentes, que se corresponden con los porcentajes del 75, 100 y 125, durante 3 días diferentes, sus resultados se muestran en la **tabla 17**.

Tabla 17. Precisión del método mediante estudios de *reproducibilidad* inter-días para muestras que contienen un 75% (30 g/ml), un 100% (40 g/ml) y un 125% (50 g/ml) de amoxicilina.

DÍAS	Áreas equivalentes a los porcentajes:		
	75%	100%	125%
1	0,7419	0,9749	1,2079
	0,7433	0,9919	1,2153
	0,7424	0,9660	1,1934
2	0,7281	0,9360	1,1314
	0,7171	0,9266	1,1410
	0,7156	0,9321	1,1296
3	0,7253	0,9240	1,1496
	0,7262	0,9224	1,1533
	0,7300	0,9481	1,1520
$\bar{x} \pm SD$	0,7299 \pm 0,0105	0,9468 \pm 0,0251	1,1637 \pm 0,0329
C.V.	1,44 %	2,65 %	2,82 %

Los valores de C.V. son, en este caso, como máximo del 2,82 % lo que permite considerar que este método presenta una buena *reproducibilidad* inter-días en el análisis de la amoxicilina.

Al presentar en los casos de *repetibilidad* y *reproducibilidad* un C.V. menor del 5% se puede considerar este método como preciso.

V. 3.2.4. Recuperación.

La *recuperación* se calculará mediante el coeficiente de variación (C.V.), para una muestra placebo a los que se ha adicionado tres concentraciones diferentes de ácido octanoico. La muestra placebo para este estudio consistía en una mezcla de ácido

136 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

poliacrílico y quitosán en la proporción 1:2,5 (p/p). Sus resultados se muestran en la **tabla 18**.

Tabla 18. Resultados del estudio de *recuperación* de amoxicilina trihidrato en presencia de una muestra placebo de ácido poliacrílico y quitosán en la proporción 1:2,5 (p/p) para muestras que contienen un 75% (30 g/ml), un 100% (40 g/ml) y un 125% (50 g/ml) de amoxicilina.

% de Ámoxicilina adicionado a la muestra	% de Ámoxicilina recuperado	% recuperado
Muestra + 75% Amox.	77,17	102,89
	77,93	103,90
	79,14	105,52
Muestra + 100% Amox.	99,89	99,89
	100,79	100,79
	101,37	101,37
Muestra + 125% Amox.	121,52	100,27
	123,35	98,67
	125,34	101,17
Nº de muestras		9
$\bar{x} \pm SD$		101,17 \pm 2,59
C.V.		2,56 %

La *recuperación* de esta técnica presenta valores de C.V. del 2,56 %. Estos resultados permiten considerar que no hay retenciones ni pérdidas del analito.

V.4. Discusión parcial.

En este capítulo se ha realizado la validación en primer lugar de un nuevo método de análisis por HPLC de ácido octanoico, donde a la vista de los buenos resultados obtenidos de *selectividad*, *linealidad* y *precisión* se considera que este método está convenientemente validado.

Asimismo se realizó la validación de una técnica de análisis de amoxicilina por HPLC. Como este método se encuentra recogido en la USP 24, 2000, sólo se realizaron estudios de *selectividad* y precisión. Al obtener buenos resultados se consideró a este método como adecuadamente validado. Como consecuencia de los estudios de estabilidad, donde se observó que había una pérdida de analito en muestras a 37°C y congeladas, se procedió a su lectura en el HPLC antes de 1 h después de su preparación.

Por último se llevó a cabo la validación de un método de análisis de amoxicilina trihidrato y sódica por espectrofotometría directa. En los estudios de *selectividad*, *linealidad* y precisión se observaron pocas diferencias entre los resultados obtenidos por la amoxicilina trihidrato y sódica en medio simulado gástrico, debidas a sus diferentes estructuras moleculares. Se considera este método como convenientemente validado por los buenos resultados obtenidos en todos los estudios.

CAPÍTULO VI: INFLUENCIA DE LA SOLUBILIDAD DEL PRINCIPIO ACTIVO Y DE LA PROPORCIÓN DE CHITOSÁN EN LOS COMPLEJOS POLIIÓNICOS.

En este capítulo se han estudiado formulaciones de hidrogeles que consisten en complejos poliónicos formados por distintas relaciones de chitosán (CS) y Carbopol® 974P NF (PAA), no unidos por enlaces covalentes, formados en el mismo tipo de medio (ácido acético 1,75M) y se ha evaluado su comportamiento en medio simulado gástrico (HCl 0,1N). El principal objetivo fue el estudio de las posibles interacciones entre ambos polímeros, y su influencia en el hinchamiento de los hidrogeles y la cesión de la amoxicilina.

Todas las formulaciones contienen una proporción constante de 2 partes de amoxicilina. Así mismo, todas las formulaciones se prepararon tanto con amoxicilina trihidrato (A) o sódica (A-NA) para estudiar la influencia de la solubilidad del principio activo en el hinchamiento de los hidrogeles y la cinética de cesión de amoxicilina en medio ácido.

Se han evaluado las siguientes relaciones poliméricas:

- Las relaciones de PAA:CS:A o PAA:CS:A-NA de los hidrogeles formados por chitosán y Carbopol® 974P NF tanto con amoxicilina trihidrato o sódica son: (1:2,5:2)-1,75M, (1:5:2)-1,75M y (1:7,5:2)-1,75M.
- Como hidrogeles de referencia se han estudiado las formulaciones liofilizadas que contienen solo CS como polímero y amoxicilina trihidrato: (0:2,5:2)-1,75M, (0:5:2)-1,75M, (0:7,5:2)-1,75M.
- Como hidrogel de referencia en los estudios de espectroscopia infrarroja se ha utilizado un complejo poliónico sin principio activo, con la siguiente relación: PAA:CS:A (1:2,5:0)-1,75M.

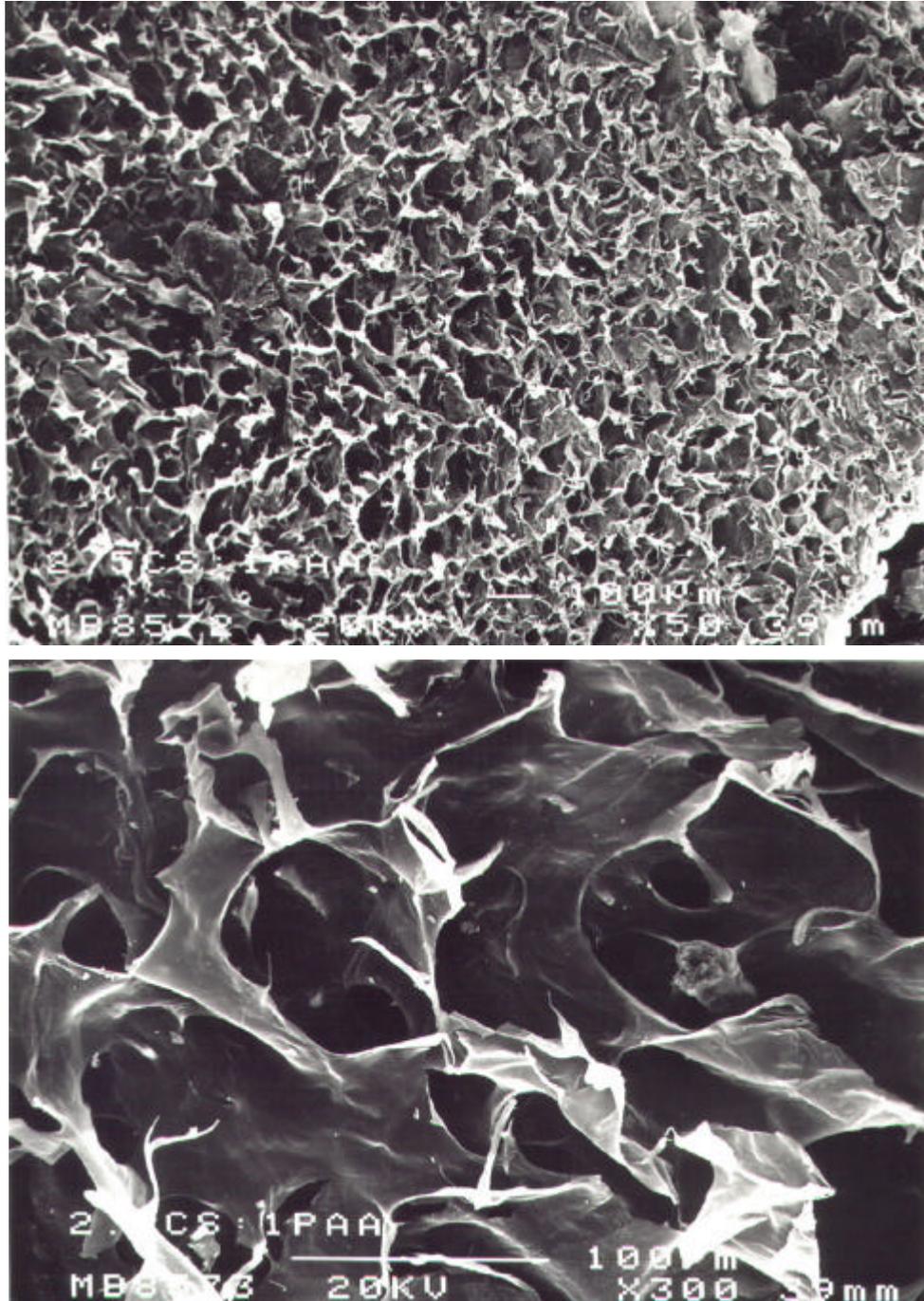
La caracterización de los distintos hidrogeles se ha realizado mediante estudios de microscopía electrónica de barrido, espectroscopia infrarroja, estudios de hinchamiento y de velocidad de disolución de los complejos poliiónicos en medio simulado gástrico (HCl 0,1N).

VI.1. Caracterización física por medio de Microscopía electrónica de barrido (SEM).

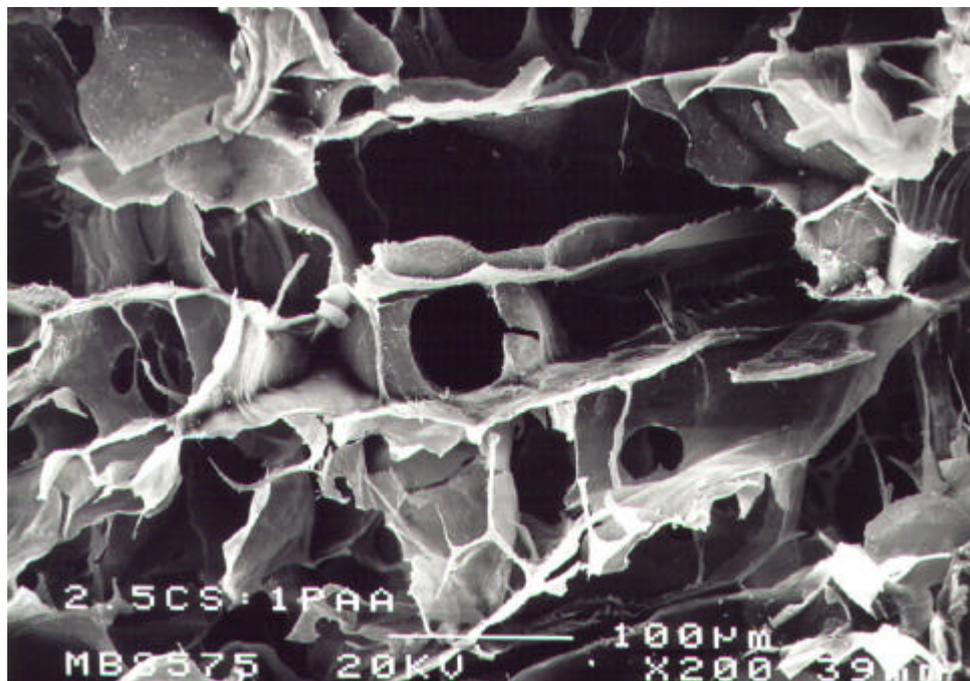
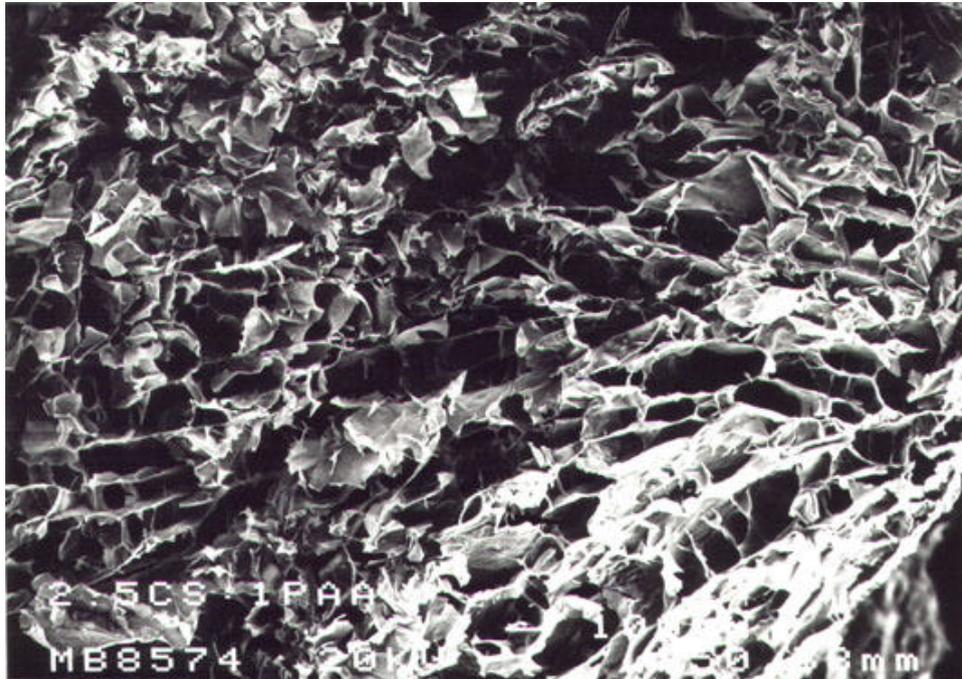
Esta técnica permite evaluar la apariencia, morfología y tamaño de las estructuras originadas en los distintos hidrogeles liofilizados.

Todas estas formulaciones supuestamente son muy porosas como consecuencia de haber sufrido un proceso de liofilización. Patel y col., (1996) afirmaron que hay que tener en cuenta que los estudios realizados por SEM se hacen con hidrogeles secos liofilizados, el tamaño de poro de las formulaciones, que se ve en las microfotografías, no puede reflejar la magnitud de la difusión del principio activo en el estado hinchado del hidrogel, pero su tipo de estructura y tamaño de poro están relacionados con su comportamiento en los posteriores procesos de hinchamiento o velocidad de disolución. Las **microfotografías 1-10** muestran la morfología de diferentes hidrogeles liofilizados de amoxicilina trihidrato a distintos aumentos. La capa superior del complejo poliiónico PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75M (**microfotografía 1**) presenta una superficie altamente porosa con un tamaño de poro aproximado de 25-50 μ m. Los poros se encuentran conectados entre ellos formando canales capilares, como se puede apreciar también en el corte transversal de este complejo poliiónico (**microfotografía 2**). Esta estructura ha sido previamente descrita en la literatura por varios autores (Patel y col., 1996; Risbud y col., 2000). Por el contrario, en la formulación PAA:CS:A (0:2,5:2)-1,75M (**microfotografía 3**), cuando el hidrogel sólo contiene CS y amoxicilina trihidrato, muestra una superficie no porosa y en forma de escamas. Los cambios existentes entre estos dos hidrogeles pueden ser debidos a la interacción entre CS y PAA en una determinada relación. Como fue descrito previamente por Risbud y col. (2000) y Nobel y col. (1999) el proceso de liofilización en hidrogeles que contienen CS produce un material de estas características.

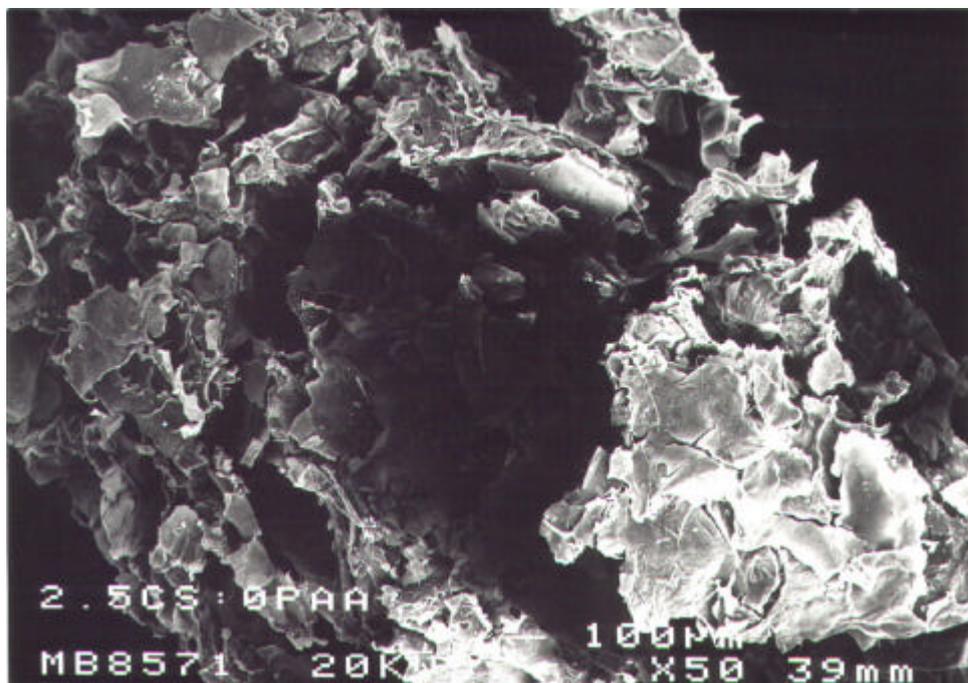
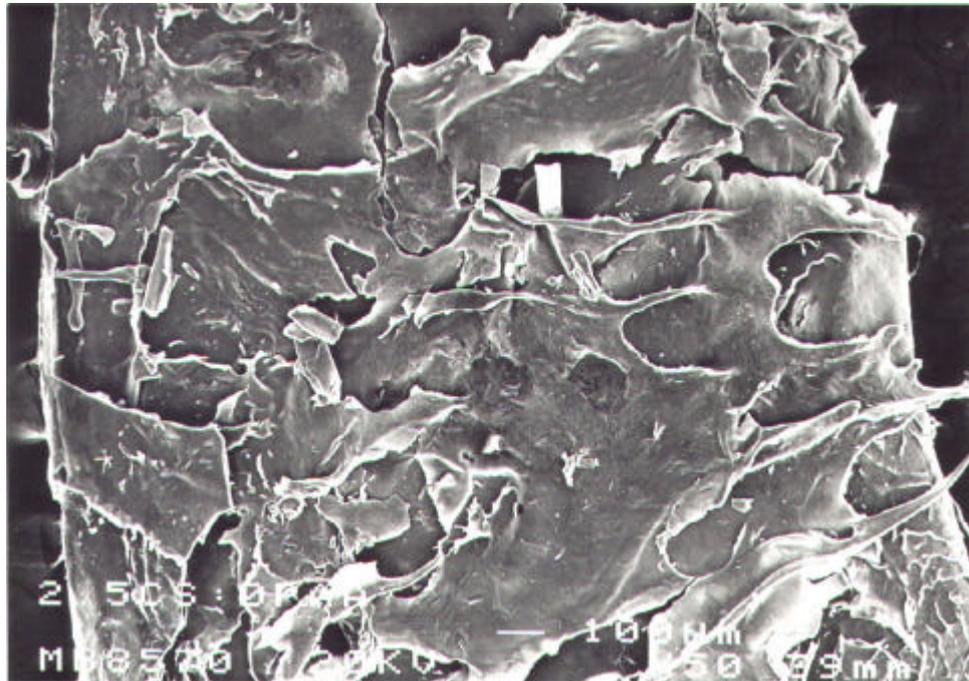
El complejo poliiónico PAA:CS:A (1:5:2)-1,75M (**microfotografías 4 y 5**), que contiene una mayor cantidad de CS e igual proporción de PAA con respecto a la formulación PAA:CS:A (1:2.5:2)-1,75M, presenta una morfología diferente a la de este último complejo interpolimérico, con una superficie muy rugosa llena de poros irregulares de diferentes tamaños. A diferencia del hidrogel PAA:CS:A (0:2,5:2)-1,75M, la parte superior de la formulación PAA:CS:A (0:5:2)-1,75M (**microfotografía 6.a y 7**) muestra poros irregulares y estructuras filamentosas en su superficie. Estos resultados llevan a la conclusión que en una cierta relación de PAA:CS:A (1:5:2) la morfología y la distribución de los poros se vuelve irregular, y en el caso de las formulaciones sin PAA se observa una estructura sin poros o con pocos orificios irregulares.



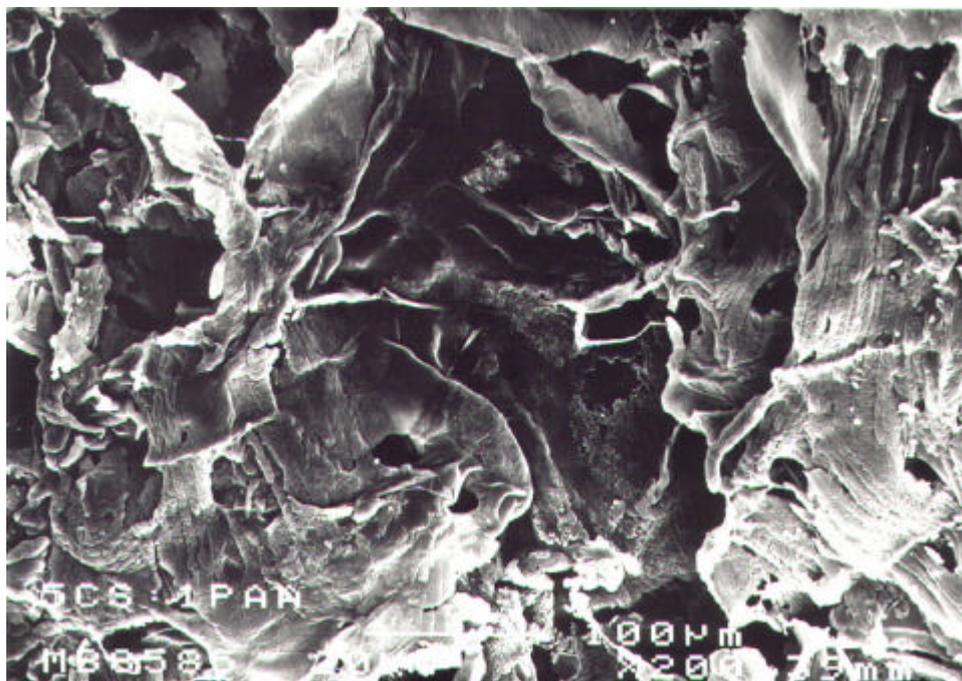
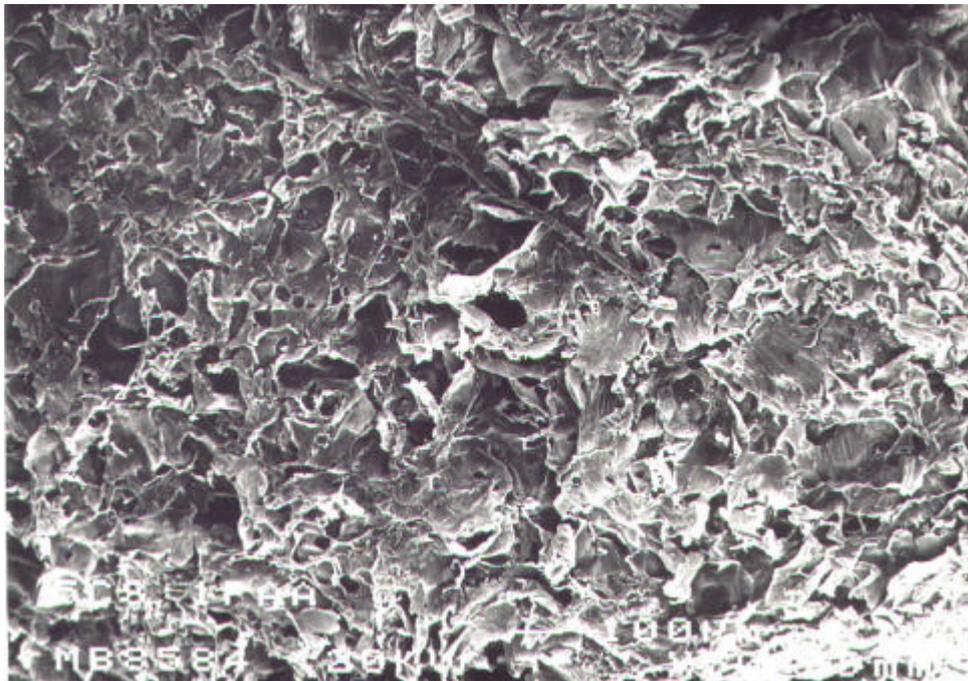
Microfotografía 1. Superficie del complejo poliiónico de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75M, 50 (1.a) y 300 aumentos (1.b).



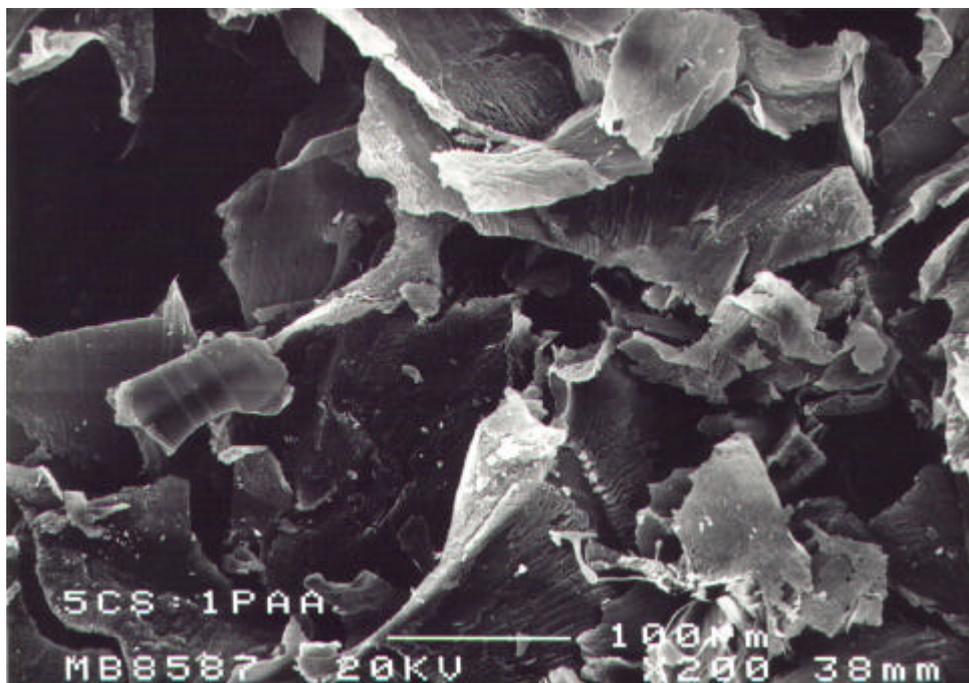
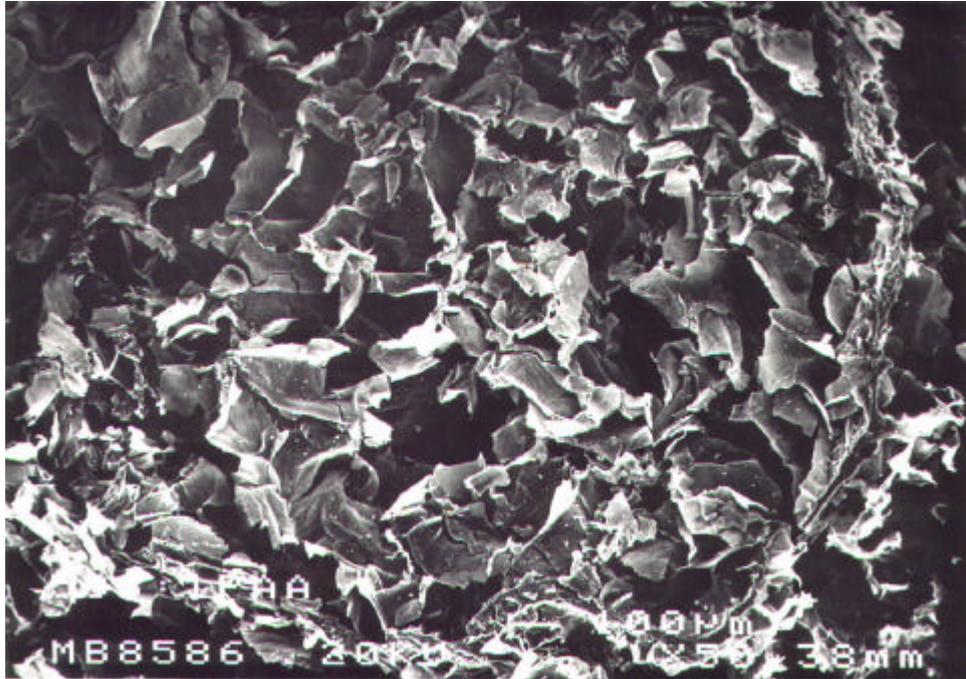
Microfotografía 2. Corte transversal del complejo poliiónico de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75M, 50 (2.a) y 200 aumentos (2.b).



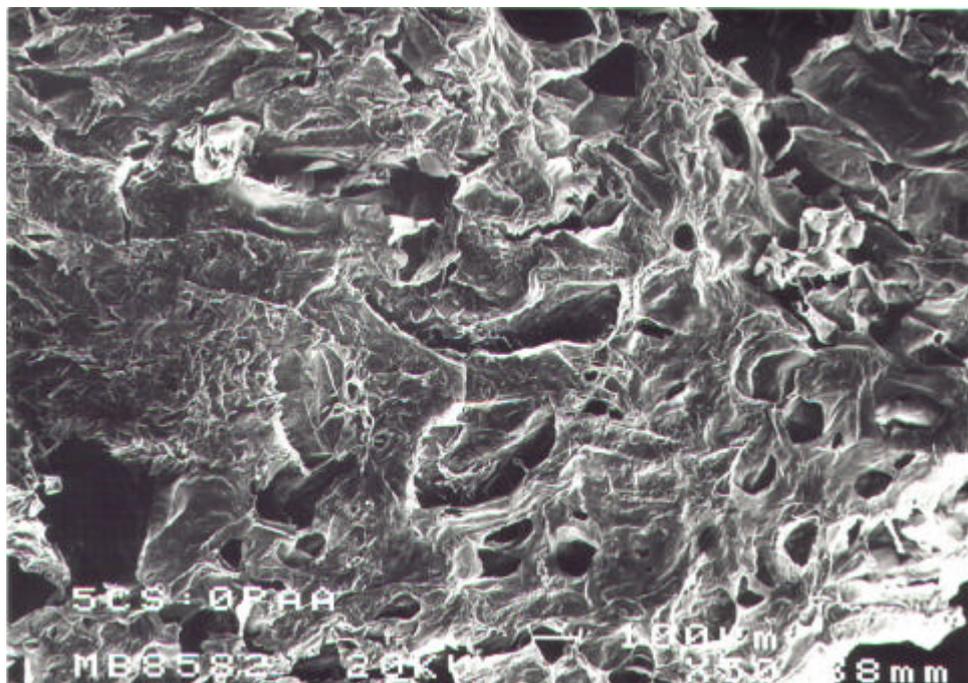
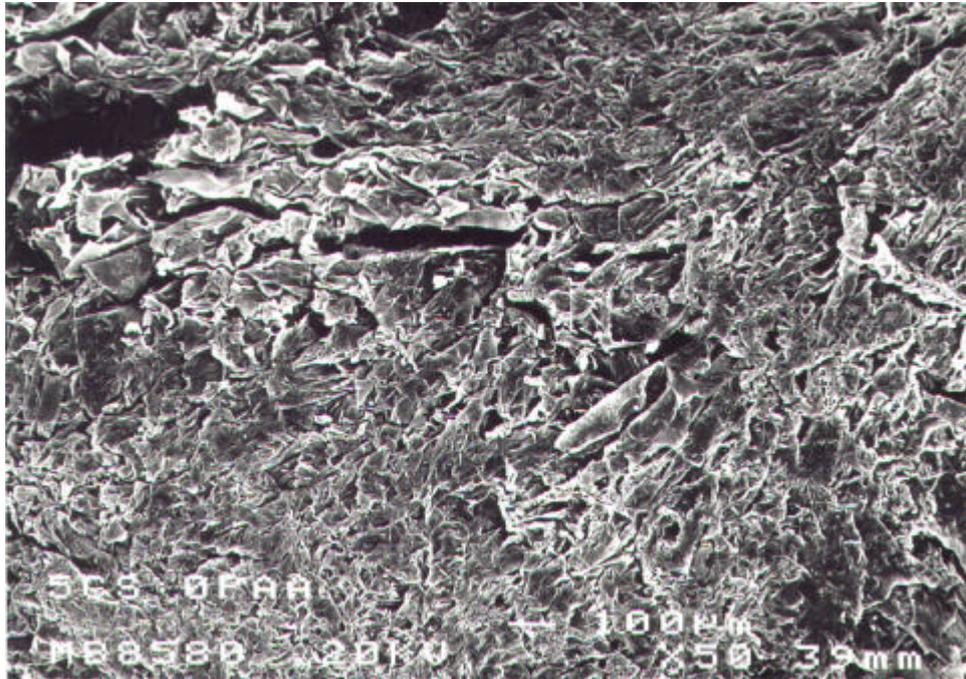
Microfotografía 3. Superficie (3.a) y corte transversal (3.b) del hidrogel de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (0:2,5:2)-1,75M, 50 aumentos.



Microfotografía 4. Superficie del complejo poliiónico de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (1:5:2)-1,75M, 50 (4.a) y 200 aumentos (4.b).



Microfotografía 5. Corte transversal del complejo poliónicos de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (1:5:2)-1,75M, 50 (5.a) y 200 aumentos (5.b).

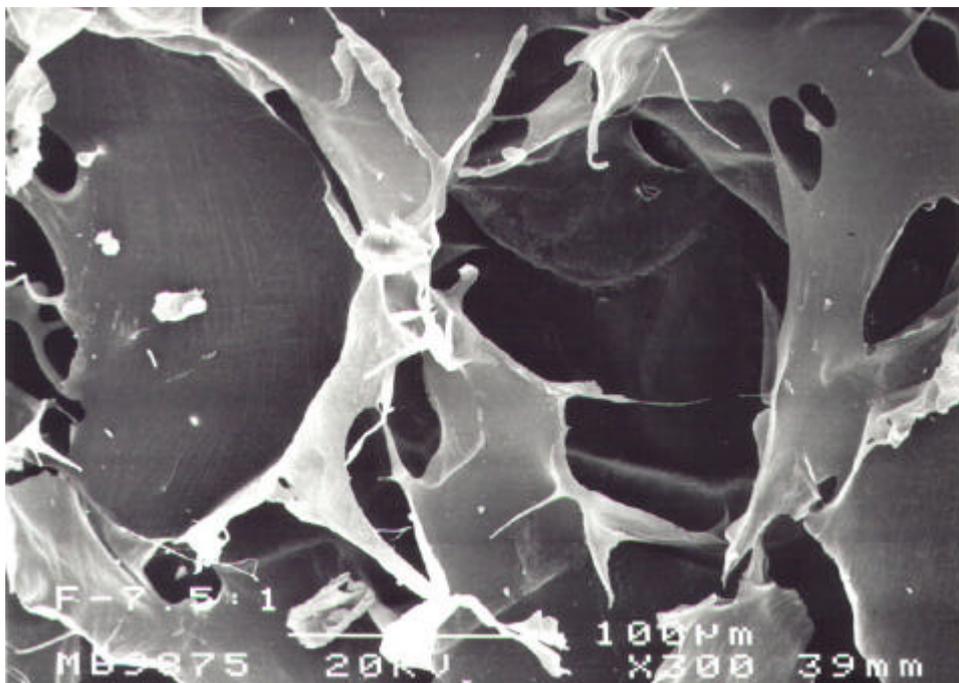
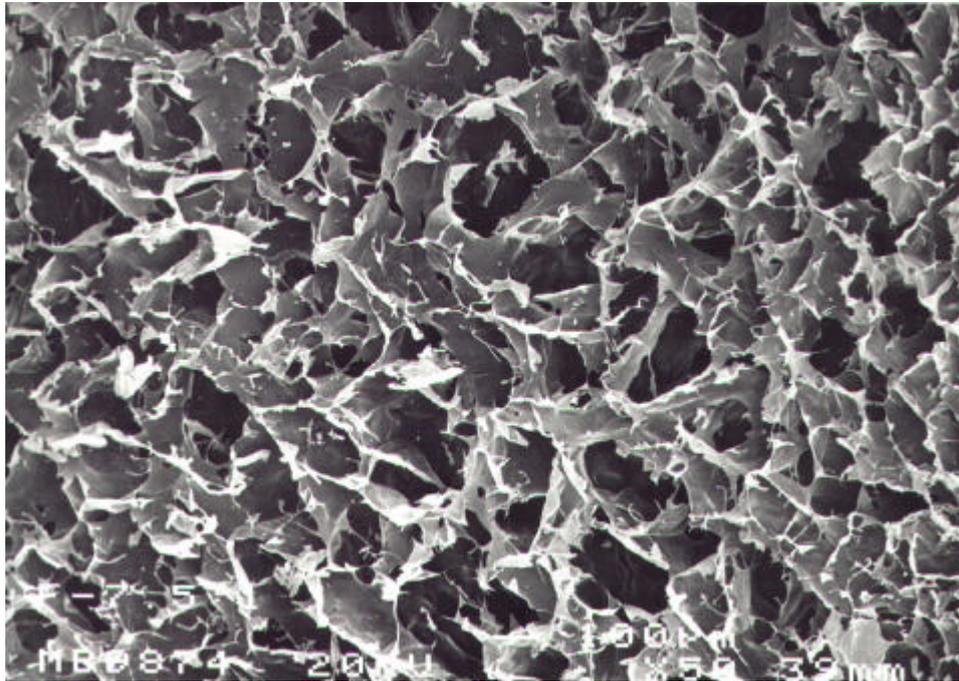


Microfotografía 6. Superficie (6.a) y corte transversal (6.b) del hidrogel de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (0:5:2)-1,75M, 50 aumentos.

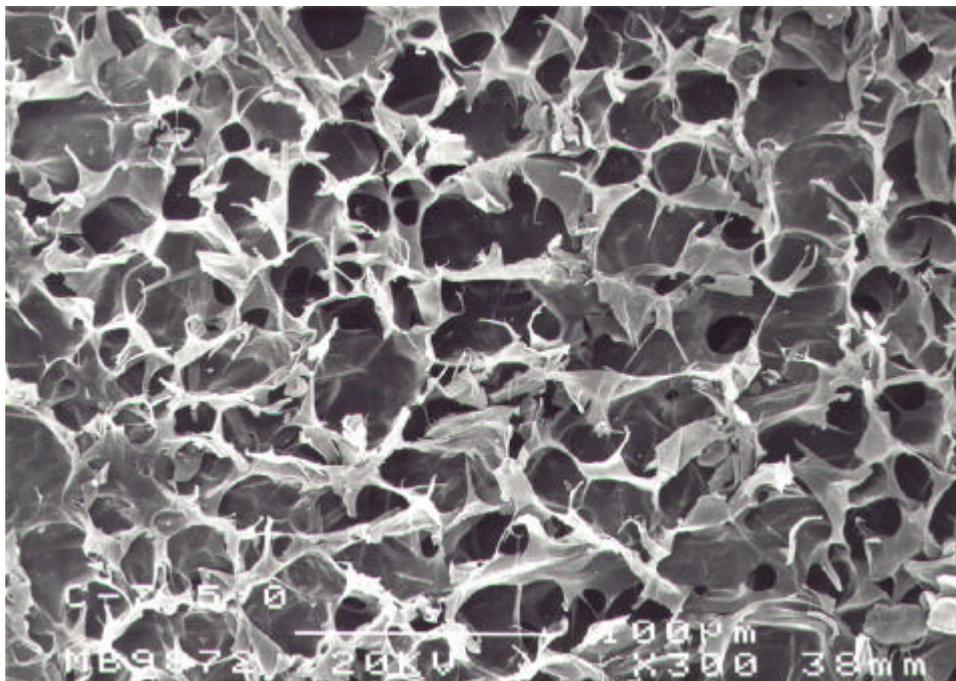


Microfotografía 7. Superficie del hidrogel de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (0:2,5:2)-1,75M, 300 aumentos.

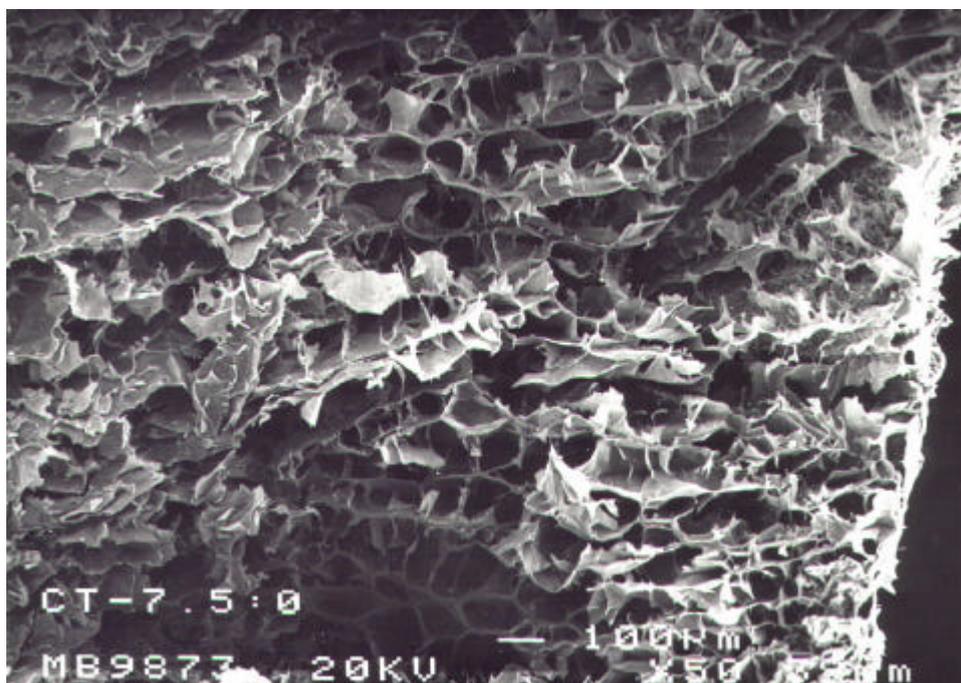
Los hidrogeles que contienen la máxima cantidad de CS, PAA:CS:A (1:7,5:2)-1,75M y PAA:CS:A (0:7,5:2)-1,75M (**microfotografía 8-10**), presentan una superficie altamente porosa, observándose un aumento en el tamaño de poro con la presencia de PAA. En el corte transversal del hidrogel PAA:CS:A (0:7,5:2)-1,75M se muestran poros formando una estructura en forma de panal de abeja, con un tamaño aproximado de 75-135 μm , de iguales dimensiones que los que presenta el complejo . PAA:CS:A (1:7,5:2)-1,75M en su superficie.



Microfotografía 8. Superficie del complejo poliiónico de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (1:7,5:2)-1,75M, 50 (8.a) y 300 aumentos (8.b).



Microfotografía 9. Superficie del hidrogel de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (0:7,5:2)-1,75M, 50 (9.a) y 300 aumentos (9.b).

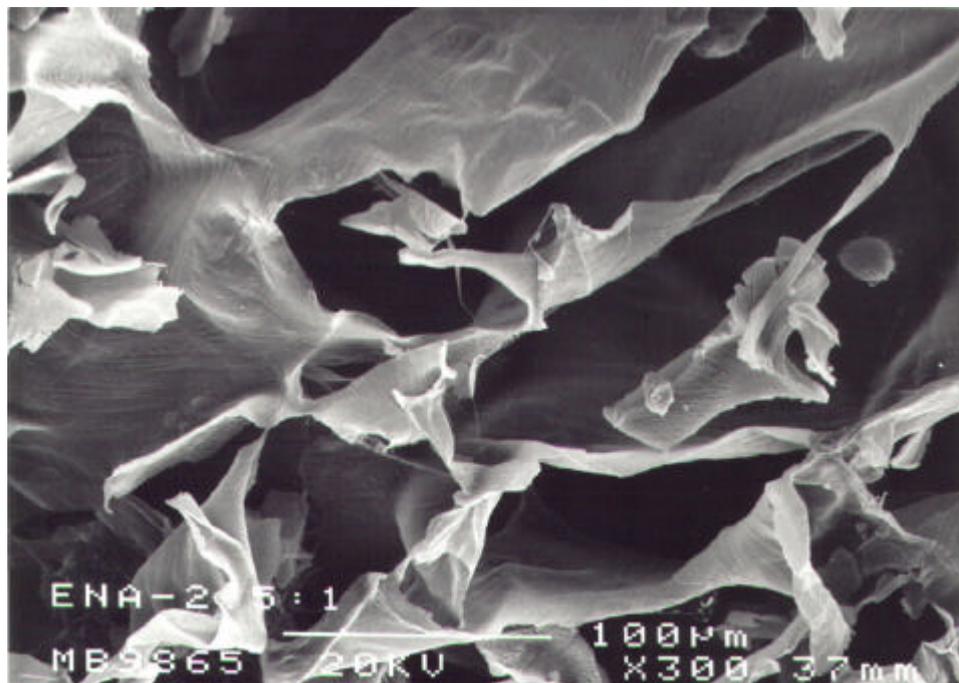
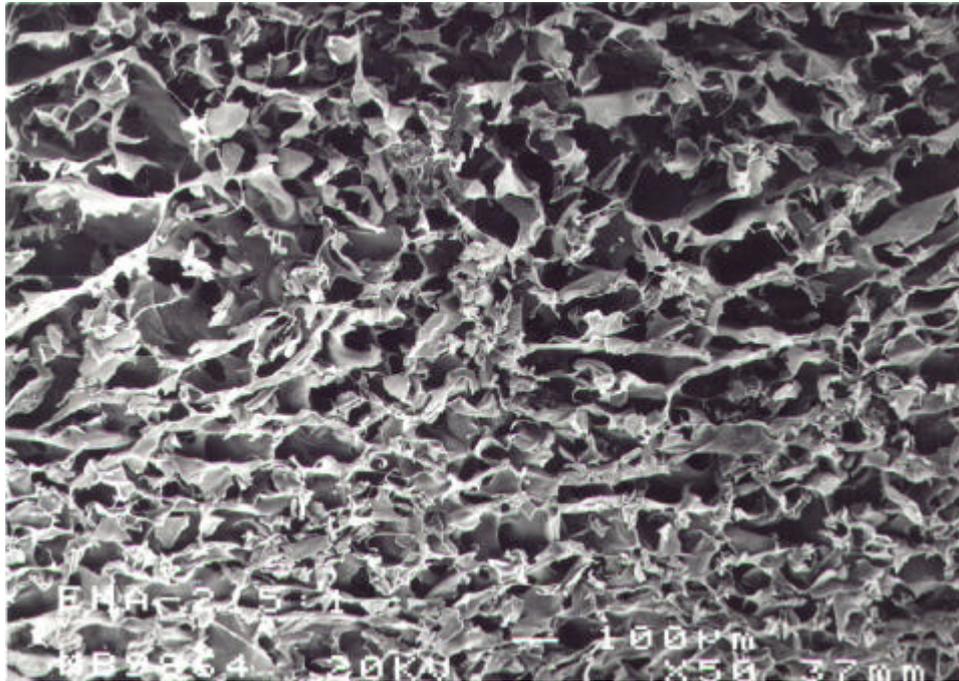


Microfotografía 10. Superficie del hidrogel de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (0:7,5:2)-1,75M, 50 aumentos.

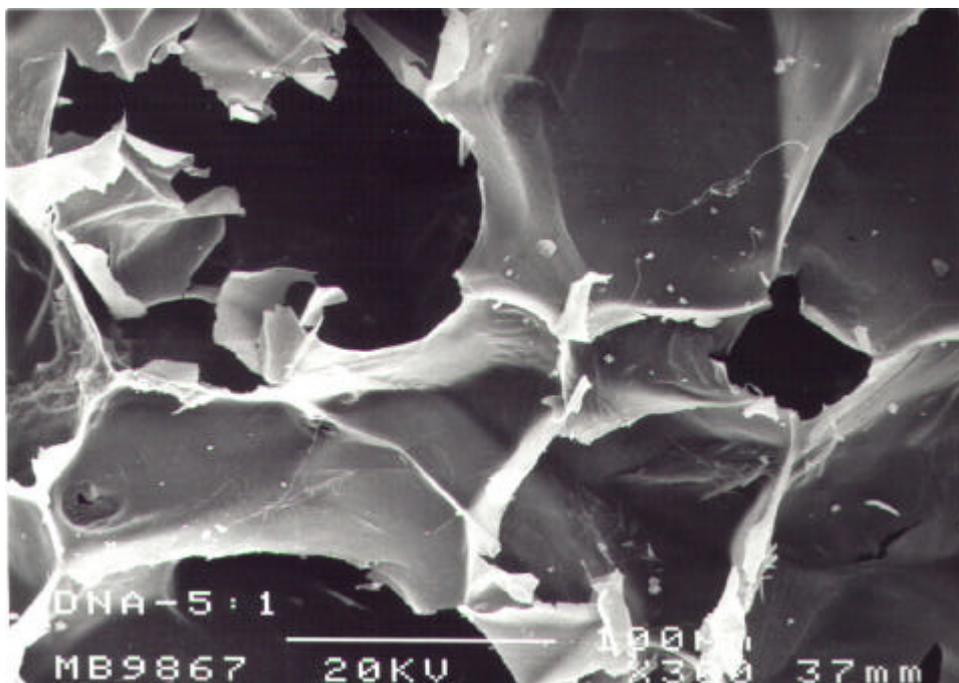
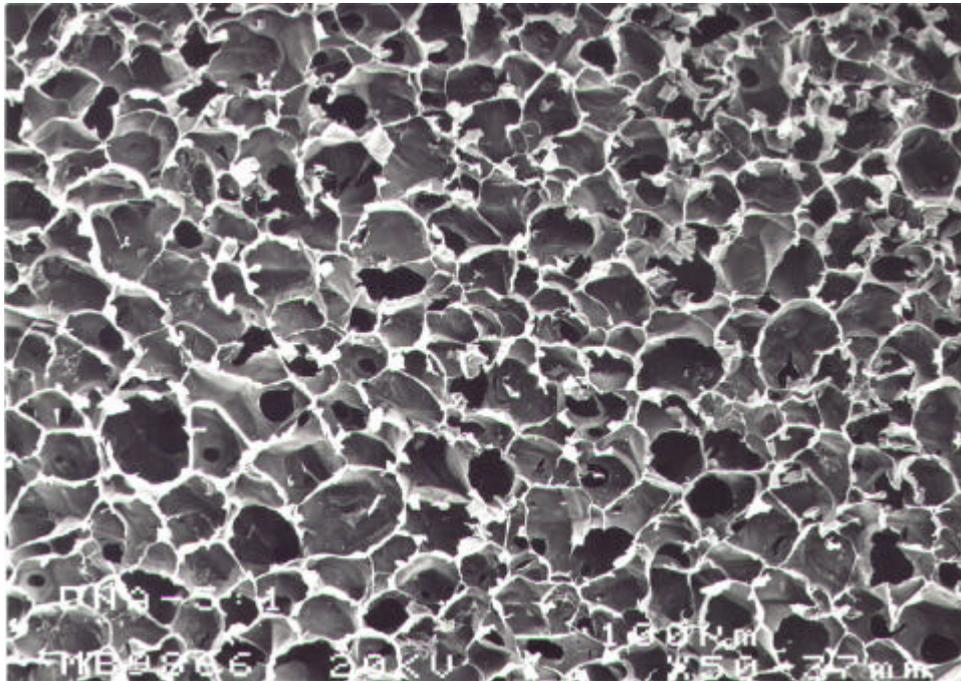
Las **microfotografías 11-14** muestran la morfología de diferentes hidrogeles liofilizados con amoxicilina sódica. La capa superior del complejo poliónico PAA:CS:A-NA (1:2,5:2)-1,75M (**microfotografía 11**) presenta una superficie irregular altamente porosa con orificios irregulares de diferentes tamaños (25-62,5 μm). Por el contrario el complejo interpolimérico PAA:CS:A-NA (1:5:2)-1,75M (**microfotografía 12 y 13**) presenta una superficie regular con un tamaño aproximado de poro de: 87,5-137,5 μm . Curiosamente, cuando se incrementa la cantidad de CS en la formulación, PAA:CS:A-NA (1:7,5:2)-1,75M, en su superficie se observa una disposición regular de poros en filas (**microfotografía 14**). Se puede observar claramente a 300 X aumentos (**microfotografía 14.b**) que hay estructuras filamentosas en su superficie que pueden ser debidas al CS. Estos resultados nos permiten considerar que existe una interacción electrostática diferente según el tipo de amoxicilina utilizada. Esta interacción con el hidrogel producirá distintos perfiles de disolución en la amoxicilina trihidrato o en la amoxicilina sódica. La importancia del tamaño de poro y su distribución en

152 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

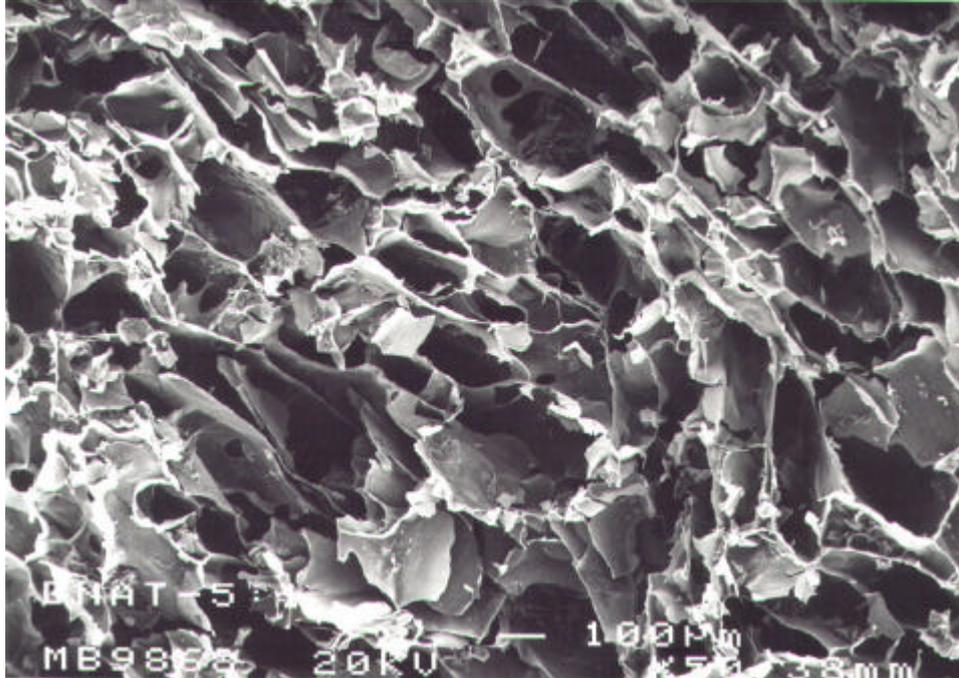
la estructura del hidrogel ha sido estudiada por distintos autores. Así, Patel y col. (1996) y Risbud y col. (2000) consideran que la presencia de poros irregulares de diferente tamaño podría explicar la mayor cesión de estos hidrogeles. En base a estos resultados los hidrogeles de amoxicilina trihidrato con una relación PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75M y la de amoxicilina sódica con una relación PAA:CS:A-NA (1:5:2)-1,75M son las que presentan una superficie más regular de poros que puede permitir un mayor control de la disolución del principio activo.



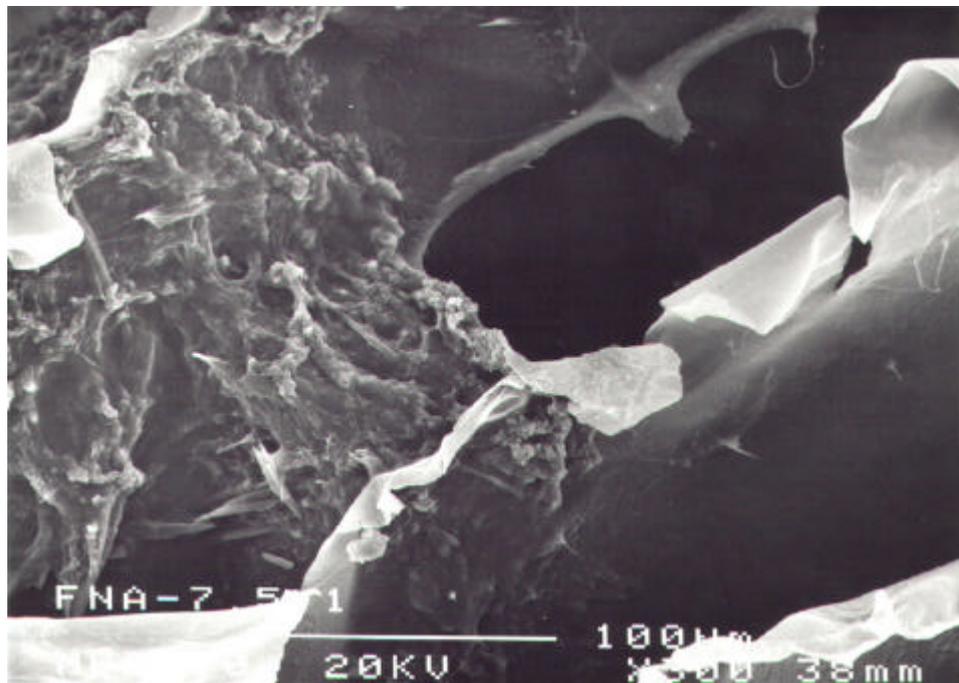
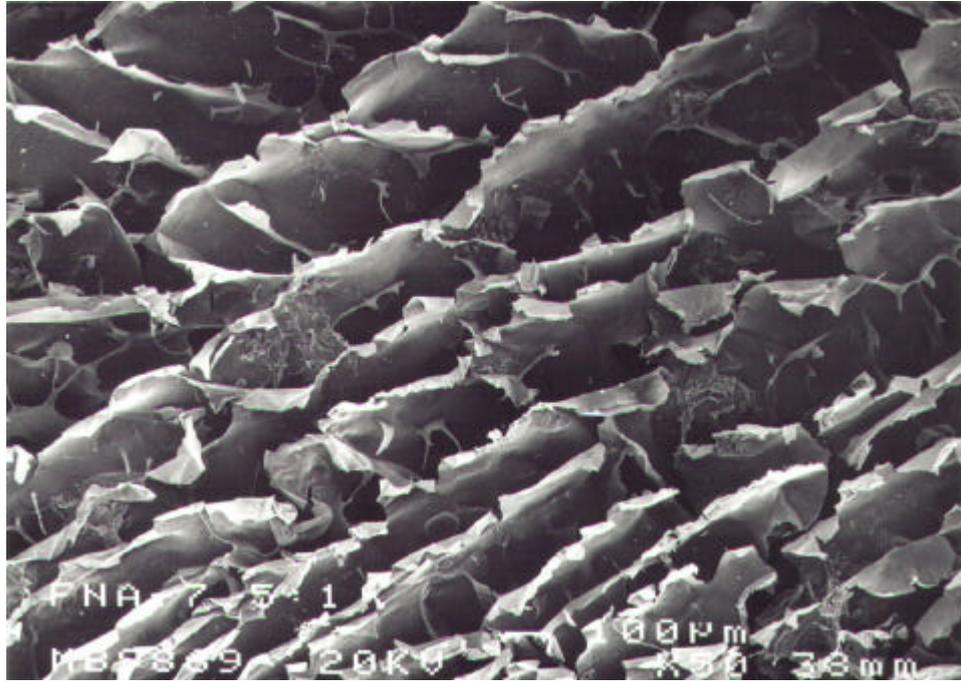
Microfotografía 11. Superficie del complejo poliiónico de amoxicilina sódica: PAA:CS:A-NA (1:2,5:2)-1,75M, 50 (11.a) y 300 aumentos (11.b).



Microfotografía 12. Superficie del complejo poliónico de amoxicilina sódica: PAA:CS:A-NA (1:5:2)-1,75M, 50 (12.a) y 300 aumentos (12.b).



Microfotografía 13. Corte transversal del complejo poliónico de amoxicilina sódica PAA:CS:A-NA (1:5:2)-1,75M, 50 aumentos.



Microfotografía 14. Superficie del complejo poliónico de amoxicilina sódica PAA:CS:A-NA (1:7,5:2)-1,75M, 50 (14.a) y 300 aumentos (14.b).

VI.2. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (IRTF).

La estructura de los distintos enlaces en el ámbito molecular puede ser estudiada mediante la técnica de espectroscopía infrarroja.

El espectro de infrarrojo (IR) del CS (**figura 25.a**) presenta unas bandas características de grupos amida: amida 1ª y amida 3ª a $1653,31\text{ cm}^{-1}$ y $1322,92\text{ cm}^{-1}$, respectivamente. La banda a $1715,62\text{ cm}^{-1}$, en el espectro IR del PAA (**figura 25.b**), ha sido asignada a la vibración elástica del C=O de los grupos carboxílicos.

En comparación con la **figura 25.a** y la **figura 25.b**, se han visto cambios importantes en el espectro de hidrogeles liofilizados de PAA:CS:A, relación (1:2.5:0)-1,75M, sin principio activo dentro de la matriz (**figura 25.c**), y éstos pueden ser consecuencia del empleo de ácido acético y de hidróxido sódico en la preparación del hidrogel. En la **figura 25.c** dos fuertes bandas a $1413,05\text{ cm}^{-1}$ y $1558,59\text{ cm}^{-1}$ pueden ser observadas debido a la vibración elástica simétrica y asimétrica de los grupos COO^- , respectivamente, mientras que un pico a $1640,10\text{ cm}^{-1}$ es atribuido a la formación de NH_3^+ durante la preparación de los hidrogeles liofilizados. Estos resultados permiten considerar que estos complejos poliiónicos liofilizados presentan enlaces electrostáticos entre los grupos COO^- del PAA y las aminas protonadas del CS. En la **figura 25.d** se muestra el espectro IR del complejo interpolimérico PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75M con amoxicilina trihidrato. Este espectro es similar al de la **figura 25.c**, por lo tanto, se puede considerar que posiblemente la amoxicilina está atrapada en el interior de la matriz polimérica por medio de interacciones electrostáticas producidas entre sus aminas, grupos carboxílicos y las diferentes cadenas poliméricas del hidrogel. Similares interacciones electrostáticas fueron observadas por Wang y col. (1997) en hidrogeles de CS y ácido poliacrílico enlazados covalentemente por glutaraldehído.

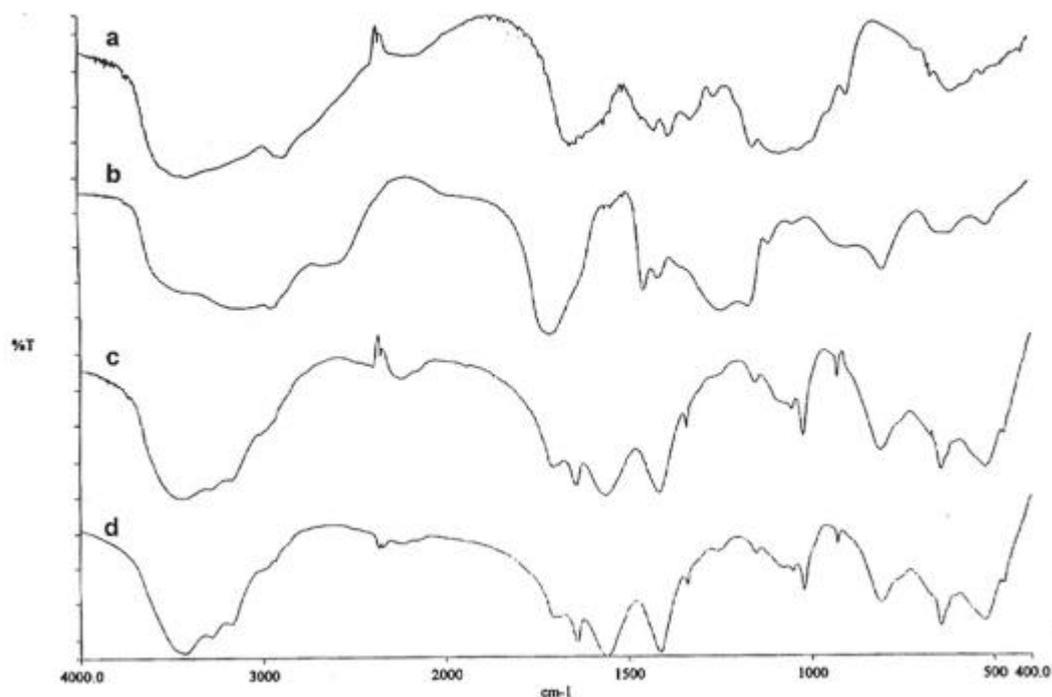


Figura 25. Espectros infrarrojos de (a) quitosán no liofilizado de bajo peso molecular, (b) carbopol[®] 974P NF no liofilizado, (c) complejo poliiónico liofilizado sin principio activo PAA:CS:A (1:2,5:0)-1,75M (d) complejo poliiónico liofilizado con amoxicilina trihidrato PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75M.

VI.3. Estudios de hinchamiento y erosión.

Por causa de las especiales características de estos hidrogeles se han estudiado las cinéticas de hinchamiento y de erosión de los complejos poliiónicos.

Primeramente, en los hidrogeles de amoxicilina trihidrato con cantidades crecientes de CS, fueron comparadas las que no tenían PAA (**figura 26**) con aquellas que si poseían PAA (**figura 27**). El máximo grado de hinchamiento de todas las formulaciones tenía lugar a tiempos cortos (15 minutos) a excepción de los hidrogeles PAA:CS:A (0:7,5:2)-1,75M y

PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75M que presentaron un máximo grado de hinchamiento a los 45 minutos. La naturaleza porosa de los hidrogeles puede ser la responsable del fenómeno anterior por ofrecer una gran superficie y por lo tanto causar una mayor interacción entre la matriz y el solvente, permitiendo una mejor entrada del solvente y consiguiendo un hinchamiento eficiente y rápido (Risbud y col., 2000). La **figura 26** muestra la correlación directa entre el aumento en la proporción de CS en el hidrogel y el valor alcanzado de hinchamiento máximo. El hidrogel PAA:CS:A (0:2,5:2)-1,75M con la menor proporción de CS mostró el menor valor de hinchamiento máximo (5,77). Aumentando el contenido de CS se incrementó el grado de hinchamiento como se ha observado en el caso de las formulaciones PAA:CS:A (0:5:2)-1,75M y PAA:CS:A (0:7,5:2)-1,75M, las cuales alcanzaron un máximo hinchamiento de 9,56 y 9,76 respectivamente. Esto podría ser atribuido al efecto sufrido por los polímeros catiónicos, como el CS, que contienen grupos aminos. Estos grupos se ionizan en ambientes de bajo pH (medio simulado gástrico), por lo tanto al aumentar la ionización se incrementan las repulsiones electrostáticas entre las cadenas poliméricas (Risbud y col., 2000; Pepas y col., 2000).

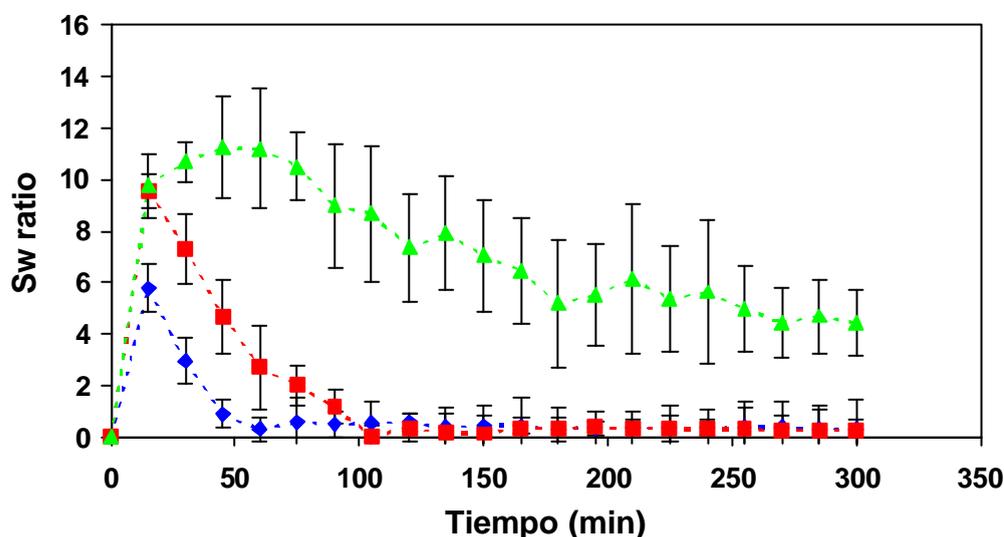


Figura 26. Cinéticas de hinchamiento y erosión de los siguientes hidrogeles liofilizados de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (0:2,5:2)-1,75M (—♦—), PAA:CS:A (0:5:2)-1,75M (—■—) y PAA:CS:A (0:7,5:2)-1,75M (—▲—).

160 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

Los hidrogeles que están constituidos por polímeros no unidos por enlaces covalentes, no son estables y por lo tanto se pueden disolver cuando las interacciones entre los polímeros se disocian. El perfil de erosión fue tenido en cuenta después de que el máximo Sw ratio fuera observado. La **figura 26** muestra el efecto del incremento de la proporción de CS en la cinética de erosión, así en una primera fase cuanto más pequeño es el contenido de CS mayor es la velocidad de erosión del hidrogel. Hay dos factores que controlan este fenómeno: el primero es la mayor cantidad de CS por unidad de superficie en el frente de erosión (Colombo y col., 1995 y Colombo y col., 1996); el segundo factor es que un aumento en la cantidad de CS aumentará la expansión de las cadenas poliméricas en el medio ácido, debido a la repulsión iónica entre los grupos aminos. La mayor cantidad de chitosán por unidad de superficie es el factor predominante una vez superada la primera fase de la erosión, observándose a partir de 120 minutos valores de hinchamiento (Sw ratios) superiores (7,36) para aquellos hidrogeles que contienen mayores proporciones de CS (PAA:CS:A (0:7,5:2)-1,75M).

En la **figura 27** se muestra la influencia de PAA en las propiedades de hinchamiento del hidrogel de CS. El grado de hinchamiento máximo alcanzó valores mucho más elevados como consecuencia de la presencia de PAA. Este incremento en estos valores fue tan grande que el complejo poliiónico PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75M con la proporción más baja de CS tuvo un máximo grado de hinchamiento equivalente al obtenido por el hidrogel PAA:CS:A (0:7,5:2)-1,75M (ver **figura 26**) el cual tenía el mayor contenido de polímero catiónico en los hidrogeles liofilizados con CS y amoxicilina trihidrato como únicos componentes. La existencia de un polímero de alto peso molecular en la formulación podría ayudar facilitando la hidratación inicial de los hidrogeles creando un gradiente osmótico (Patel y col., 1996). La presencia de PAA dentro de los hidrogeles facilitaría la protonación de los grupos aminos del CS causando una repulsión electrostática entre las cadenas poliméricas (Risbud y col., 2000; Wang y col., 1997). Los complejos poliiónicos PAA:CS:A (1:5:2)-1,75M y PAA:CS:A (1:7,5:2)-1,75M tuvieron un incremento muy acusado en el grado de hinchamiento máximo, con valores próximos a 17,75, aunque la diferencia entre ambas formulaciones no fue muy amplia. Para una misma cantidad de PAA había una relación de PAA:CS:A de 1:5:2 que presentaba la máxima repulsión electrostática y que el incremento

de CS en la formulación, PAA:CS:A (1:7,5:2)-1,75M, no ha conseguido mayores repulsiones electrostáticas y por lo tanto no ha logrado aumentar más grado de hinchamiento máximo para esta proporción fija de PAA.

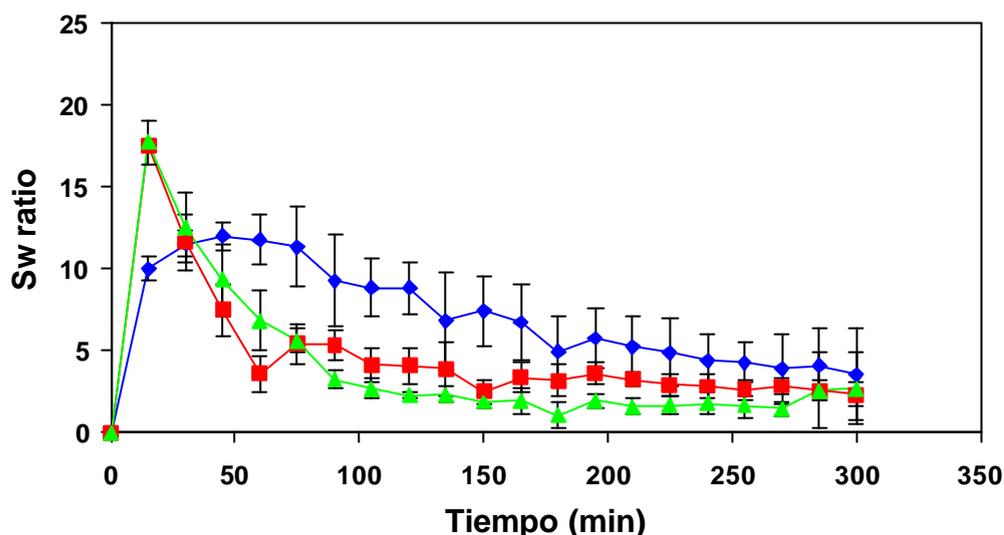


Figura 27. Cinéticas de hinchamiento y erosión de los siguientes complejos poliónicos liofilizados de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75M (-♦-), PAA:CS:A (1:5:2)-1,75M (-■-) y PAA:CS:A (1:7,5:2)-1,75M (-▲-).

En referencia a la cinética de erosión de estos hidrogeles, al aumentar la proporción de CS y la presencia de PAA (**figura 27**) los hidrogeles mostraron un comportamiento diferente del que se observa en la **figura 26**. La presencia de PAA en una relación de PAA:CS:A 1:2,5:2 retarda la velocidad y el grado de erosión. Este retraso en la velocidad de erosión se muestra por sus menores valores de pendiente. Este resultado indica que hay un grado de hinchamiento mayor seguido por una segunda fase de erosión más lenta, donde predomina la interacción entre los grupos carboxílicos del PAA y las aminas del CS frente a la repulsión electrostática de las cadenas de CS. La repulsión electrostática es menos efectiva cuando la relación PAA:CS:A es mayor, los complejos poliónicos PAA:CS:A (1:5:2)-1,75M y PAA:CS:A (1:7,5:2)-1,75M presentan una primera fase de erosión muy rápida que podría atribuirse al predominio del frente de erosión una vez alcanzada la máxima repulsión electrostática de las cadenas de CS. Shin y col. (1997) han descrito una expansión similar de las cadenas poliméricas cuando se produce un incremento de los grupos iónicos de la formulación.

162 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

También, se ha evaluado como influye en el hidrogel el empleo de un principio activo ionizado en su interior, donde se observó que éste afectaba al hinchamiento de los complejos poliónicos. Para la amoxicilina sódica el grado de hinchamiento variaba con la composición copolimérica de la estructura del hidrogel (**figura 28**). El complejo poliónico PAA:CS:A-NA (1:2,5:2)-1,75M, con la menor proporción de CS, presentaba el menor valor de hinchamiento máximo a 10,61, parecido a las formulaciones con amoxicilina trihidrato en su interior con la misma relación PAA:CS:A (12,0). Para estas relaciones de PAA:CS:A-NA el principio activo ionizado causaba pequeños ligeros cambios en la estructura de la formulación, que no eran suficientes para modificar la interacción electrostática en el interior del hidrogel. Aunque, formulaciones con cantidades crecientes de CS presentaban un mayor grado de hinchamiento que las formulaciones de amoxicilina trihidrato, por lo tanto, el complejo poliónico PAA:CS:A-NA (1:5:2)-1,75M con el principio activo en forma ionizada, presentaba un hinchamiento máximo de 27,70, valor mayor que las formulaciones con la misma relación copolimérica y con un principio activo no ionizado en su interior, que presentaban un valor máximo de 18,02.

En primer lugar se observó que las formulaciones de amoxicilina sódica presentaban menores valores de Sw ratio al final del estudio cuando se comparaban con las formulaciones con el principio activo no ionizado. Estas cinéticas de erosión presentan unas pendientes acusadas que en el caso de los hidrogeles PAA:CS:A-NA (1:5:2)-1,75M y PAA:CS:A-NA (1:7,5:2)-1,75M son muy parecidas. La gran velocidad de erosión de estos hidrogeles podría ser atribuida a una mayor expansión de las cadenas poliméricas cuando la amoxicilina en su estado ionizado era añadida a la formulación. Este efecto permite considerar que hay una interacción electrostática entre el principio activo ionizado y las cadenas poliméricas esta interacción es mas acusada en la formulación a partir de relaciones de PAA:CS:A-NA 1:5:2. La presencia de un principio activo en forma ionizada podría causar cambios en las interacciones electrostáticas dentro del hidrogel, por lo tanto se crearían estructuras porosas con una mayor expansión entre las cadenas que podrían facilitar la entrada de solvente.

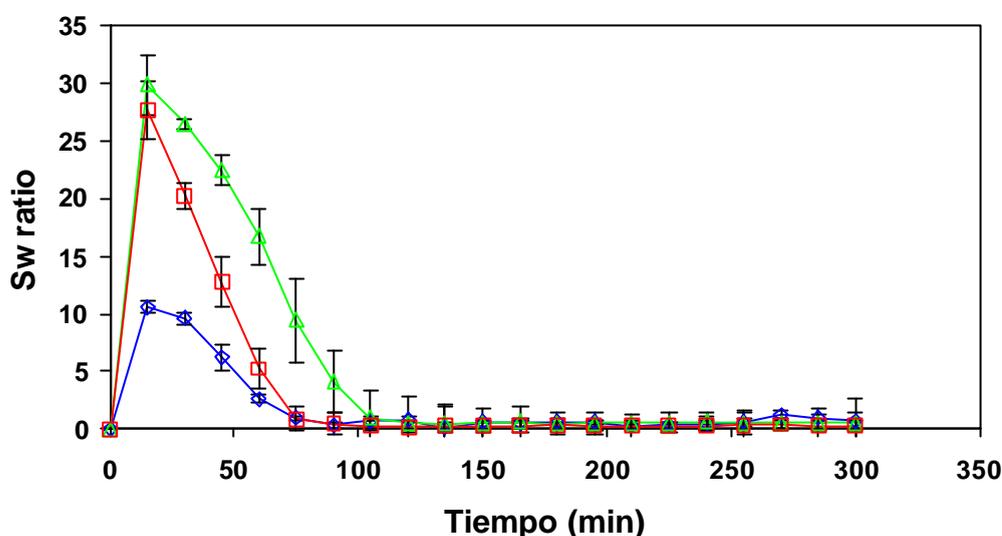


Figura 28. Cinéticas de hinchamiento y erosión de los siguientes complejos poliónicos liofilizados de amoxicilina sódica: PAA:CS:A-NA (1:2,5:2)-1,75M (- -), PAA:CS:A-NA (1:5:2)-1,75M (- -) y PAA:CS:A-NA (1:7,5:2)-1,75M (- -).

VI.4. Ensayos de velocidad de disolución.

Las **figuras 29, 30 y 31** muestran las velocidades de disolución acumulativas de diferentes formulaciones con cantidades distintas de CS y PAA. Todas las formulaciones presentaban un efecto inicial de cesión muy rápida que puede ser atribuido a la cesión de la amoxicilina adsorbida en la superficie de la matriz polimérica y a la difusión del principio activo tras el rápido hinchamiento del hidrogel (Shanta y col., 2000).

En las **figuras 29 y 30** se muestra que los hidrogeles con amoxicilina trihidrato, de CS solo o CS:PAA, con las mayores proporciones del polímero catiónico presentaban cesiones más rápidas del principio activo. La utilización de formulaciones con CS como único integrante de la matriz polimérica en administración oral, está limitado debido a su rápida disolución en medio gástrico y por su escasa capacidad para controlar la cesión del principio activo (Risbud y col., 2000). La formulación con la relación menor de PAA:CS:A (1:2,5:2)

presentaba un adecuado perfil de cesión controlada, con porcentajes del 54% y 71% de amoxicilina trihidrato después de 1 y 2 h respectivamente. Estos resultados de velocidad de disolución podrán asegurar la máxima disponibilidad del principio activo en el estómago.

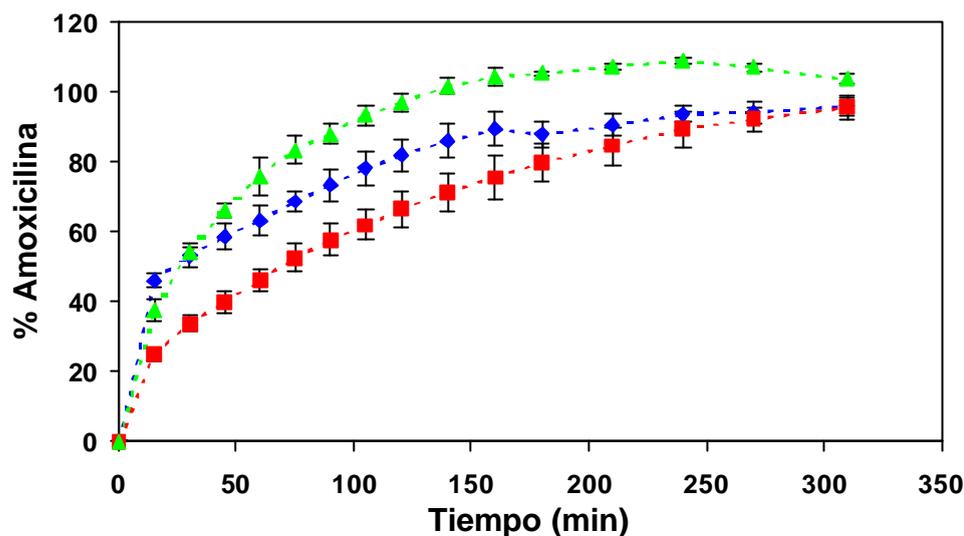


Figura 29. Perfiles de cesión en medio simulado gástrico (pH=1,2) de los siguientes hidrogeles liofilizados de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (0:2,5:2)-1,75M (---♦---), PAA:CS:A (0:5:2)-1,75M (---■---) y PAA:CS:A (0:7,5:2)-1,75M (---▲---).

El uso de hidrogeles con distintos principios activos en medio gástrico ha sido estudiado por varios autores. Nobel y col. (1999), prepararon hidrogeles unidos por enlaces no covalentes por medio de una técnica de liofilización. La cesión de amoxicilina de hidrogeles constituidos por CS y con uniones covalentes fue estudiada por Patel y col. (1996), y Risbud y col. (2000), donde la cesión fue del 65% en las dos primeras horas en matrices poliméricas liofilizadas constituidas por CS y poli (etilen óxido) (Patel y col., 1996) y de un 51% después de 3 h en matrices poliméricas liofilizadas constituidas por CS y polivinil pirrolidona (Risbud y col., 2000). La explicación de este fenómeno puede estar basada en varios factores, los cuales incluyen: la velocidad de erosión y la presencia de poros irregulares de diferentes tamaños, observados por SEM en diferentes formulaciones, que podrían explicar la cesión tan rápida de estos hidrogeles. Por lo tanto, solo el complejo poliónico PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75M, de los hidrogeles que contienen amoxicilina trihidrato, presenta poros regulares que

podrían permitir un mayor control de la velocidad de disolución. El hinchamiento rápido y la cesión que presentaba PAA:CS:A-NA (1:2,5:2)-1,75M podrían ser beneficiosos para una administración localizada del antibiótico en el estómago, debido a las limitaciones del vaciamiento gástrico.

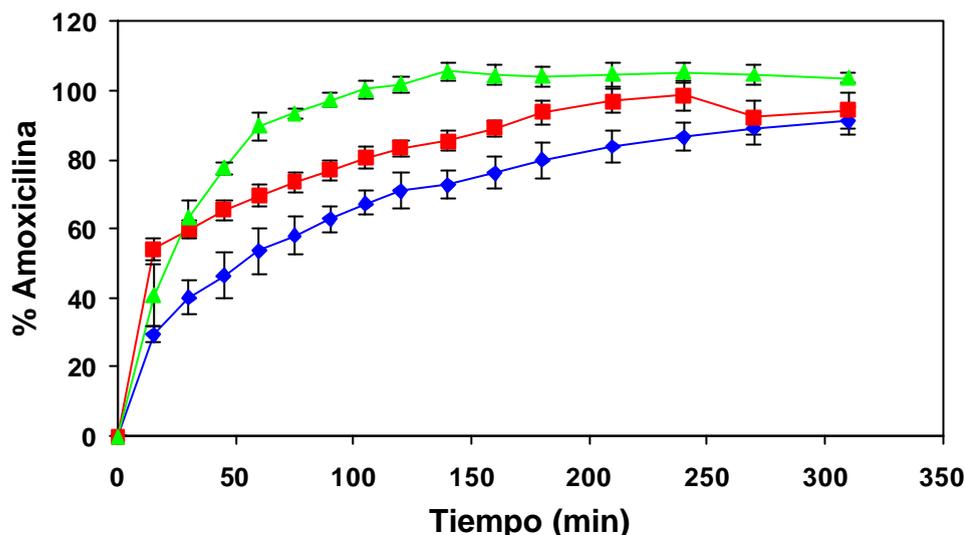


Figura 30. Perfiles de cesión en medio simulado gástrico ($\text{pH}=1,2$) de los siguientes complejos poliméricos liofilizados de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75M (\blacklozenge), PAA:CS:A (1:5:2)-1,75M (\blacksquare) y PAA:CS:A (1:7,5:2)-1,75M (\blacktriangle).

La **tabla 19** muestra que los hidrogeles que contienen amoxicilina trihidrato presentan una cesión que no se ajusta a la ecuación de Fickian, mostrando un rango de valores de n entre 0,32 y 0,48. En estos hidrogeles los parámetros cinéticos indican que la cesión de la amoxicilina no ionizada (trihidrato) estuvo controlada por una combinación de los fenómenos de difusión/ disolución del complejo interpolimérico.

Tabla 19. % Inicial cedido, exponente de cesión (*n*), constante cinética (*K*) y coeficiente de determinación (*r*²) obtenidos al ajustar a la ecuación de Pepas (Anh y col., 2002) porcentajes de amoxicilina trihidrato cedidos a distintos tiempos desde distintos hidrogeles liofilizados.

CS:PAA:A	Cesión inicial(%)	<i>n</i>	<i>K</i>	<i>r</i> ²
2.5:0:2	46.02	0.32	1.75	0.9925
5:0:2	24.78	0.48	2.71	0.9983
7.5:0:2	37.50	0.43	2.09	0.9854
2.5:1:2	29.31	0.42	2.37	0.9992
5:1:2	54.06	---	---	---
7.5:1:2	37.50	0.43	2.09	0.9854

Las velocidades de disolución acumulativas de diferentes formulaciones de amoxicilina sódica son mostradas en la **figura 31**. El complejo polliónico PAA:CS:A-NA (1:2,5:2)-1,75M ha demostrado poseer un perfil de cesión ligeramente mayor a la de la formulación con amoxicilina trihidrato con la misma relación de PAA:CS:A. Para relaciones de PAA:CS:A-NA (1:5:2)-1,75M y PAA:CS:A-NA (1:7,5:2)-1,75M la cesión de la amoxicilina sódica era más lenta, y así, en las dos primeras horas los porcentajes de cesión fueron para estos dos hidrogeles del 61,19% y de un 54,28%, respectivamente. El que exista dos comportamientos diferentes posiblemente se deba a las diferencias observadas en la estructura del hidrogel. Así, el complejo polliónico PAA:CS:A-NA (1:2,5:2)-1,75M presenta una alta porosidad combinada con los valores de hinchamiento máximo más bajos de todas las formulaciones con amoxicilina sódica, estas propiedades pueden ser debidas a que la amoxicilina sódica compite con el PAA por las uniones del CS produciendo una menor interacción entre las cadenas poliméricas, favoreciendo la difusión de la amoxicilina dentro del hidrogel. Cuando la relación de CS aumenta en la formulación todos los grupos carboxílicos tanto del PAA como de la amoxicilina van a poder unirse a los grupos catiónicos del CS, produciendo un entramado causado por las interacciones entre las cadenas de ambos polímeros. Esta forma ionizada de amoxicilina se fijará dentro del entramado mediante uniones electrostáticas. Estas uniones producen una difusión más lenta de la amoxicilina sódica en estos hidrogeles que presentan mayores proporciones de CS (PAA:CS:A-NA (1:5:2)-1,75M y PAA:CS:A-NA (1:7,5:2)-1,75M). Estos resultados coinciden con los de Bettini y col. (1995) en los que se indica que la difusión de principios activos ionizados en hidrogeles polliónicos está

controlada por la velocidad de hinchamiento y por la interacción entre los distintos polímeros y el principio activo.

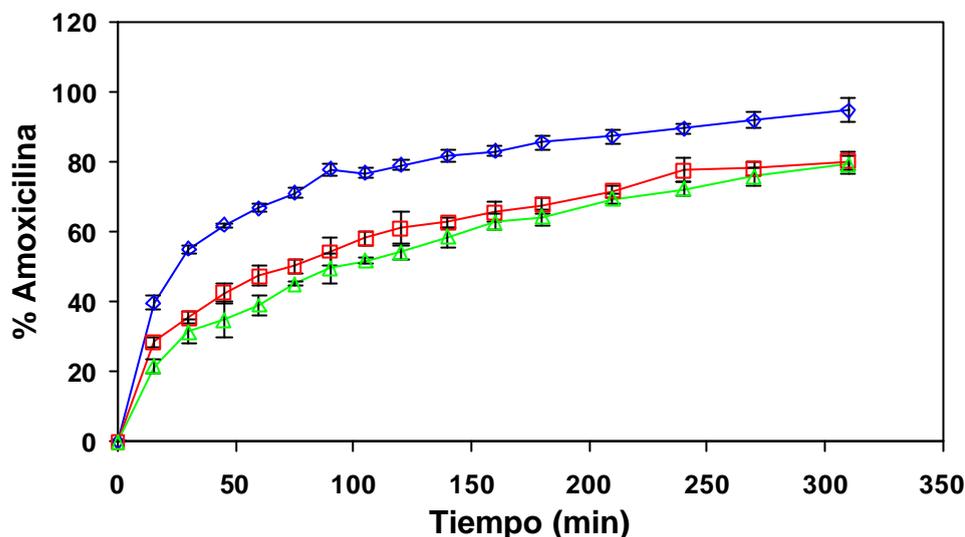


Figura 31. Perfiles de cesión en medio simulado gástrico (pH=1,2) de los siguientes complejos poliónicos liofilizados de amoxicilina sódica: PAA:CS:A-NA (1:2,5:2)-1,75M (- -), PAA:CS:A-NA (1:5:2)-1,75M (- -) y PAA:CS:A-NA (1:7,5:2)-1,75M (- -).

Estos hidrogeles se ajustan adecuadamente a una cesión no fickiana, con un menor porcentaje inicial cedido (ver **tabla 20**). Similares cesiones no fickianas fueron obtenidas por Ahn J.S. y col. (2002) en estudios de velocidad de disolución de triamcinolona acetónido desde películas poliméricas de quitosán y ácido poliacrílico. Por lo tanto, la amoxicilina sódica se encontraba atrapada dentro de la estructura polimérica, mostrando un coeficiente de difusión dentro del hidrogel hinchado más bajo que el principio activo menos soluble en agua, esto puede ser debido a la existencia de interacciones entre la amoxicilina sódica y las cadenas poliméricas del hidrogel. Otros autores confirmaron que la difusión de principios activos ionizados está controlada por la entrada de agua dentro de la matriz polimérica (Gupta K.C y col., 2000).

Tabla 20. % Inicial cedido, exponente de cesión (*n*), constante cinética (*K*) y coeficiente de determinación (*r*²) obtenidos al ajustar a la ecuación de Pepas (Anh y col., 2002) porcentajes de amoxicilina sódica cedidos a distintos tiempos desde distintos hidrogeles liofilizados.

CS:PAA:A-NA	Initial Burst (%)	n	K	r ²
2.5:1:2	39.78	---	---	---
5:1:2	28.54	0.35	2.20	0.9961
7.5:1:2	21.56	0.43	2.66	0.9955

VI.5. Discusión parcial.

Diferentes perfiles de cesión pueden ser modificados por el grado de ionización del principio activo. Con principios activos no ionizados, como la amoxicilina trihidrato, las interacciones electrostáticas polímero/ polímero tiene lugar entre los grupos catiónicos del quitosán y los aniónicos del PAA, y el principio activo está atrapado dentro de los espacios de la malla que forma el hidrogel. La cesión de amoxicilina no ionizada fue controlada por el grado de hinchamiento/ erosión de la matriz polimérica. Por el contrario, en principios activos ionizados, como la amoxicilina sódica, la velocidad de disolución fue controlada por la entrada de agua a la matriz polimérica, y la difusión de la amoxicilina fue retrasada como consecuencia de los cambios que se produjeron en la estructura interpolimérica.

Basándonos en los resultados de hinchamiento/ erosión y cesión, se ha demostrado que es posible obtener complejos poliónicos electrostáticos por medio de un proceso de liofilización, que presentan unos adecuados perfiles de cesión de la amoxicilina para la administración local específica en el estómago.

VI. 6. Bibliografía.

- Ahn J.S.; Choi H.K.; Cho C.S. Chun M; Ryu J.; Jung J.; Kim Y. And Cho CS. Release of triamcinolone acetonide from mucoadhesive polymer composed of chitosan and poly(acrylic acid) *in vitro*. *Biomaterials* 23:1411-1416 (2002).
- Bettini R., Colombo P., Peppas N. A. Solubility effects on drug transport through pH-sensitive, swelling-controlled release systems: transport of theophylline and metoclopramide monohydrochloride. *J. Control. Release*, 37: 105-111 (1995).
- Colombo P., Bettini R., Massimo G., Catellani P. L., Santi P., Peppas N. A., Drug diffusion front movement is important in drug release control from swellable matrix tablets. *J. Pharm. Sci.* 84:991-997 (1995).
- Colombo P., Bettini R., Santi P., De Ascentiis A., Peppas N. A. Analysis of the swelling and release mechanisms from drug delivery systems with emphasis on drug solubility and water transport. *J. Control. Release*. 39: 231-237 (1996).
- Gupta K.C., Ravi Kumar M.N.V. Drug release behavior of beads and microgranules of chitosan. *Biomaterials*. 1115-1119 (2000).
- Noble L., Gray A. I., Sadiq L. and Uchegbu I. F. A non-covalently cross-linked chitosan based hydrogel. *Int. J. of Pharmaceutics* 192: 173-182 (1999).
- Patel V. R., and Amiji M. M. Preparation and characterization of freeze-dried chitosan-poly (ethylene oxide) hydrogels for site-specific antibiotic delivery in the stomach. *Pharmaceutical Research* 13: 588-593 (1996).

170 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

- Peppas N.A., Bures P., Leobandung W. Y Ichikawa H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50: 27-46 (2000).
- Risbud M. V., Hardikar A. A., Bhat S. V. and Bhonde R. R. pH-sensitive freeze-dried chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogels as controlled release systems for antibiotic delivery. *J. Control. Release* 68: 23-30 (2000).
- Shanta K. L., Harding D. R. K. Preparation and in-vitro evaluation of poly [N-vinyl-2-pyrrolidone-polyethylene glycol diacrylate]-chitosan interpolymeric pH-responsive hydrogels for oral drug delivery. *Int. J. Pharmaceutics*. 207: 65-70 (2000).
- Shin H. S., Kim S. Y., Lee Y. M. Indomethacin release behaviours from pH and thermoresponsive poly (vinyl alcohol) and poly (acrylic acid) IPN hydrogels for site-specific drug delivery. *J. Appl. Polym. Sci.* 65: 685-693 (1997).
- Wang H.; Li W.; Lu Y. and Wang Z. Studies on chitosan and poly (acrylic acid) interpolymer complexes. I. Preparation, structure, pH-sensitivity and salt sensitivity of complex-forming poly (acrylic acid): chitosan semiinterpenetrating polymer network. *J. Appl. Polym. Sci.* 65: 1445-1450 (1997).

CAPÍTULO VII: INFLUENCIA DE LA PROPORCIÓN DE ÁCIDO POLIACRÍLICO, DE LA FUERZA IÓNICA Y DEL VOLUMEN DEL MEDIO FORMADOR DEL HIDROGEL EN LOS COMPLEJOS POLIIÓNICOS.

En este capítulo se han estudiado formulaciones de hidrogeles que consisten en complejos poliónicos formados por distintas relaciones de Carbopol® 974P NF (PAA) y chitosán (CS), unidos por enlaces no covalentes. Se ha investigado como los diferentes cambios electrostáticos entre ambas cadenas poliméricas, las fuerzas iónicas y los distintos volúmenes empleados en la preparación de los distintos complejos poliónicos han afectado la velocidad de disolución del principio activo en medio simulado gástrico (HCl 0,1 N).

Todas las formulaciones contienen una proporción constante de 2 partes de amoxicilina trihidrato (A). Se han estudiado las siguientes relaciones de CS:PAA:A:

- Las relaciones de PAA:CS:A-1,75M de los hidrogeles liofilizados de amoxicilina trihidrato con la menor cantidad de chitosán fueron las siguientes: (0:2.5:2)-1,75M, (1:2.5:2)-1,75M, (2.5:2.5:2)-1,75M y (5:2.5:2)-1,75M. Los hidrogeles con la mayor proporción de CS presentaban las siguientes relaciones: (0:5:2)-1,75M, (1:5:2)-1,75M, (2.5:5:2)-1,75M y (5:5:2)-1,75M.
- En el estudio del efecto de la fuerza iónica del medio formador del hidrogel, se han empleado tres diferentes molaridades de ácido acético: 1,75, 3,50, y 5,25 M. Los complejos poliónicos obtenidos con diferentes concentraciones de ácido acético fueron los siguientes: PAA:CS:A (1:2.5:2)-1.75M, PAA:CS:A (1:5:2)-1.75M, PAA:CS:A (2.5:5:2)-1.75M, PAA:CS:A (1:2.5:2)-3.50M, PAA:CS:A (1:5:2)-3.50M, PAA:CS:A (2.5:5:2)-3.50M, PAA:CS:A (1:2.5:2)-5.25M, PAA:CS:A (1:5:2)-5.25M y PAA:CS:A (2.5:5:2)-5.25M.

174 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

- En el estudio del efecto del incremento o disminución del medio formador del hidrogel, se han empleado tres diferentes volúmenes: 26,66, 40 y 53,32 ml. Los complejos poliiónicos obtenidos fueron los siguientes: PAA:CS:A (1:5:2)-1.75M-26,66ml, PAA:CS:A (1:5:2)-1.75M-40ml, PAA:CS:A (1:5:2)-1.75M-53,32 ml, PAA:CS:A (1:5:2)-5.25M-26,66 ml, PAA:CS:A (1:5:2)-5.25M-40 ml y PAA:CS:A (1:5:2)-5.25M-53,32 ml.

VII.1. Estudio de la influencia del incremento del contenido en PAA en la estructura y comportamiento de hidrogeles basados en chitosán.

La caracterización de los distintos hidrogeles se ha realizado mediante estudios de microscopía electrónica de barrido, espectroscopia infrarroja, estudios de hinchamiento y de velocidad de disolución de los complejos poliiónicos en medio simulado gástrico (HCl 0,1 N).

VII.1.1. Caracterización física por medio de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

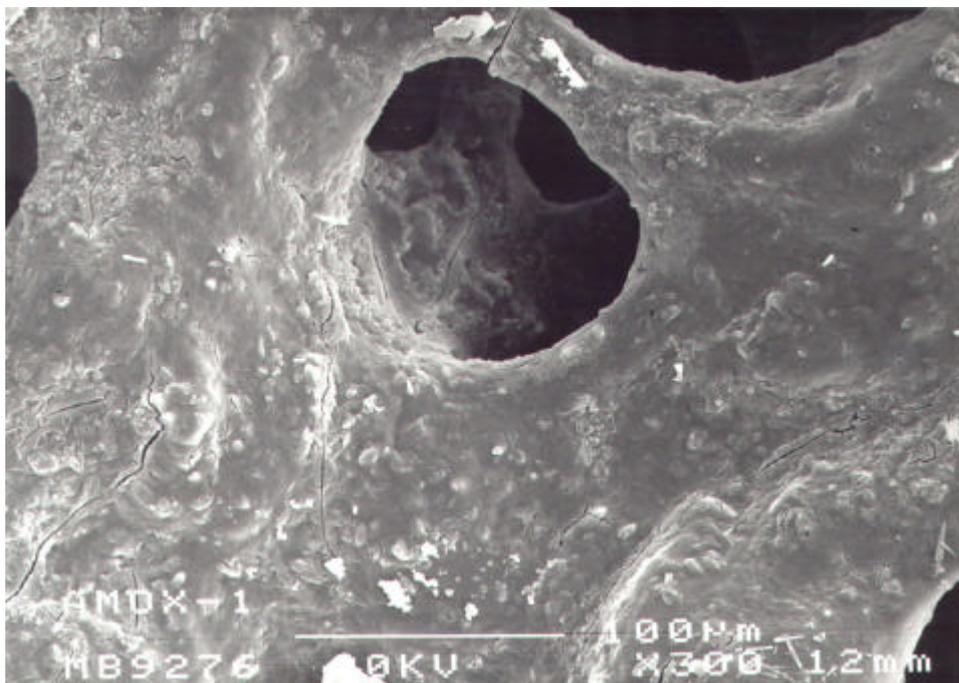
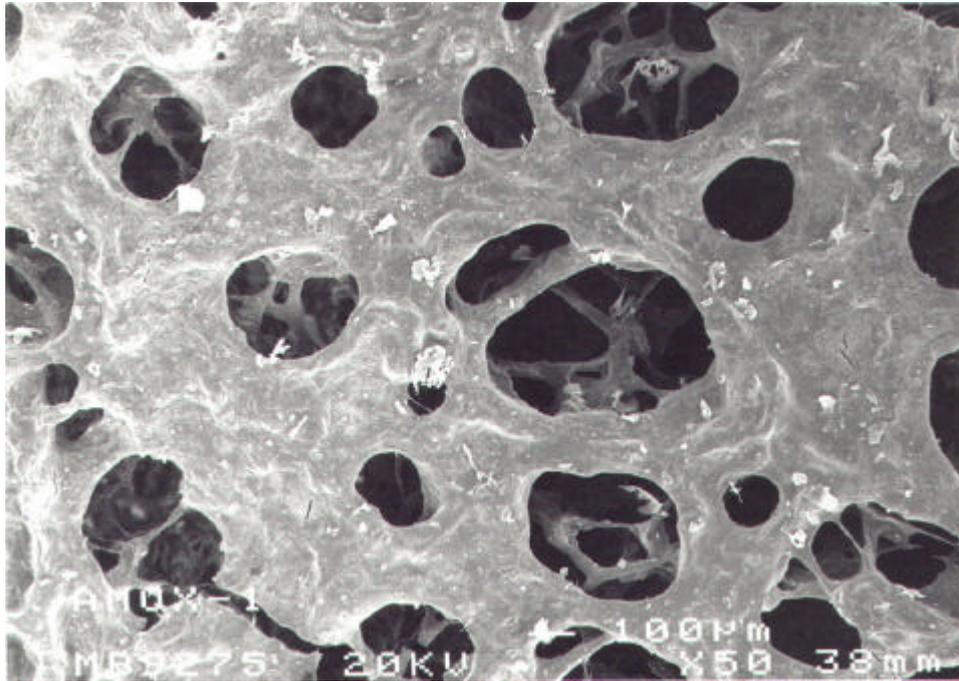
En las **microfotografías 15-18** se muestran hidrogeles liofilizados con distintas relaciones de PAA y de CS. La **microfotografía 7** (ver **capítulo VI**) muestra la superficie de un hidrogel liofilizado a mayores aumentos (X300), que contiene solo CS y amoxicilina trihidrato, (PAA:CS:A 0:5:2), estos hidrogeles se caracterizan por presentar una superficie laminar en forma de escamas sin poros. Sin embargo, cuando se incorpora PAA al hidrogel estas formulaciones cambian presentando una estructura porosa, apreciándose en su superficie la formación de una estructura reticular característica en su superficie la cual se podría atribuir a la interacción electrostática entre los grupos aniónicos del PAA y los grupos catiónicos del CS. En la **microfotografía 15.a** se observa la formación de una lámina lisa como resultado de esta interacción, con poros en toda la estructura de tamaño superior a

250 μm . Al incrementar los aumentos (ver **microfotografía 15.b**) se aprecia en detalle la superficie lisa y uno de estos poros característicos. Este gran tamaño de poro influirá en la rápida hidratación del hidrogel, aunque el tamaño de poro efectivo del complejo poliiónico en el estado hinchado podría depender también de sus propiedades hidrodinámicas, causadas por las interacciones electrostáticas de las distintas cadenas en el entramado polimérico (Gabriellii y col., 1998; Dumitriu y col., 1998). En el corte transversal X50 (**microfotografía 15.c**) se observa una estructura fibrilar que atribuimos al PAA por su mayor peso molecular que une las distintas estructuras laminares formando una reticulación inicial característica. En la **microfotografía 16** se observa como cambia la estructura al aumentar la proporción de PAA en la formulación PAA:CS:A (5:2,5:2)-1,75M. Así, la **microfotografía 16.a** X50 aumentos muestra una superficie con poros de menor tamaño (50-80 μm) y en la que ya se aprecia la estructura fibrilar de parte de las cadenas de PAA. Una mayor cantidad de aumentos (**microfotografía 16.b** X300) confirma la existencia de estas estructuras de PAA dentro de una estructura laminar más compacta. Esto podría explicarse por la presencia de una mayor cantidad de ambos polímeros para un volumen constante de hidrogel.

Por otra parte en las **microfotografías 17 y 18** se estudia la forma que presentan los hidrogeles con una mayor proporción de CS. En la **microfotografía 17** se muestra la superficie y corte transversal de un hidrogel de PAA:CS:A (2,5:5:2)-1,75M. La **microfotografía 17.a** X50 aumentos muestra una superficie laminar lisa con un menor número de poros que podría ser atribuido a la mayor proporción de CS en la formulación. La presencia de PAA en el hidrogel produce una estructura fibrilar más marcada que podría ser atribuida a la proporción de PAA:CS empleada en el hidrogel. La **microfotografía 17.b** muestra una estructura fibrilar y una mayor densidad de la estructura laminar, apreciándose poros de pequeño tamaño en el interior de esta estructura laminar. El corte transversal X300 aumentos (**microfotografía 17.c**) muestra como la mayor proporción de CS en el hidrogel hace que la morfología de las estructuras laminares recuerde la forma característica del CS. Por último en la **microfotografía 18** se muestra un alto porcentaje de ambos polímeros PAA:CS:A (5:5:2)-1,75M, observándose en la **microfotografía 18.a** X50 aumentos una estructura laminar más densa donde es más difícil apreciar la estructura fibrilar del PAA posiblemente debido a la existencia de una mayor interacción entre los grupos aniónicos del PASA y los catiónicos del CS, la cual provoca una estructura laminar más compacta donde

176 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

se aprecian poros de pequeño tamaño. Al ampliar los aumentos X300 (**microfotografía 18.b**) observamos como la mayor relación de ambos polímeros hace que las estructuras laminares se fundan en una estructura más densa, donde se aprecia que los poros sólo afectan a una lámina sin pasar hacia el interior de la estructura. La **microfotografía 18.c** muestra en un corte transversal X300 aumentos una estructura mucho más compacta con poros interconectados, pero que no llega a penetrar en el interior de esta estructura laminar compacta.

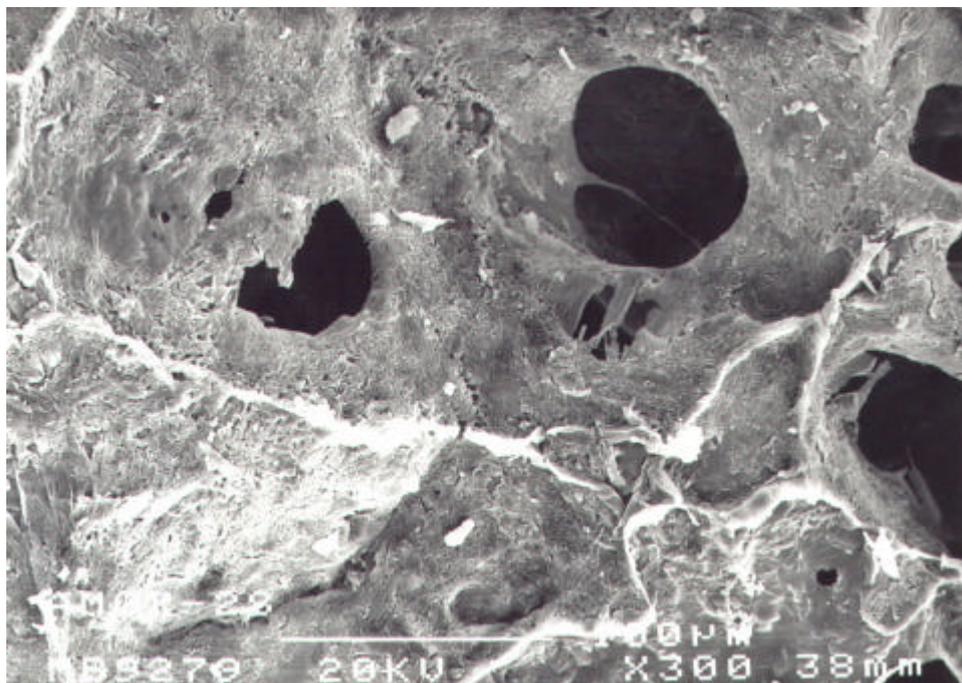
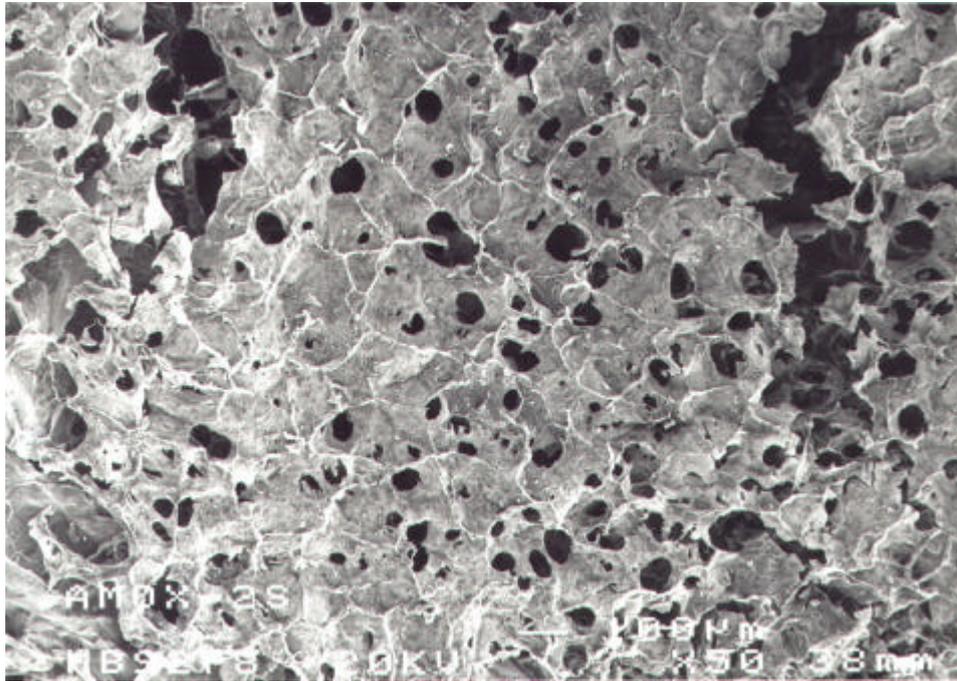


Microfotografía 15. Superficie del complejo poliiónico de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (2,5:2,5:2)-1,75M, 50 (15.a) y 300 aumentos (15.b).

178 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

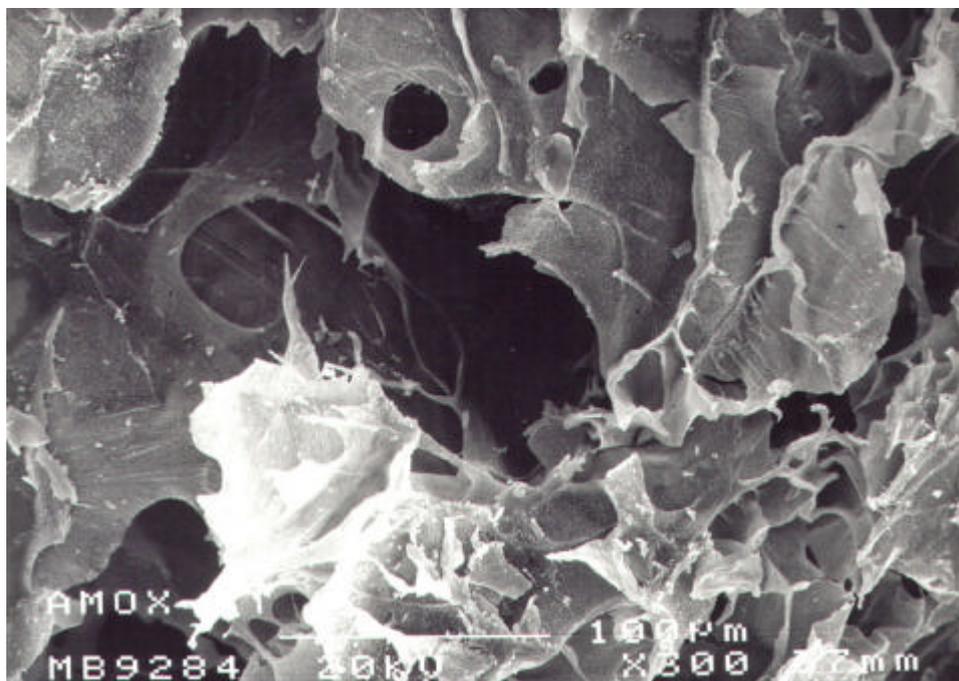
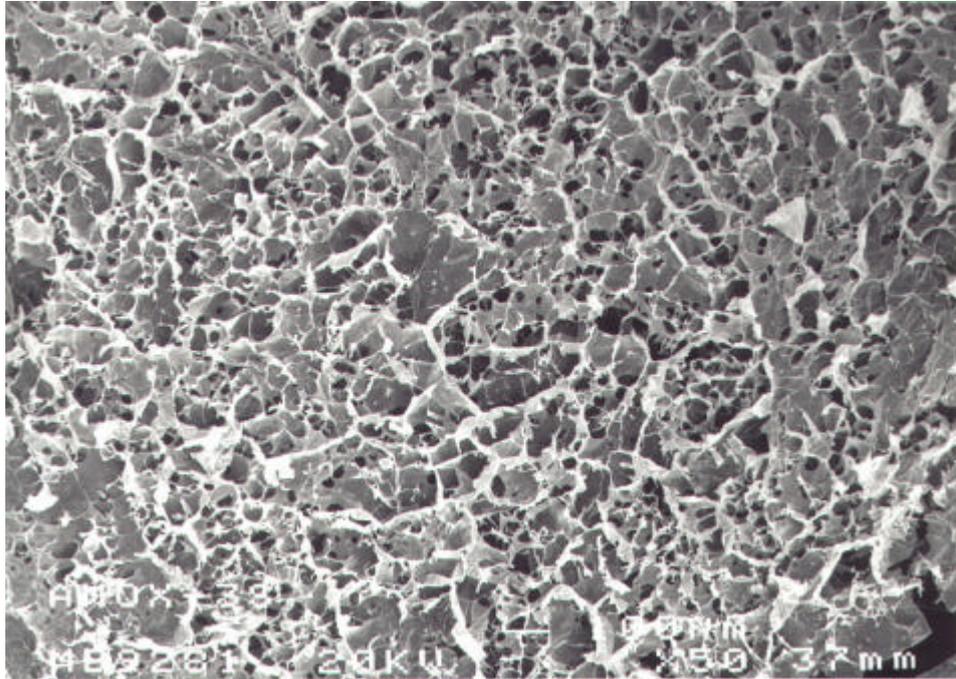


Microfotografía 15.c. Corte transversal del complejo poliiónico de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (2,5:2,5:2)-1,75M, 300 aumentos.

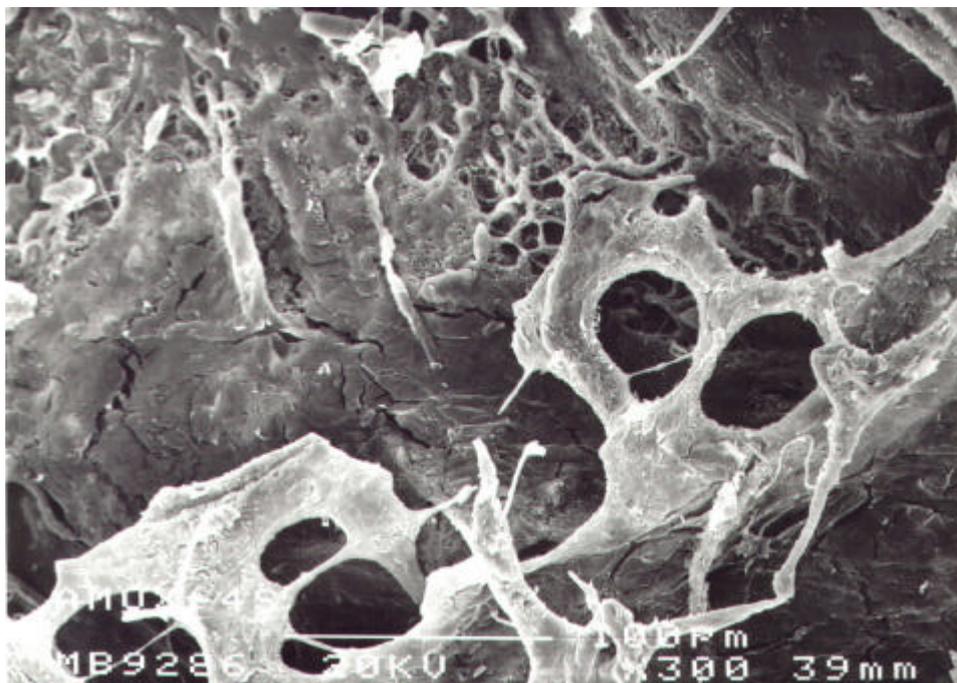
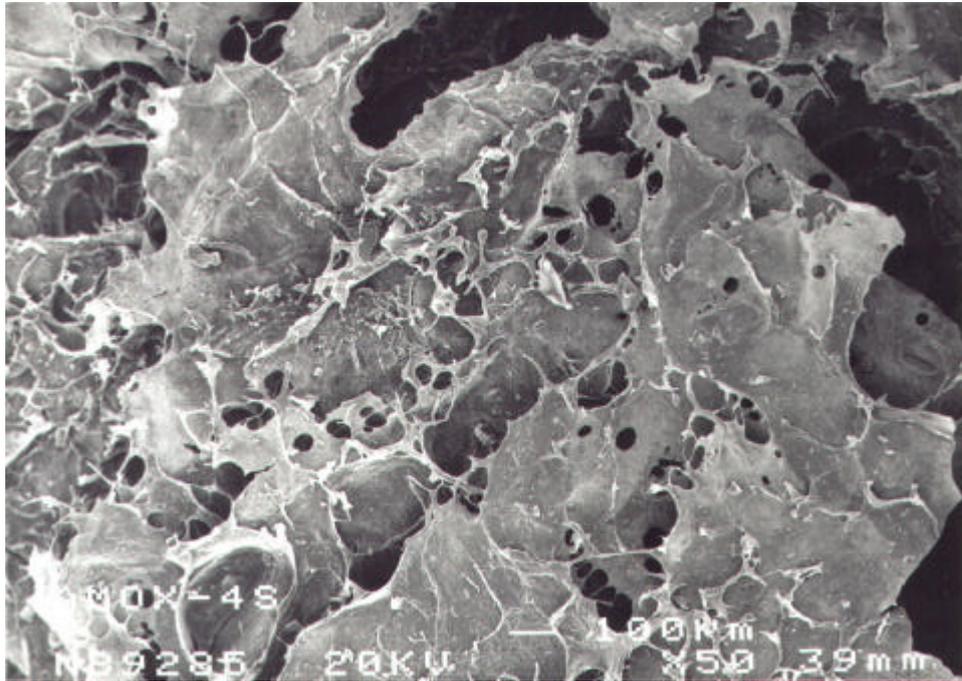


Microfotografía 16. Superficie del complejo poliiónico de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (5:2,5:2)-1,75M, 50 (16.a) y 300 aumentos (16.b).

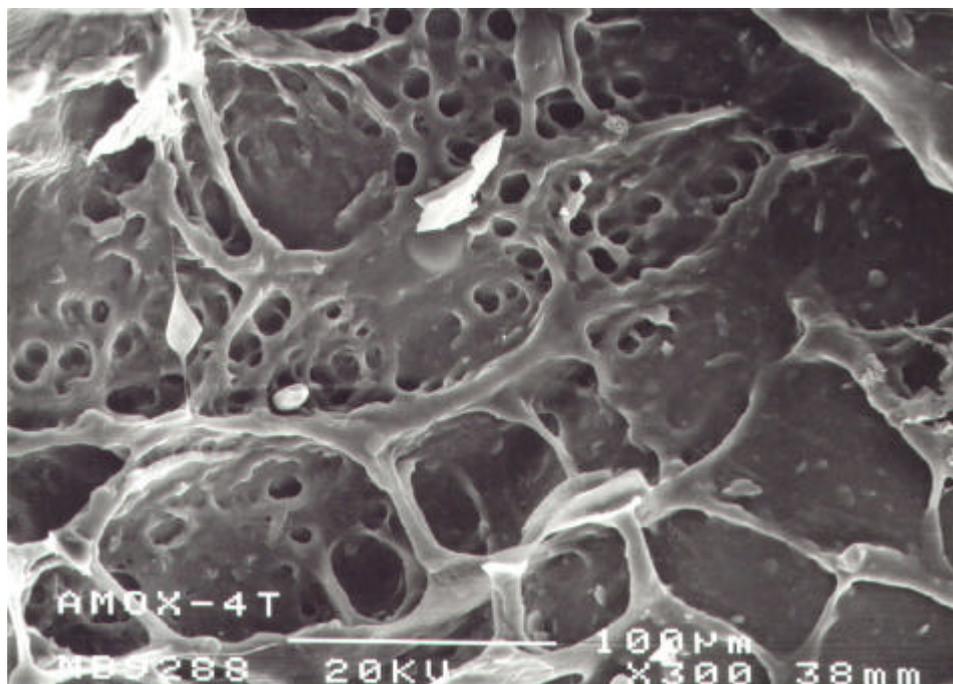
180 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*



Microfotografía 17. Superficie del complejo poliiónico de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (2,5:5:2)-1,75M, 50 (17.a), y corte transversal del complejo poliiónico 300 aumentos (17.b).



Microfotografía 18. Superficie del complejo poliiónico de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (5:5:2)-1,75M, 50 (18.a) y 300 aumentos (18.b).



Microfotografía 18.c. Corte transversal del complejo poliónicos de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (5:5:2)-1,75M 300aumentos.

VII.1.2. Estudios de hinchamiento, erosión y velocidad de disolución.

En la **figura 32** se estudia la influencia de distintos ratios de PAA para una misma cantidad de CS (2,5). Los hidrogeles liofilizados sin PAA (PAA:CS:A 0:2,5:2) presentaron el grado de hinchamiento máximo menor de 5,78 en los primeros 15 minutos. Al incorporar PAA a estos complejos poliónicos se alcanzaron mayores valores de hinchamiento (desde 9,85 a 10,04). Además el tiempo para alcanzar un hinchamiento máximo aumenta en la formulación al disminuir la proporción de PAA, presentando tiempos de hinchamiento máximo de hasta 45 minutos para la formulación PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75M. Posiblemente, la naturaleza porosa de los estos complejos poliónicos puede ser la responsable de este fenómeno por ofrecer una mayor interacción entre la matriz polimérica y el medio,

permitiendo una veloz entrada de solvente y consiguiendo un hinchamiento más rápido (ver esquemas 1.A y 1.B).

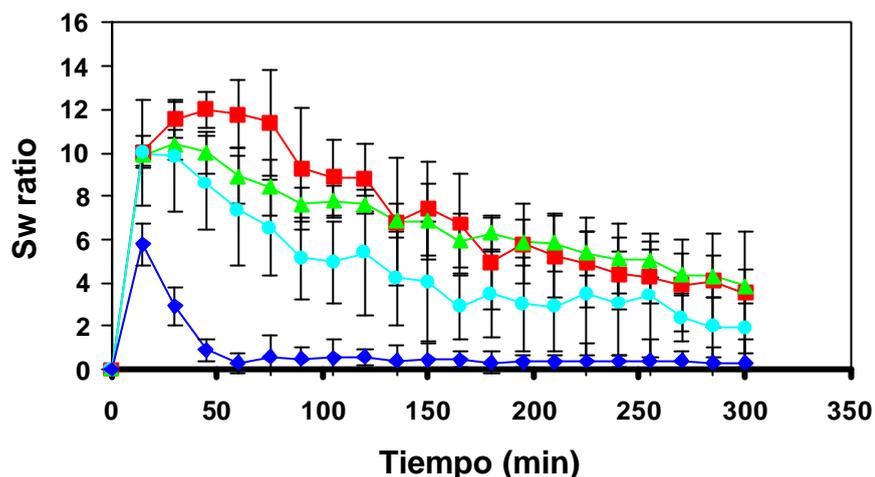
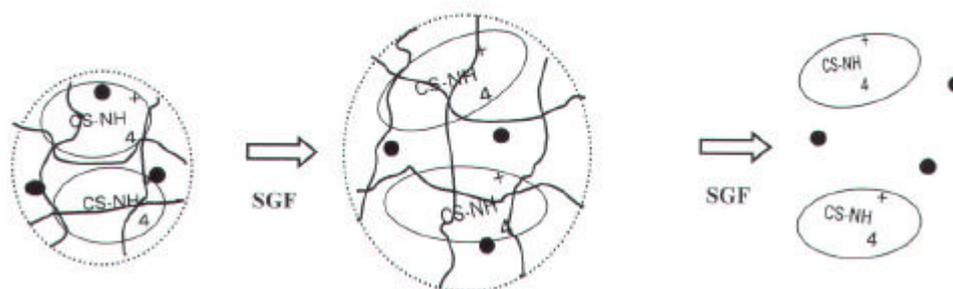


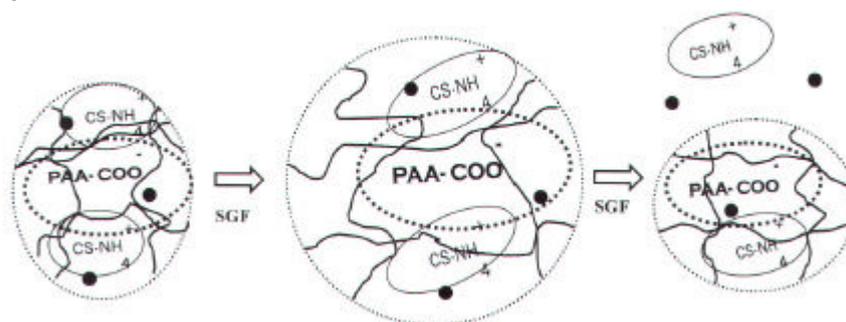
Figura 32. Cinéticas de hinchamiento y erosión de los siguientes complejos poliónicos liofilizados de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (0:2,5:2)-1,75M (-♦-), PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75M (-■-), PAA:CS:A (2,5:2,5:2)-1,75M (-▲-) y PAA:CS:A (5:2,5:2)-1,75M (-●-).

Estos hidrogeles que están constituidos por polímeros unidos por enlaces no covalentes, son biodegradables y por lo tanto se pueden disolver cuando las interacciones entre los polímeros se disocian. El perfil de erosión fue tenido en cuenta después de que se alcanzase el hinchamiento máximo. La erosión es más lenta en los hidrogeles que incorporan PAA (ver **figura 32**). Aunque en los complejos poliónicos con PAA, la presencia de altas proporciones de este polímero, como en el complejo poliónico PAA:CS:A (5:2,5:2)-1,75M, produce una mayor velocidad de erosión. Posiblemente, la presencia de mayores cantidades de PAA dentro del complejo produce una estructura, donde es fácil obtener una ruptura del entramado interpolimérico, debido a un aumento en la separación entre las cadenas poliméricas.

Esquema 1.A



Esquema 1.B



Esquema 1. Diagramas esquemáticos de hinchamiento/ erosión de los siguientes complejos poliiónicos: PAA:CS:A (0:2,5:2)-1,75M (**esquema 1.A**) y PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75M (**esquema 1.B**). Los puntos negros () representan los iones del medio formador del hidrogel.

La **figura 33** muestra los perfiles de disolución de estos hidrogeles. La formulación con la cantidad más baja de ambos polímeros, PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75M, presentó unos porcentajes cedidos de amoxicilina de 53,55% y 70,98% a la hora y dos horas respectivamente, estos resultados permiten un adecuado perfil de cesión en el estómago (Patel y col., 1996 y Risbud y col., 2000). Similares perfiles de cesión de amoxicilina (65% disuelto en las primeras dos horas) fueron obtenidos por Patel y col., 1996 en hidrogeles liofilizados de CS-óxido de polietileno. La razón de estos perfiles de disolución se basa en una gran cantidad de factores, los cuales incluyen: la velocidad de erosión y la presencia de diferentes estructuras con poros de distintos tamaños, observados por microscopía electrónica, que podrían explicar la cesión sostenida desde estos hidrogeles. Así el hidrogel PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75M a diferencia del resto de hidrogeles presenta una superficie regular porosa, que permite un mayor control de su cesión. Los perfiles de cesión de esta

formulación son menores que las muestras que incorporan proporciones más elevadas de PAA en el hidrogel (PAA:CS:A (2,5:2,5:2)-1,75M y (5:2,5:2)-1,75M). En cambio la formulación sin PAA (PAA:CS:A (0:2,5:2)-1,75M) presenta un perfil de cesión ligeramente más rápido: 63,23% y 82,02% a la hora y dos horas respectivamente. Posiblemente la mayor interacción electrostática en el interior de la estructura polimérica permite un mayor control de la cesión (Peniche y col., 1998, Wang y col., 1997, y Munjeri y col., 1998). Al aumentar el contenido de PAA en el complejo interpolimérico se consiguieron cesiones de amoxicilina más rápidas, por lo tanto, los complejos poliiónicos con la más alta proporción de PAA:CS:A (5:2,5:2)-1,75M alcanzaron un 94,54% de amoxicilina cedida en los primeros 15 minutos. Esto puede ser atribuido a que el PAA presenta una mayor cantidad de grupos carboxílicos libres que producen una mayor expansión de sus cadenas poliméricas, incrementando la velocidad de movimiento del frente de erosión. Shin y col. (1997) han descrito que cuando había un incremento de grupos iónicos en la formulación se obtenía una similar expansión de las cadenas poliméricas.

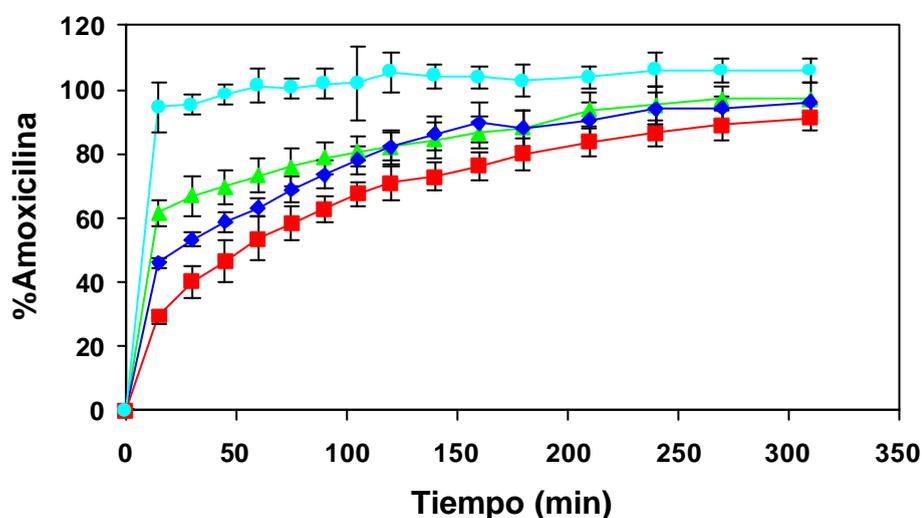


Figura 33. Perfiles de cesión en medio simulado gástrico (pH=1,2) de los siguientes complejos poliiónicos liofilizados de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (0:2,5:2)-1,75M (-♦-), PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75M (-■-), PAA:CS:A (2,5:2,5:2)-1,75M (-▲-) y PAA:CS:A (5:2,5:2)-1,75M (-●-).

Para investigar con mayor precisión el efecto de la formación del complejo interpolimérico en la cesión de amoxicilina, los resultado de velocidad de disolución fueron

analizados de acuerdo con la ecuación de Peppas (Ahn y col., 2002). En todos los casos los valores de n fueron menores de 0,5 (ver **tabla 21**). Estos comportamientos no fickianos podrían sugerir que la cesión de amoxicilina desde los hidrogeles PAA:CS:A (0:2,5:2)-1,75M y PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75M fue controlada por una combinación entre la difusión de la amoxicilina y el hinchamiento-disolución de los complejos poliónicos. Sin embargo, los hidrogeles: PAA:CS:A (2,5:2,5:2)-1,75M y PAA:CS:A (5:2,5:2)-1,75M presentan una cesión inicial muy alta que dificulta su ajuste a este tipo de ecuaciones.

Tabla 21. % Inicial cedido, exponente de cesión (n), constante cinética (K) y coeficiente de determinación (r^2) obtenidos al ajustar a la ecuación de Pepas (Ahn y col., 2002) porcentajes de amoxicilina trihidrato cedidos a distintos tiempos desde distintos hidrogeles liofilizados.

CS:PAA:A	Cesión inicial(%)	n	K	r^2
(0:2.5:2)-1.75M	46.03%	0.32	0.17	0.9925
(1:2.5:2)-1.75M	29.32%	0.42	0.09	0.9992
(2.5:2.5:2)-1.75M	61.51%	0.16	0.38	0.9945
(5:2.5:2)-1.75M	94.54%	---	---	---

La **figura 34** muestra el grado de hinchamiento de diferentes hidrogeles con PAA para una mayor cantidad de CS (5,0). La presencia de una mayor cantidad de CS en el hidrogel producen un aumento del hinchamiento máximo cuando se compara con las formulaciones que presentan una cantidad baja de CS (ver **figura 32**). Esto podría ser atribuido al efecto de los materiales catiónicos, como el CS, que contienen grupos funcionales, como las aminas. Estos grupos se ionizan en ambientes de bajo pH (fluido simulado gástrico), incrementando su ionización y causando un aumento en las repulsiones electrostáticas (Risbud y col., 2000 y Peppas y col., 2000). El valor de hinchamiento máximo fue incrementado por la presencia de PAA, alcanzando valores de hasta 17,59 y 17,80 para relaciones de PAA:CS:A de (1:5:2)-1,75M y (2.5:5:2)-1,75M, respectivamente. Sin embargo en complejos poliónicos con proporciones mayores de ambos polímeros PAA:CS:A (5:5:2)-1,75M no se obtienen valores tan elevados de hinchamiento máximo que podrá explicarse por la presencia de una estructura menos porosa en la que existirá un exceso de cadenas de ambos polímeros en el interior del hidrogel las cuales obstruyen la entrada de solvente a la red polimérica (Wang y col., 1997). Estos resultados permiten considerar que existen unas

proporciones de ambos polímeros, PAA:CS:A (1:5:2)-1,75M y PAA:CS:A (2,5:5:2)-1,75M, en los que la repulsión electrostática entre ambas cadenas es máxima.

A diferencia de las formulaciones con una menor cantidad de CS (2,5) en la mayoría de los hidrogeles no se observan retrasos en los tiempos en los que se alcanza el grado máximo de hinchamiento. Solo las proporciones PAA:CS:A (5:5:2)-1,75M obtienen ligeros aumentos en el tiempo de hinchamiento máximo (30 min), lo cual podría ser atribuido a la existencia de una mayor cantidad de cadenas polimérica en el interior de la estructura que dificulta la entrada de agua, produciendo estos ligeros aumentos de tiempo.

A partir de los 30 min predomina el mecanismo de la erosión sobre el hinchamiento. La interacción electrostática entre ambas cadenas poliméricas en el interior de la estructura polimérica no es permanente, produciendo una velocidad de erosión más rápida que la que presentan otros hidrogeles basados en CS obtenidos por diferentes procesos (Noble y col.,1999, Chellat y col., 2000 y Bae y col., 1993). El mayor número de uniones electrostáticas atribuidas a proporciones de PAA:CS:A de (2,5:5:2)-1,75M y (5:5:2)-1,75M, puede ser la responsable de una velocidad de erosión más lenta. En cambio en proporciones de PAA:CS:A (1:5:2)-1,75M esta interacción no es tan permanente y la repulsión electrostática se muestra en la estructura regular observada en su microfotografía (**microfotografía 5**)

En la **figura 35** se muestran los perfiles de disolución para las formulaciones con una alta proporción de CS (5,0). En esta figura observamos que la presencia de mayores cantidades de CS producen velocidades de cesión más lentos, PAA:CS:A (0:5:2)-1,75M, que podrían deberse a un mayor entramado dentro de la estructura del hidrogel que retrasan la difusión de la amoxicilina. Una mayor velocidad de los perfiles de cesión en estos hidrogeles se debe al incremento de aniones carboxílicos (COO⁻). Podual y col., 2000 atribuyen a este tipo de grupos iónicos efectos de relajación en la estructura del hidrogel.

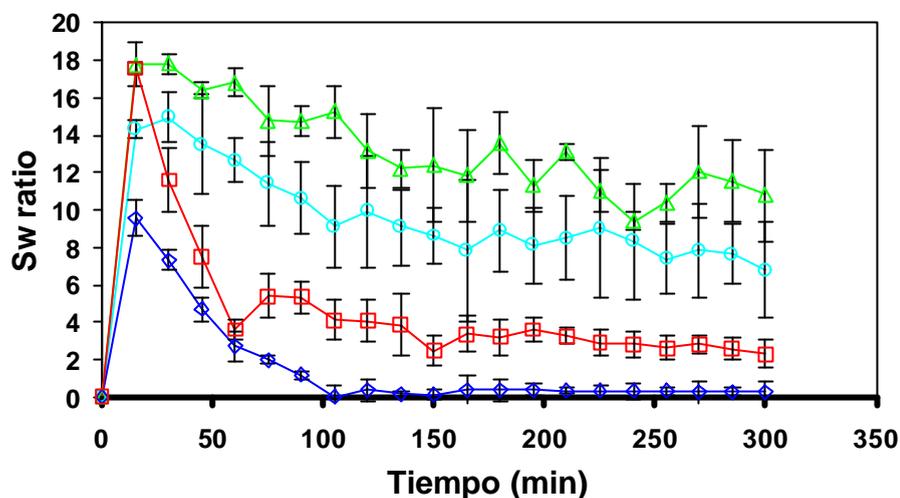


Figura 34. Cinéticas de hinchamiento y erosión de los siguientes complejos poliiónicos liofilizados de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (0:5:2)-1,75M (- -), PAA:CS:A (1:5:2)-1,75M (- -), PAA:CS:A (2,5:5:2)-1,75M (- -) y PAA:CS:A (5:5:2)-1,75M (-o-).

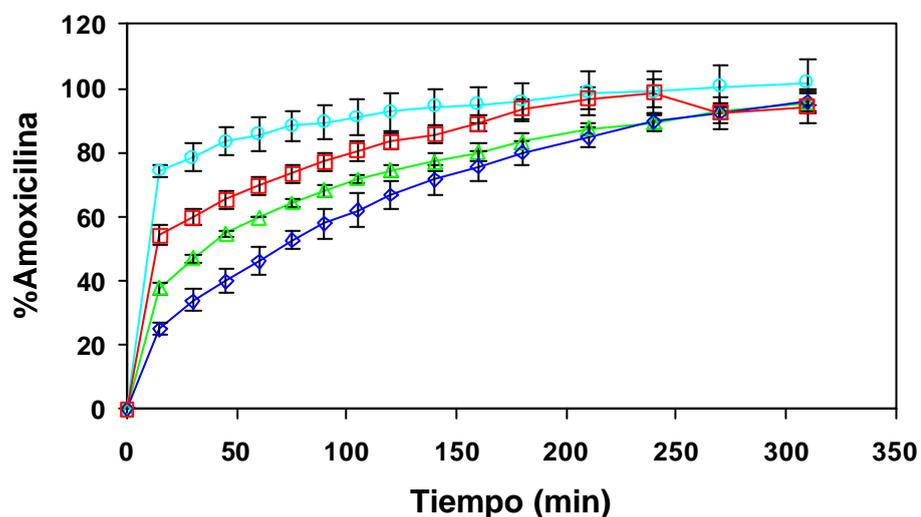


Figura 35. Perfiles de cesión en medio simulado gástrico (pH=1,2) de los siguientes complejos poliiónicos liofilizados de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (0:5:2)-1,75M (- -), PAA:CS:A (1:5:2)-1,75M (- -), PAA:CS:A (2,5:5:2)-1,75M (- -) y PAA:CS:A (5:5:2)-1,75M (-o-).

La cesión del principio activo desde estos complejos poliiónicos sigue un mecanismo e difusión no fickianos (ver **tabla 22**). Los bajos valores de n son consecuencia de una alta cesión inicial. El complejo poliiónico PAA:CS:A (2,5:5:2)-1,75M mostró un valor de n de 0,31, presentando una adecuada cesión en una etapa inicial. Estos resultados sugieren que la cesión estaba controlada por la difusión de la amoxicilina y una combinación del hinchamiento y disolución del hidrogel.

Tabla 22. % Inicial cedido, exponente de cesión (n), constante cinética (K) y coeficiente de determinación (r^2) obtenidos al ajustar a la ecuación de Pepas (Anh y col., 2002) porcentajes de amoxicilina trihidrato cedidos a distintos tiempos desde distintos hidrogeles liofilizados.

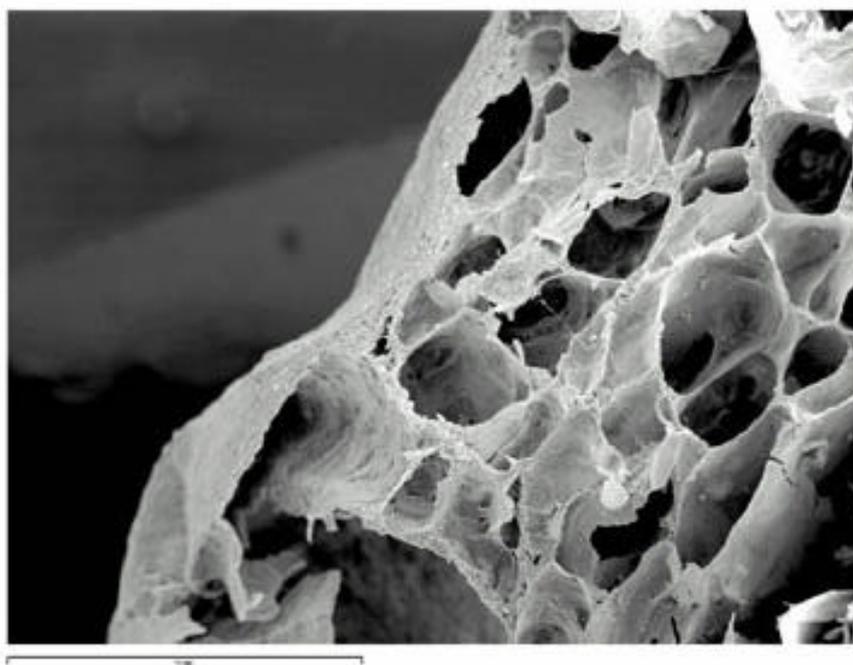
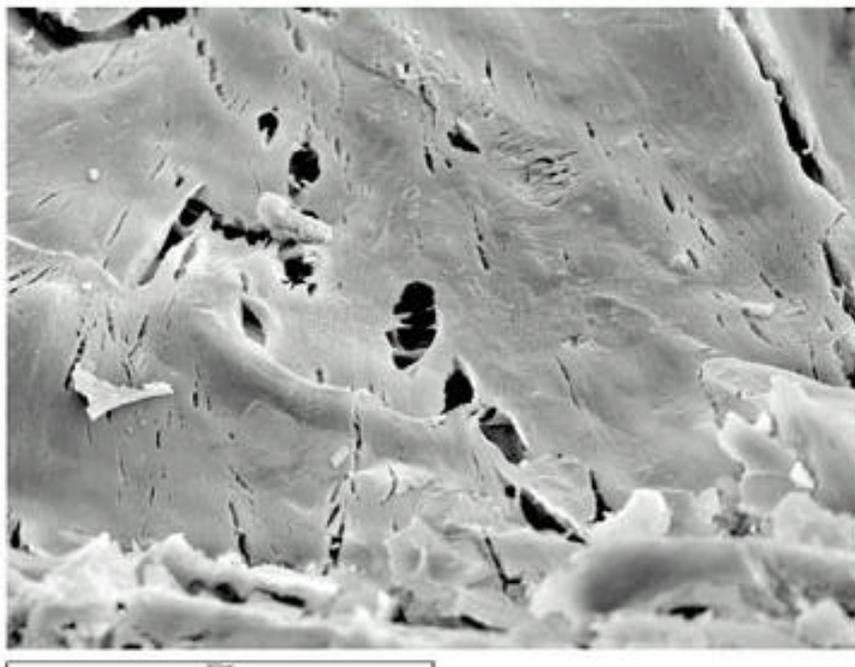
CS:PAA:A	Cesión inicial(%)	n	K	r^2
(0:5:2)-1.75M	24.78%	0.48	0.07	0.9983
(1:5:2)-1.75M	54.04%	0.18	0.99	0.9919
(2.5:5:2)-1.75M	37.61%	0.31	0.17	0.9966
(5:5:2)-1.75M	74.26%	0.11	0.55	0.9957

VII.2. Estudio de la influencia de la fuerza iónica en hidrogeles con distintos porcentajes de ambos polímeros.

Para realizar estos estudios se han seleccionado: un hidrogel liofilizado con un bajo porcentaje de CS, PAA:CS:A (1:2,5:2), e hidrogeles con porcentajes altos de CS (PAA:CS:A 1:5:2 y 2,5:5:2). Se ha evaluado la influencia de tres fuerzas iónicas 1,75M, 3,50 y 5,25M sobre los futuros hidrogeles liofilizados. Al incorporar estas sales a los hidrogeles antes de liofilizar obtendremos finalmente hidrogeles liofilizados con distintas proporciones de sales en su interior.

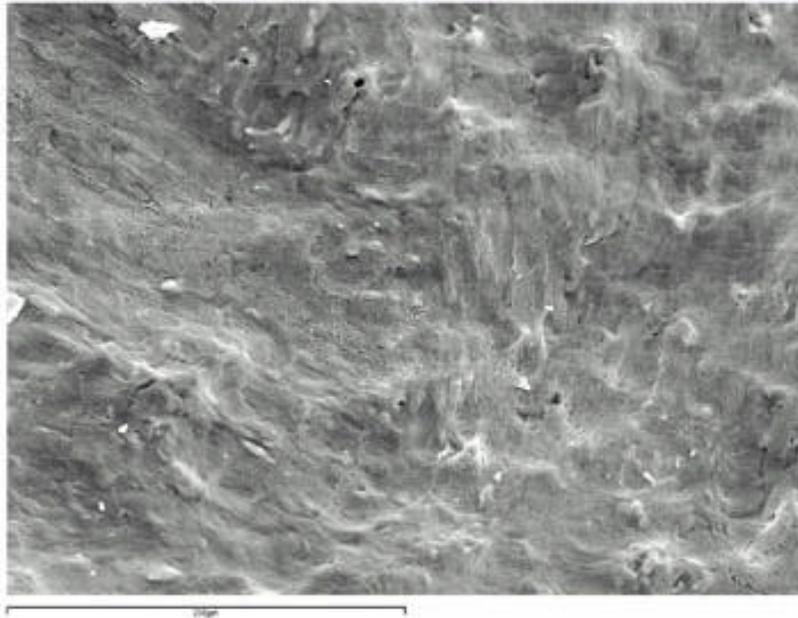
VII.2.1. Caracterización física por medio de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

Las **microfotografías 19-26** muestran los cambios producidos en la superficie de los hidrogeles liofilizados al aumentar la fuerza iónica. Los complejos poliiónicos PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75 M, (1:5:2)-1,75M (**microfografías 1.a y 5.a**, ver **capítulo VII**), y PAA:CS:A (2,5:5:2)-1,75 M (**micrografía 17.a**) presentan una estructura de celdilla abierta característica de la interacción existente entre los polímeros cuando se forma el hidrogel en un medio de baja fuerza iónica (1,75M de ácido acético). El tamaño de poro en los dos complejos poliiónicos (1:2,5:2)-1,75M y (2,5:5:2)-1,75M es generalmente pequeño, con valores de 25-50 μ m de diámetro, y en el hidrogel PAA:CS:A (1:5:2)-1,75 M los poros son más irregulares, alcanzando un diámetro de 40-75 μ m. Sin embargo un aumento en la fuerza iónica del medio formador del hidrogel (ácido acético 3,5M y 5,25 M) produce cambios en la morfología, obteniéndose una estructura lisa, con menos poros en la superficie de la red interpolimérica. Así, en las estructuras superficiales de los complejos poliiónicos PAA:CS:A (1:2,5:2)-3,50 M, PAA:CS:A (1:2,5:2)-5,25 M, PAA:CS:A (1:5:2)-3,50 M y PAA:CS:A (1:5:2)-5,25 M (**microfotografías 19.a, 20, 21, 22, 23 y 25**) se puede apreciar la ausencia total de poros en toda su superficie. A diferencia de otros trabajos, en los que se justifica la ausencia de poros por la aparición de nuevas interacciones iónicas en la estructura del hidrogel (Gabrielii y col., 1998), en estos hidrogeles liofilizados con distintas fuerzas iónicas la interacción entre las cadenas de ambos polímeros fue confirmada por medio del examen del corte transversal en el que se observa la existencia de una estructura característica con forma de celdillas abiertas (**microfotografías 19.b, 24 y 26**).

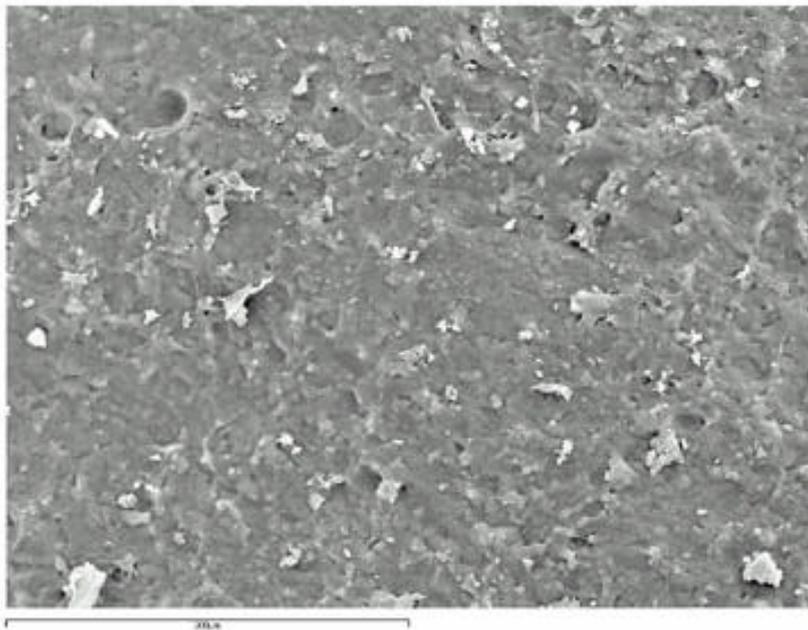


Microfotografía 19. Superficie del complejo poliónico de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (1:2,5:2)-3,50M 300 aumentos (19.a) y corte transversal 50 (19.b).

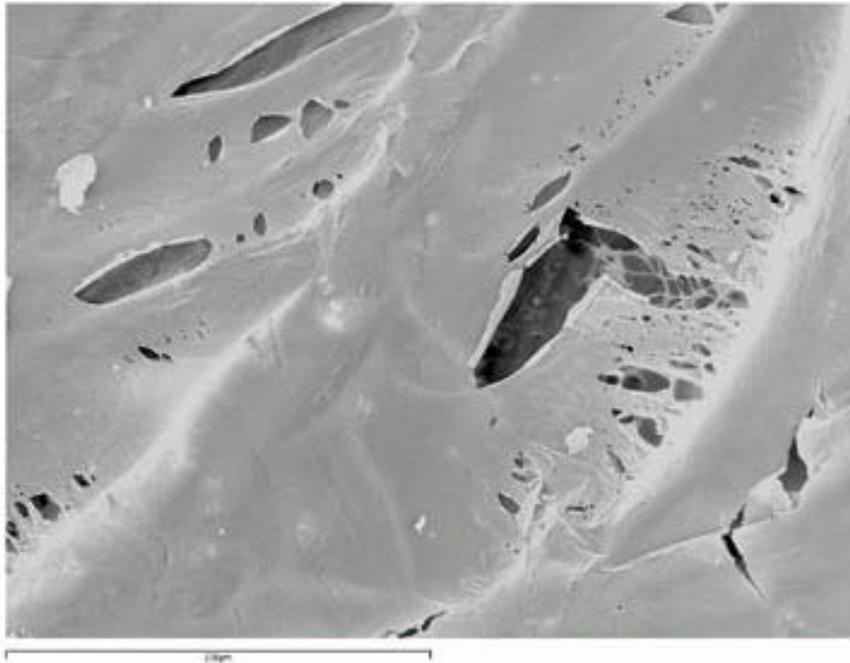
192 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*



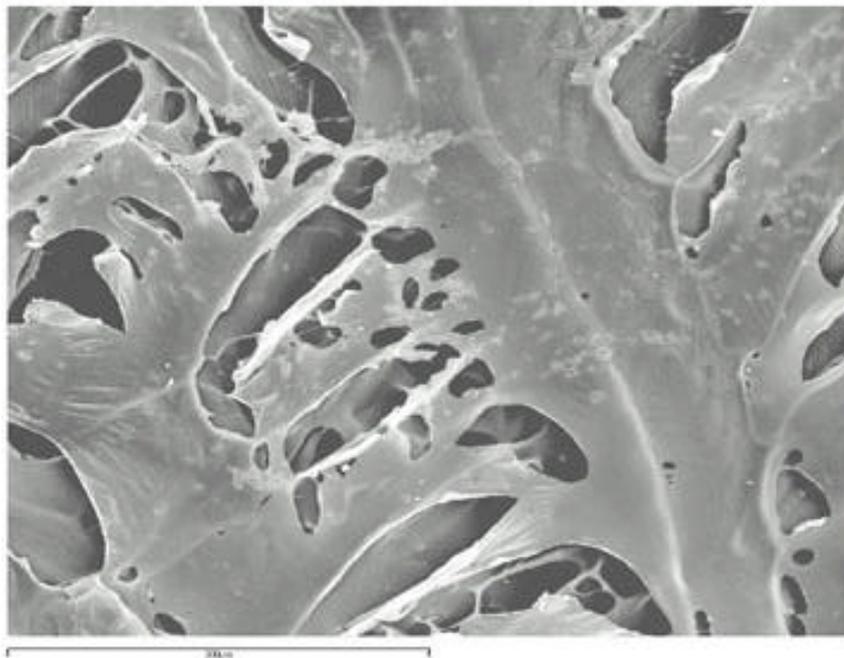
Microfotografía 20. Superficie del complejo poliónico de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (1:2,5:2)-5,25M, 300 aumentos.



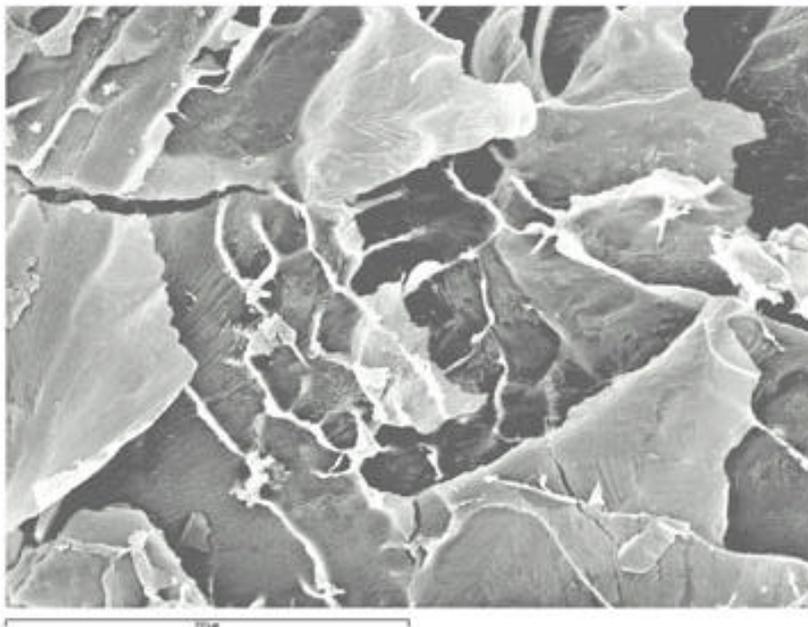
Microfotografía 21. Superficie del complejo poliónico de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (1:5:2)-3,50M, 300 aumentos.



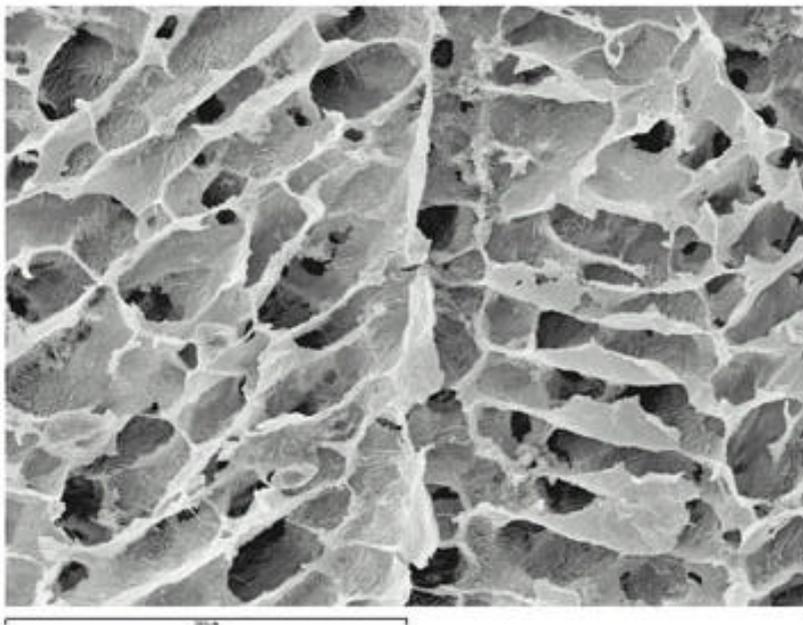
Microfotografía 22. Superficie del complejo poliónico de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (1:5:2)-5,25M, 50 (26.a) y 300 aumentos (26.b).



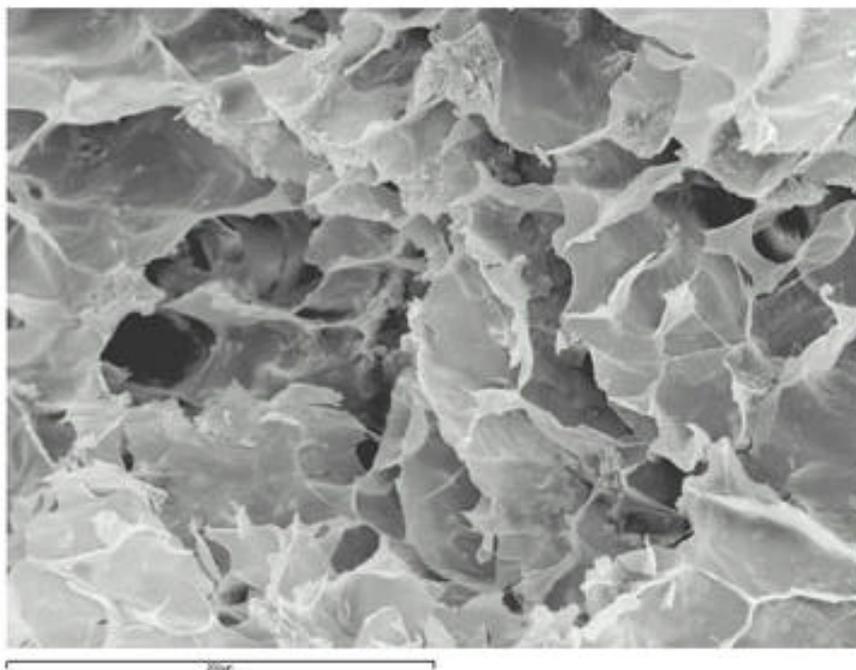
Microfotografía 23. Superficie del complejo poliónico de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (2,5:5:2)-3,50M, 300 aumentos.



Microfotografía 24. Corte transversal del complejo poliónico de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (2,5:5:2)-3,50M, 300 aumentos.



Microfotografía 25. Superficie del complejo poliónico de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (2,5:5:2)-5,25M, 300 aumentos.



Microfotografía 26. Corte transversal del complejo poliónico de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (2,5:5:2)-5,25M, 300 aumentos.

VII.2.2. El efecto de medios de formación del hidrogel con mayores fuerzas iónicas sobre el hinchamiento/ erosión de los hidrogeles y cesión de la amoxicilina.

Se ha estudiado la influencia de la fuerza iónica del medio formador del hidrogel en el hinchamiento y erosión del mismo (**figuras 36-38**). Los resultados mostraron que al incrementar la fuerza iónica del medio se redujo considerablemente el grado de hinchamiento máximo. Las formulaciones PAA:CS:A (1:2,5:2)-3,50M y PAA:CS:A (1:2,5:2)-5,25M alcanzaron similares máximos de Sw ratio a 3,03 y 3,72, respectivamente (ver **figura 36**), los hidrogeles PAA:CS:A (1:5:2)-3,50M y PAA:CS:A (1:5:2)-5,25M presentaron valores de 3,52 y 4,81 respectivamente (**figura 37**) y los hidrogeles PAA:CS:A (2,5:5:2)-3,50M y PAA:CS:A (2,5:5:2)-5,25M obtuvieron valores de 6,06 y 8,94, respectivamente (**figura 38**). Hay varias posibles explicaciones de este descenso drástico en los valores de hinchamiento que presentan los complejos poliónicos desarrollados en medios de alta fuerza iónica: la

ausencia de poros en la superficie podría resultar en una disminución de la entrada de agua por capilaridad, a la vez que crea una menor repulsión entre las cadenas, que impide la expansión de ambos polímeros y el hinchamiento del hidrogel, quedando colapsado (ver **esquema 2**). Como consecuencia la capa de gel en la superficie es menor produciéndose una erosión más rápida. Coviello y col., (2001) obtuvieron resultados parecidos en un hidrogel entrelazado químicamente con un derivado de esteroglucano, cuyos procesos de hinchamiento y erosión se vieron afectados por la fuerza iónica.

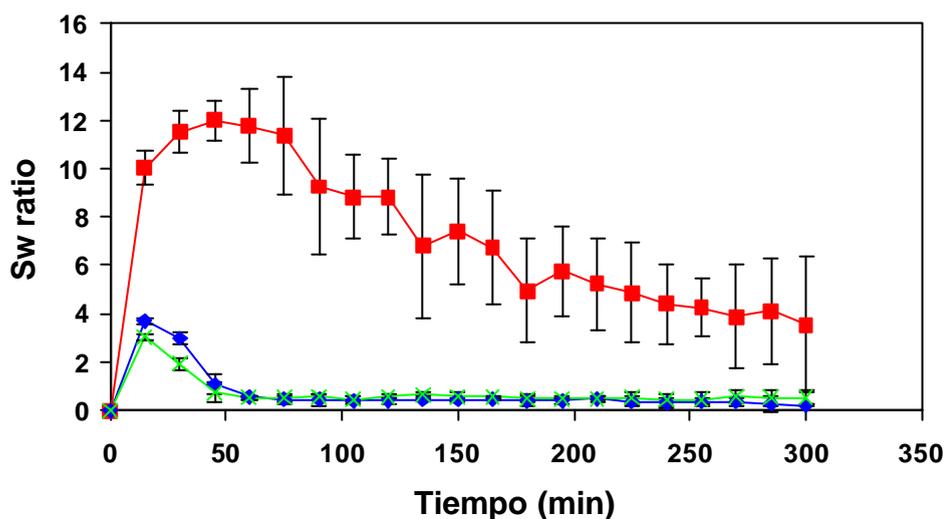


Figura 36. Cinéticas de hinchamiento y erosión de los siguientes complejos poliónicos liofilizados de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75M (- -), PAA:CS:A (1:2,5:2)-3,50 (X-) y PAA:CS:A (1:2,5:2)-5,25M (-♦-).

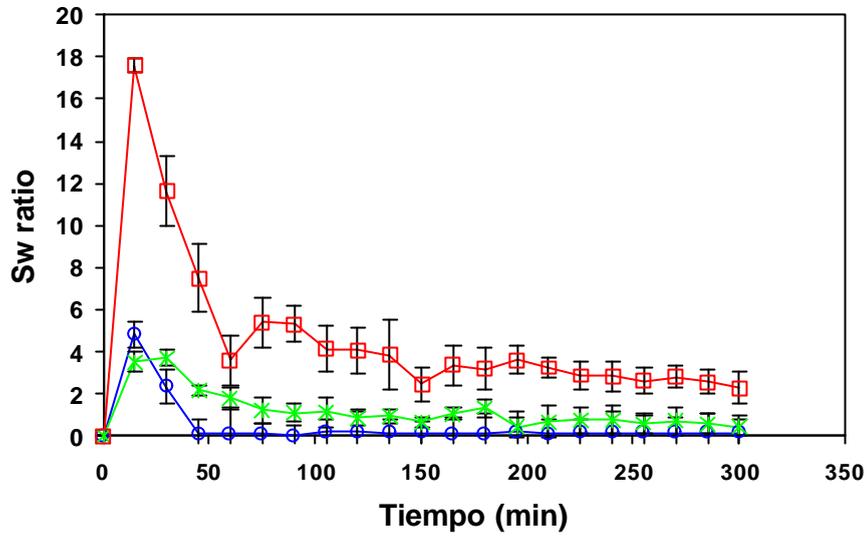


Figura 37. Cinéticas de hinchamiento y erosión de los siguientes complejos poliiónicos liofilizados de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (1:5:2)-1,75M (- -), PAA:CS:A (1:5:2)-3,50 (-*) y PAA:CS:A (1:5:2)-5,25M (-o-).

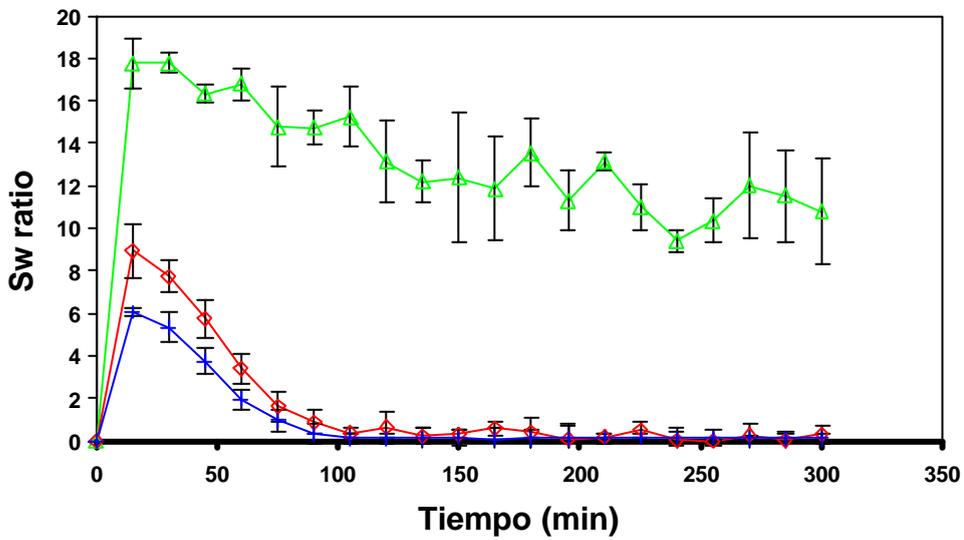
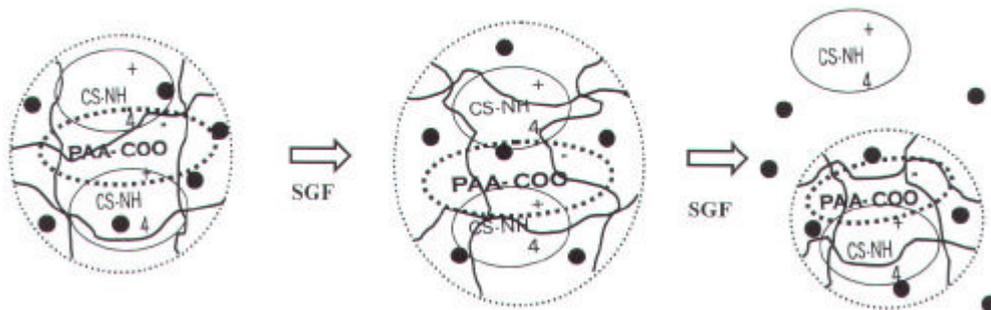


Figura 38. Cinéticas de hinchamiento y erosión de los siguientes complejos poliiónicos liofilizados de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (2,5:5:2)-1,75M (- -), PAA:CS:A (2,5:5:2)-3,50M (-*) y PAA:CS:A (2,5:5:2)-1,75M (-+-).



Esquema 2. Diagrama esquemático de hinchamiento/ erosión del complejo poliónico: PAA:CS:A (1:2,5:2)-5,25M. Los puntos negros () representan los iones del medio formador del hidrogel.

Las **figuras 39, 40 y 41** muestran el efecto del medio formador del hidrogel sobre la cesión de la amoxicilina. Las formulaciones PAA:CS:A (1:2,5:2)-3,50M y PAA:CS:A (1:2,5:2)-5,25M presentaron una alta cesión del principio activo en la primera hora, mostrando unos valores de 95,26% y 92,77% respectivamente, mucho más rápido que la formulación PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75M (ver **figura 39**). Esta rápida cesión puede ser consecuencia del pequeño hinchamiento que sufre el hidrogel durante la etapa inicial y la existencia de una menor interacción electrostática durante todo el proceso. Inukai y col. (2000) indican que la interacción electrostática interpolimérica disminuye al incrementar la fuerza iónica causando a la vez mayores velocidades de erosión. La cesión desde estos hidrogeles es demasiado rápida y por lo tanto no es adecuada para la administración controlada de la amoxicilina.

Al aumentar la proporción de CS en los hidrogeles con mayor fuerza iónica, PAA:CS:A (1:5:2)-3,50M y PAA:CS:A (1:5:2)-5,25M, se observa un descenso en las cesiones iniciales de amoxicilina (ver **figura 40**). Estos hidrogeles muestran perfiles de cesión más sostenida que las formulaciones con menores proporciones de CS (ver **figura 41**). Con estas proporciones de ambos polímeros los hidrogeles realizados en medios de menor fuerza iónica continúan presentando una cesión más sostenida.

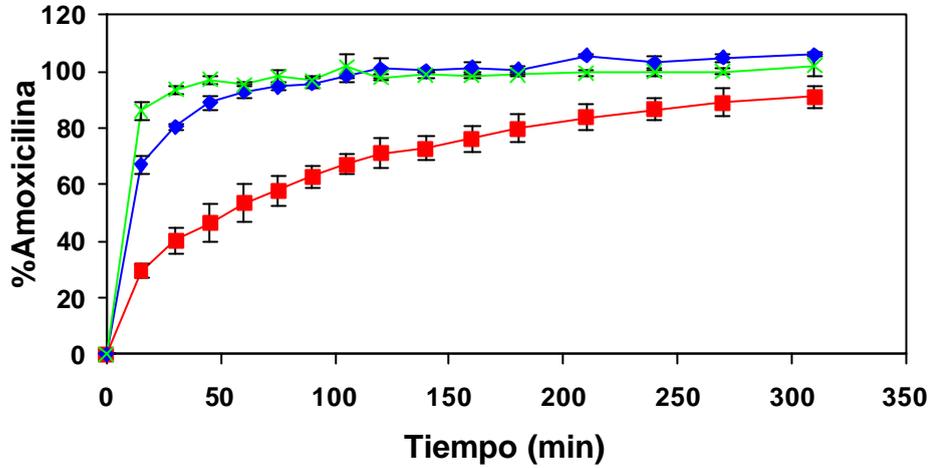


Figura 39. Perfiles de cesión en medio simulado gástrico (pH=1.2) de los siguientes complejos poliiónicos liofilizados de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75M (- -), PAA:CS:A (1:2,5:2)-3,50 (-X-) y PAA:CS:A (1:2,5:2)-5,25M (-♦-).

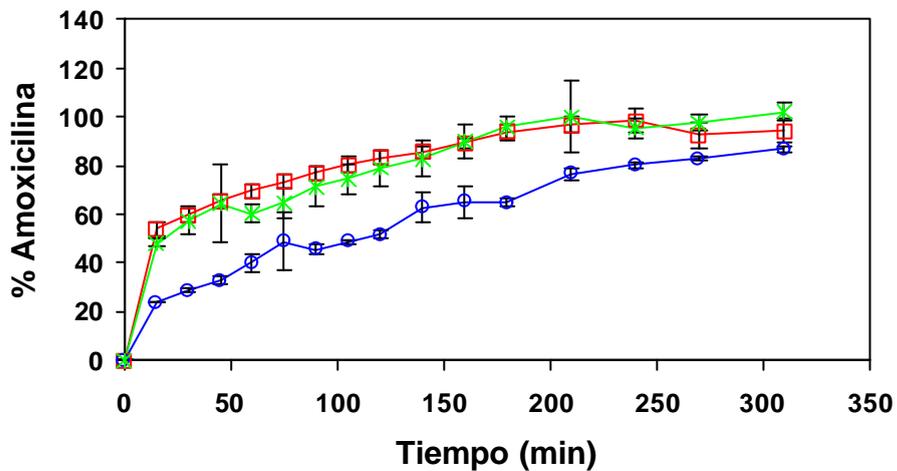


Figura 40. Perfiles de cesión en medio simulado gástrico (pH=1.2) de los siguientes complejos poliiónicos liofilizados de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (1:5:2)-1,75M (- -), PAA:CS:A (1:5:2)-3,50 (-X-) y PAA:CS:A (1:5:2)-5,25M (-o-).

Sin embargo, en los hidrogeles con una mayor cantidad de CS y PAA, PAA:CS:A (2,5:5:2)-3,50M y (2,5:5:2)-5,25M, se obtuvieron perfiles de cesión independientes de la cantidad de iones del medio formador del hidrogel, alcanzando valores de 58,10% a 61,31%

en la primera hora (ver **figura 41**). Esto posiblemente sea atribuido a que la existencia de una mayor proporción de ambos tipos de polímeros (CS y PAA) en el hidrogel produce un mayor entrecruzamiento de ambas cadenas dentro de la red polimérica. En estas condiciones, el principio activo se encuentra atrapado dentro del espacio de la estructura de red polimérica, en estas condiciones una interacción entre el principio activo y las cadenas poliméricas podría ser atribuida la parte de las cadenas poliméricas que cuelga dentro de los espacios existentes en el entramado del hidrogel. Tabata y col. (1998) obtuvieron resultados similares, observando que un incremento en la fuerza iónica en la disolución no afectaba a la cesión del principio activo, indicando la posibilidad de que existiesen uniones del principio activo a determinados grupos de la estructura del hidrogel.

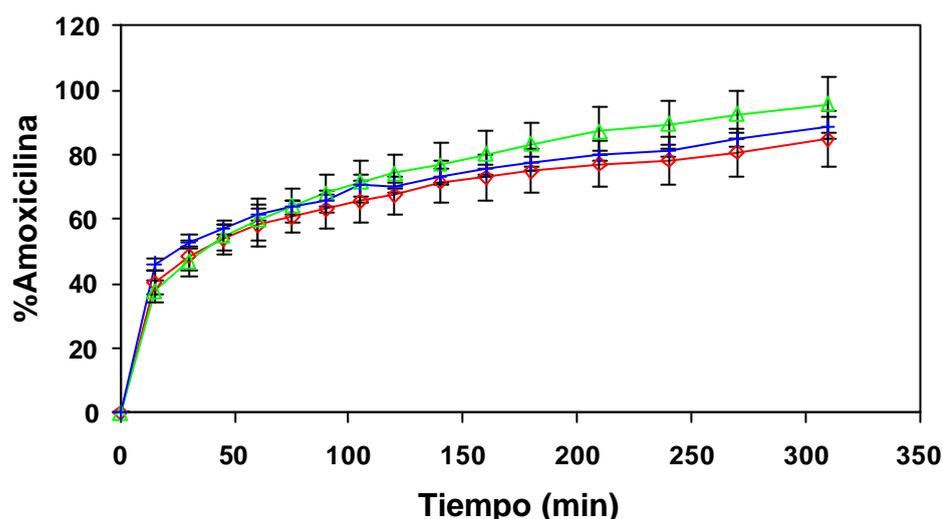


Figura 41. Perfiles de cesión en medio simulado gástrico (pH=1,2) de los siguientes complejos poliónicos liofilizados de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (2,5:5:2)-1,75M (---), PAA:CS:A (2,5:5:2)-3,50M (- -) y PAA:CS:A (2,5:5:2)-1,75M (-+-).

En la **tabla 23** se muestran el análisis de estas formulaciones según la ecuación de Pepas (Anh y col. (2002)). Los complejos poliónicos que contenían una menor proporción de CS (PAA:CS:A (1:2,5:2)-3,50M, (1:2,5:2)-5,25M y (1:5:2)-5,25M) desarrollados en medios con mayor concentración iónica (3,50 y 5,25M) presentaban cesiones muy rápidas y no pudieron ser ajustadas a este tipo de ecuaciones, a excepción del hidrogel PAA:CS:A

(1:5:2)-3,50M, que poseía una difusión no fickiana. Se muestran también las formulaciones con una mayor proporción de ambos polímeros, PAA:CS:A (2,5:5:2)-3,5M y PAA:CS:A (2,5:5:2)-5,25M, las cuales presentan una cesión no fickiana con valores similares de n (0,21 y 0,23 respectivamente). Estos resultados nos permiten considerar: i) que las mayores fuerzas iónicas del hidrogel tuvieron menos efecto sobre la cesión de la amoxicilina y ii) que las cinéticas de hinchamiento erosión y disolución del hidrogel fueron los mecanismos predominantes en la cesión de la amoxicilina para las distintas estructuras de hidrogel estudiadas.

Tabla 23. % Inicial cedido, exponente de cesión (n), constante cinética (K) y coeficiente de determinación (r^2) obtenidos al ajustar a la ecuación de Pepas (Anh y col., 2002) porcentajes de amoxicilina trihidrato cedidos a distintos tiempos desde distintos hidrogeles liofilizados.

CS:PAA:A	Cesión inicial(%)	n	K	r^2
(1:2.5:2)-1.75M	29.32%	0.42	0.09	0.9992
(1:2,5:2)-3,50M	86%	---	---	---
(1:2,5:2)-5,25M	67,23%	---	---	---
(1:5:2)-1.75M	54.04%	0.18	0.99	0.9919
(1:5:2)-3,50M	48,11%	0,41	0,11	0,9946
(1:5:2)-5,25M	28,83	---	---	---
(2.5:5:2)-1.75M	37.61%	0.31	0.17	0.9966
(2,5:5:2)-3,50M	46,13%	0,21	0,26	0,9966
(2,5:5:2)-5,25M	40,30%	0,24	0,21	0,9970

VII.3. Estudio de la influencia del volumen del medio formador del hidrogel en diferentes complejos poliiónicos.

En las secciones anteriores se ha estudiado como influyen el empleo de distintas proporciones de ambos polímeros en el hidrogel liofilizado. Con algunas de las proporciones que mostraron valores de cesión más sostenidas se evaluó la influencia de las distintas fuerzas iónicas (1,75M, 3,5M y 5,25M) sobre estos hidrogeles.

202 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

La última variable a estudiar es como la incorporación de distintas cantidades de agua, antes del proceso de liofilización pueden modificar la estructura de estos hidrogeles.

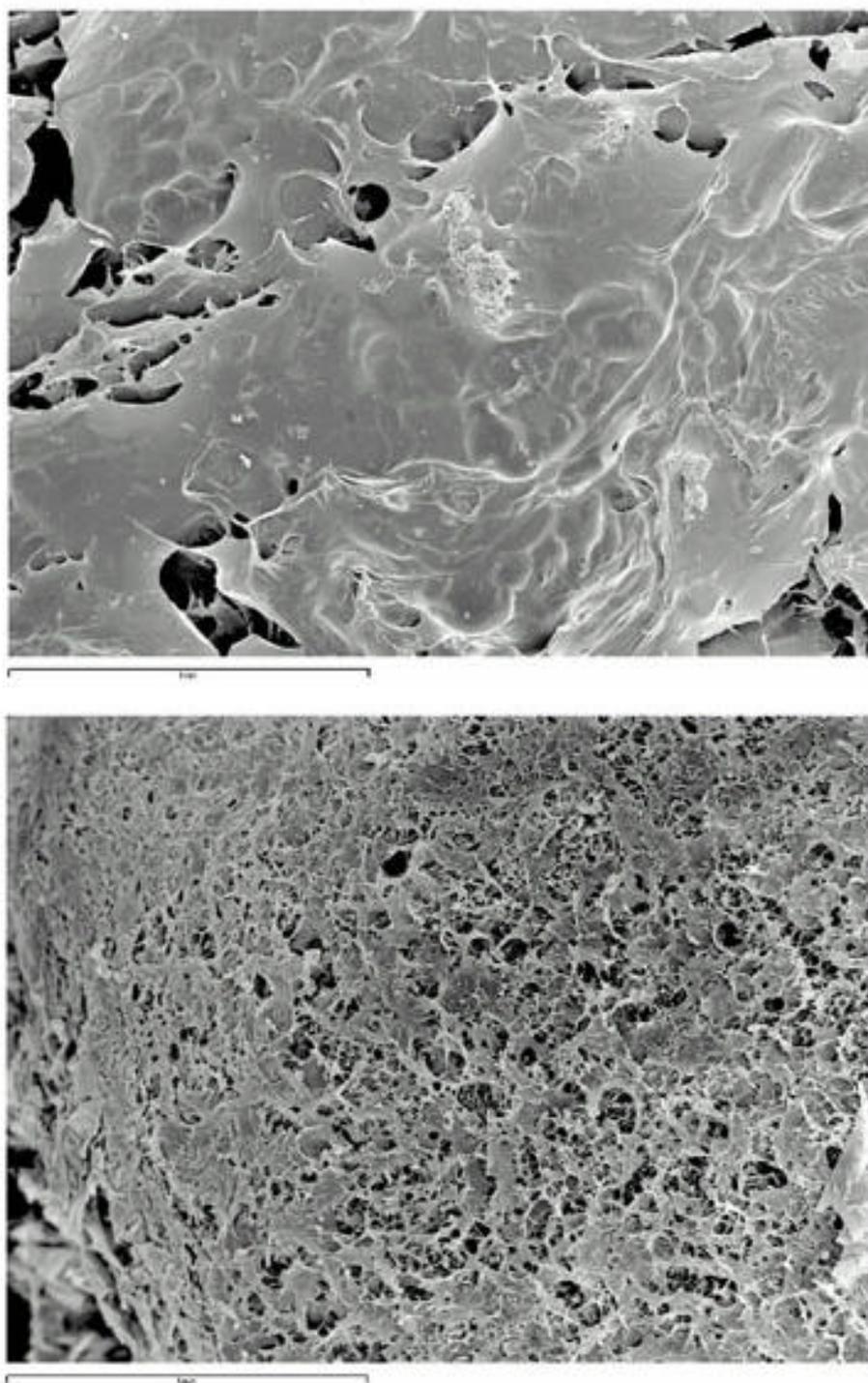
Para realizar este estudio se seleccionó una determinada proporción de hidrogel con dos fuerzas iónicas diferentes PAA:CS:A (1:5:2)-1,75M y PAA:CS:A (1:5:2)-5,25M.

Para la realización de estos estudios una vez incorporado el CS sobre el hidrogel de PAA se ajustan a distintos volúmenes crecientes de 26,66 ml, 40 ml y 53,32 ml. El proceso de liofilización producirá hidrogeles con diferente grado de entrapamiento de la amoxicilina dentro de la estructura polimérica.

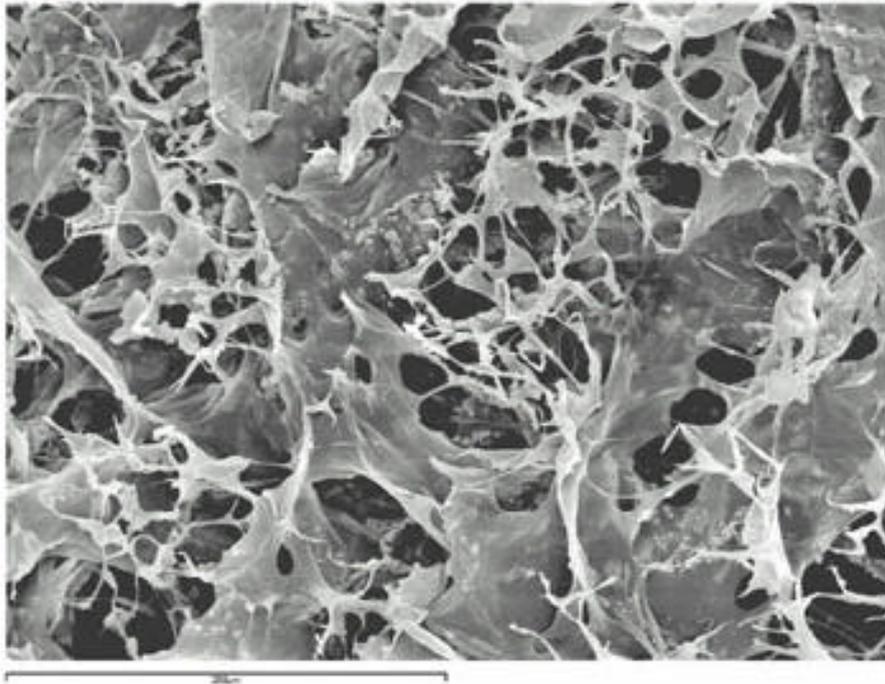
VII.3.1. Caracterización física por medio de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

En la **microfotografía 27.a** se observa como cambia la superficie del hidrogel liofilizado al incorporar mayores volúmenes antes de la liofilización. El hidrogel PAA:CS:A (1:5:2)-1,75M liofilizado a partir de altos volúmenes (53,32 ml) muestra una superficie diferente del hidrogel obtenido con menores volúmenes (26,66 ml) (ver **microfotografía 27.b**), sin una estructura regular y con muchos poros de pequeño tamaño. En la **microfotografía 28** se observa como restos de cadenas poliméricas (posiblemente sean del PAA) que presentan una estructura fibrilar ocupan los espacios entre los poros, siendo los responsables de los cambios en la estructura del hidrogel y en el tamaño de poro.

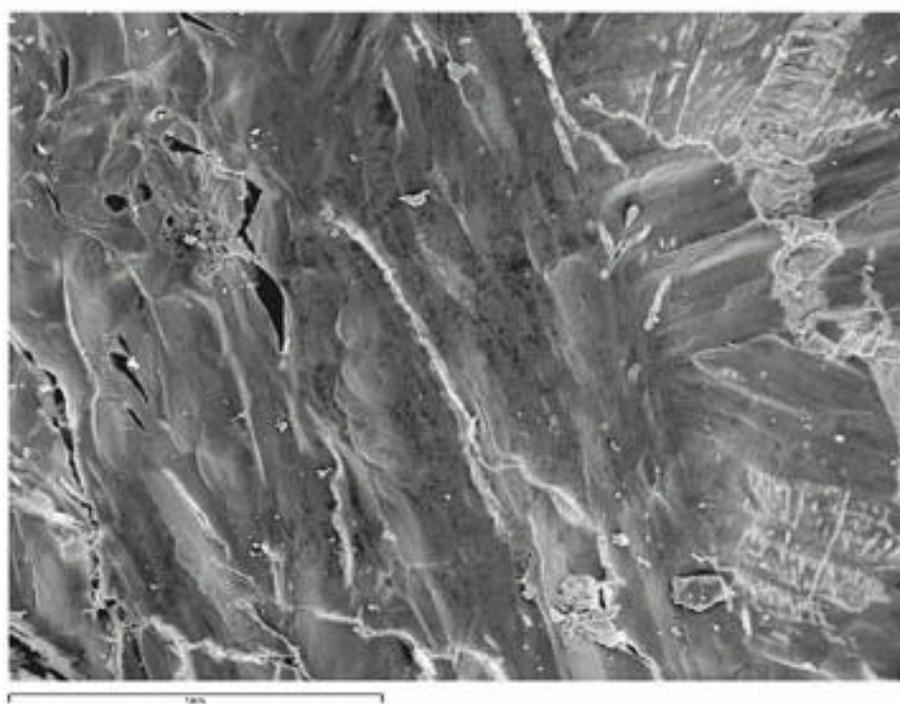
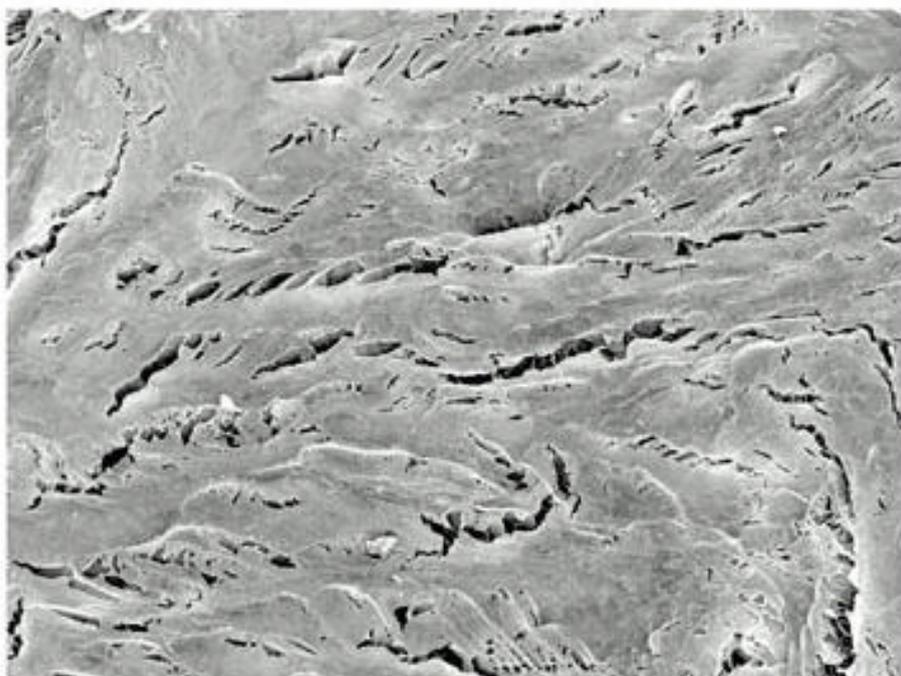
Cuando se emplean elevadas fuerzas iónicas de 5,25M, no se aprecian cambios en la superficie del hidrogel al incorporar mayores o menores cantidades de agua al medio antes de liofilizar, mostrando superficies lisas sin poros cuya morfología no se ve alterada por los distintos volúmenes empleados (ver **microfotografías 29.a** y **29.b**).



Microfotografía 27. Superficie del complejo poliónico de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (1:5:2)-1,75M-26,66 ml 50 (27.a) y PAA:CS:A (1:5:2)-1,75M-53,32 ml 50 aumentos (27.b).



Microfotografía 28. Superficie del complejo poliónico de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (1:5:2)-1,75M-53,66 ml 300 aumentos.



Microfotografía 29. Superficie del complejo poliiónico de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (1:5:2)-5,25M-26,66 ml (29.a) y PAA:CS:A (1:5:2)-5,25M-53,32 ml, 50 aumentos (29.b).

VII.3.2. Estudios de hinchamiento, erosión y velocidad de disolución.

En la **figuras 42 y 43** se muestra el perfil de hinchamiento y erosión de los hidrogeles PAA:CS:A (1:5:2)-1,75M y (1:5:2)-5,25M obtenidos a partir de distintos volúmenes. No se aprecian grandes diferencias en el grado de hinchamiento máximo que alcanzan todas los complejos poliiónicos estudiados, a excepción de la formulación PAA:CS:A (1:5:2)-1,75M-53,32 ml, que a pesar de poseer una estructura porosa, no alcanza un buen valor de hinchamiento. Esto último puede ser debido a que los restos de cadenas poliméricas que se observan por microscopía electrónica (ver **microfotografía 28**), impiden una mayor entrada de agua a la matriz polimérica. También se observa que en los hidrogeles que poseen mayor contenido de sales en su estructura polimérica, presentan mejoras en la velocidad de erosión, siendo ésta más lenta en las formulaciones obtenidas a partir de volúmenes menores y mayores.

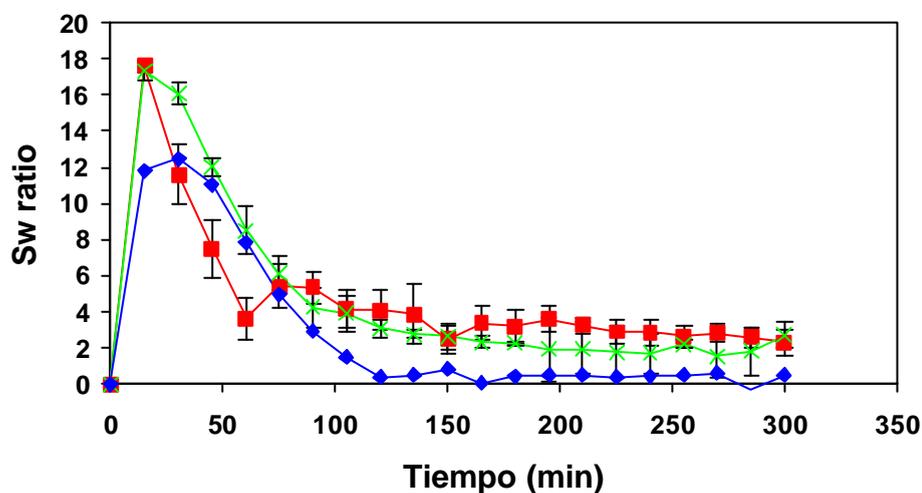


Figura 42. Cinéticas de hinchamiento y erosión en medio simulado gástrico (pH=1,2) de los siguientes complejos poliiónicos liofilizados de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (1:5:2)-1,75M-40ml (- -), PAA:CS:A (1:5:2)-1,75M-26,66ml (-X-) y PAA:CS:A (1:5:2)-1,75M-53,22ml (-♦-).

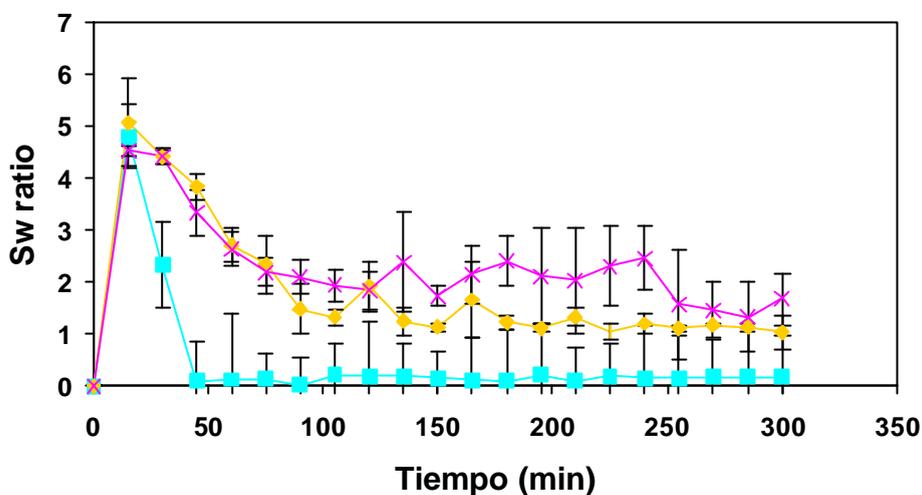


Figura 43. Cinéticas de hinchamiento y erosión en medio simulado gástrico (pH=1,2) de los siguientes complejos poliiónicos liofilizados de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (1:5:2)-5,25M (■), PAA:CS:A (1:5:2)-5,25M CON MENOS AGUA (×) y PAA:CS:A (1:5:2)-5,25M (◆).

Los diferentes perfiles de disolución de todos estos complejos poliiónicos están representados en las **figuras 44 y 45**, donde se observa que no existen grandes diferencias entre los mismos en los hidrogeles realizados con una fuerza iónica menor (PAA:CS:A 1:5:2)-1.75M. Por el contrario, cuando las formulaciones se han obtenido a partir de medios con una mayor fuerza iónica y a partir de volúmenes superiores o menores la cesión de amoxicilina trihidrato es más rápida como consecuencia de un peor entrapamiento del principio activo en el hidrogel. A partir de estos resultados se seleccionaron los hidrogeles realizados con un volumen intermedio de 40 ml ya que no se obtuvieron mejoras en los grados de hinchamiento ni perfiles de cesión más sostenidos con complejos poliiónicos realizados a partir de soluciones con menores y mayores volúmenes.

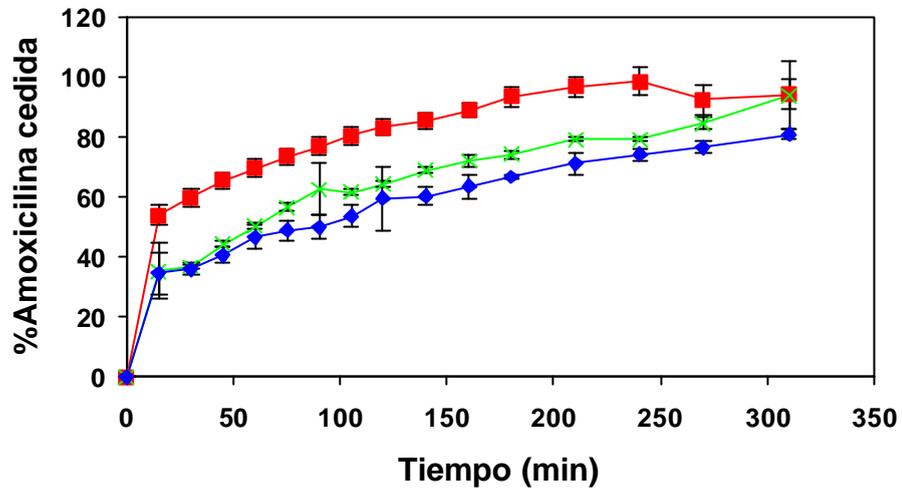


Figura 44. Perfiles de cesión en medio simulado gástrico (pH=1,2) de los siguientes complejos poliiónicos liofilizados de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (1:5:2)-1,75M-40ml (- -), PAA:CS:A (1:5:2)-1,75M-26,66ml (-X-) y PAA:CS:A (1:5:2)-1,75M-53,32ml (-♦-).

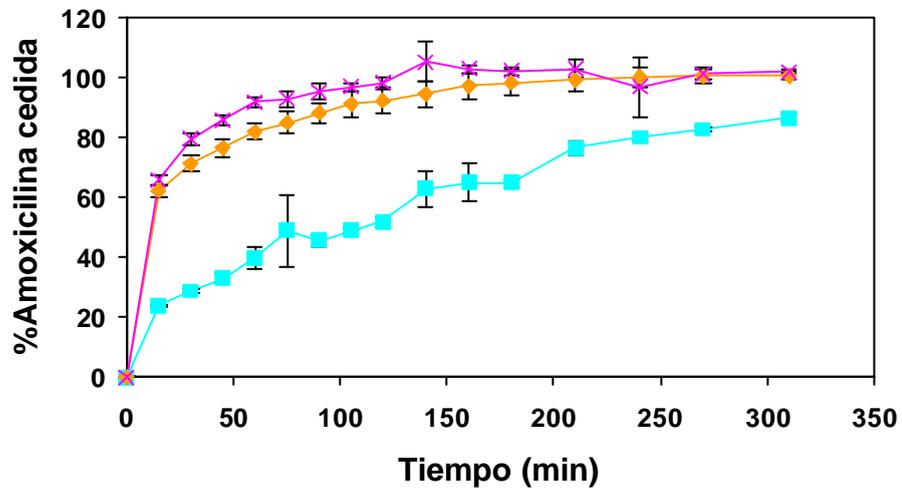


Figura 45. Perfiles de cesión en medio simulado gástrico (pH=1,2) de los siguientes complejos poliiónicos liofilizados de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (1:5:2)-5,25M-40ml (- -), PAA:CS:A (1:5:2)-5,25M-26,66ml (-X-) y PAA:CS:A (1:5:2)-5,25M-53,32ml (-♦-).

VII.4. Discusión parcial.

A la vista de estos resultados para una cantidad constante de CS, la presencia de PAA en la formulación, produce una interacción electrostática en el interior de la estructura del hidrogel, entre los grupos carboxílicos del PAA y los catiónicos del CS. En fluido simulado gástrico, esta clase de interacciones será la responsable de un mayor grado de hinchamiento de estos hidrogeles y de una cinética de erosión más lenta en estos complejos poliiónicos, en comparación con hidrogeles liofilizados sin PAA (ver **esquemas 1.a** y **1.b**). Mayores contenidos de CS en los complejos, por ejemplo PAA:CS:A (2,5:5:2)-1,75M, produce una estructura más porosa, en la que es posible obtener valores mayores de hinchamiento y las cinéticas de erosión más sostenidas en el fluido simulado gástrico. Finalmente, la presencia de una mayor cantidad de iones en el medio formador del hidrogel (ver **esquema 2**) va a dar un comportamiento diferente según sea la estructura más o menos porosa. Así, en estructuras más porosas, PAA:CS:A (1:2,5:2)-5,25M los nuevos iones se sitúan en el interior de la estructura polimérica, ocupando los poros de la superficie, produciendo un mayor colapso o derrumbamiento de la red y causando una disminución en sus valores de hinchamiento. Una vez hinchados estos hidrogeles presentan una velocidad de erosión similar, en el que se aprecia una cesión más rápida de la amoxicilina en el hidrogel. Los exponentes de difusión (n) de estos hidrogeles liofilizados muestran cinéticas de tipo no fickiana, en los que la velocidad de erosión y disolución del hidrogel son los mecanismos predominantes en el proceso de difusión de la amoxicilina para los complejos con baja cantidad de ambos tipos de polímeros.

Sin embargo, un incremento en la cantidad de iones dentro de la red polimérica no afecta la cesión de la amoxicilina en hidrogeles con mayor cantidad de ambos tipos de polímeros, siendo ésta más sostenida, aunque disminuye el hinchamiento y la velocidad de erosión. Esto será debido a que la mayor cantidad de ambos polímeros impide que los iones del medio formador del hidrogel se entrapen en la estructura polimérica impidiendo la posibilidad de la aparición de nuevas interacciones que modifiquen la cesión de la amoxicilina.

210 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

La utilización de volúmenes menores o superiores a 40 ml no va a causar grandes mejoras en la cesión sostenida del antibiótico, por lo tanto se seleccionó el volumen intermedio del medio formador del hidrogel de 40 ml para la realización de los complejos poliiónicos.

Los complejos poliiónicos PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75M y PAA:CS:A (2,5:5:2)-1,75M podrían ser los más adecuados para la administración localizada en el estómago del tratamiento para la erradicación de *H. pylori*, debido a sus perfiles de cesión controlada, porosidad y buenas cinéticas de hinchamiento/ erosión.

VII.5. Bibliografía.

- Ahn J.S.; Choi H.K.; Cho C.S. Chun M; Ryu J.; Jung J.; Kim Y. And Cho CS. Release of triamcinolone acetonide from mucoadhesive polymer composed of chitosan and poly(acrylic acid) *in vitro*. *Biomaterials* 23:1411-1416 (2002).
- Bae Y. H., Kim S. W. Hydrogel delivery systems based on polymer blends, block-copolymers or interpenetrating networks. *Adv. Drug. Del. Rev.* 11: 109-135 (1993).
- Chellat F., Tabrizian M., Dumitriu S., Chornet E., Rivard C. H., Yahia L. Study of biodegradation behavior of chitosan-xanthan microspheres in simulated physiological media. *J. Biomed. Mater. Res.* 53: 592-599 (2000).
- Coviello T., Grassi M., Rambone G. and Alhaique F. A crosslinked system from scleroglucan derivative; preparation and characterization, *Biomaterials*; 22: 1899-909 (2001).
- Dumitriu S. and Chornet E. Inclusion and release of proteins from polysaccharide-based polyions complexes. *Advance Drug Del. Rev.* 31: 223-246 (1998).

- Gabriellii I., Gatenholm P. Preparation and properties of hydrogels based on hemicellulose. *J. Appl. Polym. Sci.* 69: 1661-1667 (1998).
- Inukai M., Jin Y., Yomota C. and Yonese M. Preparation and characterization of hyaluronate-hydroxyethyl acrylate blend hydrogel for controlled release device. *Chem. Pharm. Bull.*; 48: 850-4 (2000).
- Munjeri O.; Collet J.H. and Fell J. T. Hydrogel beads based on amidated pectins for colon-specific drug delivery: the role of chitosan in modifying drug release. *J. Control. Release.* 46: 273-278 (1997).
- Noble L., Gray A. I., Sadiq L. and Uchegbu I. F. A non-covalently cross-linked chitosan based hydrogel. *Int. J. of Pharmaceutics* 192: 173-182 (1999).
- Patel V. R., and Amiji M. M. Preparation and characterization of freeze-dried chitosan-poly (ethylene oxide) hydrogels for site-specific antibiotic delivery in the stomach. *Pharmaceutical Research* 13: 588-593 (1996).
- Peniche C., Elvira C., San Roman J. Interpolymer complexes of chitosan and polymethacrylic derivatives of salicylic acid: preparation, characterization and modification by thermal treatment. *Polymer* 39: 6549-6554 (1998).
- Peppas N.A., Bures P., Leobandung W. Y Ichikawa H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50: 27-46 (2000).
- Podual K., Doyle F.J., Peppas N.A. Glucose-sensitivity of glucose oxidase-containing cationic copolymer hydrogels having poly(ethylene glycol) grafts. *J. Control. Release* 67: 9-17 (2000).

212 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

- Risbud M. V., Hardikar A. A., Bhat S. V. and Bhonde R. R. pH-sensitive freeze-dried chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogels as controlled release systems for antibiotic delivery. *J. Control. Release* 68: 23-30 (2000).
- Shin H. S., Kim S. Y., Lee Y. M. Indomethacin release behaviors from pH and thermoresponsive poly (vinyl alcohol) and poly (acrylic acid) IPN hydrogels for site-specific drug delivery. *J. Appl. Polym. Sci.* 65: 685-693 (1997).
- Tabata Y., Matsui Y. and Ikada Y. Growth factor release from amylopectin hydrogel based on copper coordination. *J. Control. Release* 56: 135-48 (1998).
- Wang H.; Li W.; Lu Y. and Wang Z. Studies on chitosan and poly (acrylic acid) interpolymer complexes. I. Preparation, structure, pH-sensitivity and salt sensitivity of complex-forming poly (acrylic acid) : chitosan semiinterpenetrating polymer network. *J. Appl. Polym. Sci.* 65: 1445-1450 (1997).

CAPÍTULO VIII: ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL pH DEL MEDIO DE DISOLUCIÓN EN DOS COMPLEJOS POLIIÓNICOS. ESTUDIO *IN VIVO* PARA DEMOSTRAR SU PROLONGADA RETENCIÓN GÁSTRICA.

En este capítulo se estudian las dos formulaciones de hidrogeles: PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75M y PAA:CS:A (2,5:5:2)-1,75M con mejores resultados en los estudios realizados anteriormente (ver **capítulo VI** y **VII**). Estos complejos poliiónicos serán sometidos a los siguientes estudios: a) evaluación de la influencia del pH del medio de disolución en el grado de hinchamiento de los hidrogeles y la cesión de la amoxicilina, en comparación con una formulación de referencia de cesión inmediata; y b) estudio *in vivo* para medir la retención gástrica de las formulaciones por medio de la prueba del aliento con ácido octanoico marcado con [¹³C], confrontándola a la formulación de referencia de cesión rápida.

Los dos complejos poliiónicos contienen una proporción constante de 2 partes de amoxicilina trihidrato.

Se han evaluado las siguientes relaciones poliméricas:

- Las relaciones de PAA:CS:A de los hidrogeles formados por chitosán y Carbopol[®] 974P NF con amoxicilina trihidrato son: (1:2,5:2)-1,75M y (2,5:5:2)-1,75M. Estos dos complejos poliiónicos fueron empleados para los ensayos *in vitro* de hinchamiento y de cesión en medio simulado gástrico y en medio de pH 4,0.
- En los estudios *in vitro* de velocidad de disolución de ácido octanoico en medios de disolución con distinto pH y en los estudios *in vivo* para la determinación del vaciamiento gástrico se han utilizado dos complejos poliiónicos sin amoxicilina, con la siguiente relación: PAA:CS:A (1:2,5:0)-1,75M y PAA:CS:A (2,5:5:0)-1,75M. Se

216 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

incorpora a 100 mg de cada formulación 91 mg de ácido octanoico adsorbido sobre el hidrogel.

Los dos complejos poliiónicos seleccionados fueron cortados en cubos de 2 mm³. Este tamaño de partícula (2 mm) fue seleccionado para obtener una velocidad de vaciamiento gástrico igual o más lenta en comparación con una comida sólida (Bruno y col., 1998 y Meyer y col., 1988).

La formulación de referencia en los estudios *in vivo* para la determinación del vaciamiento gástrico, consistía en gránulos que contienen celulosa microcristalina (compuestos por un 97% de celulosa microcristalina y un 3% de polivinilpirrolidona) El proceso de granulación se consigue mediante su aglutinación con agua seguida de su tamización por luz de malla de 2 mm, y secado en estufa a 45°C (De Prada, 2001)

VIII.1. Estudio del grado de hinchamiento y erosión en función del pH.

Para determinar si los complejos poliiónicos seleccionados eran sensibles a variaciones en el pH del medio de disolución los ensayos de grado de hinchamiento y de erosión fueron realizados en medio simulado gástrico (de pH 1,2) y en una solución de pH 4,0, la cual simulaba las condiciones ambientales de la primera parte del tracto intestinal (ver **figura 46** y **47**). En la **figura 47** se muestra como el complejo poliiónico (1:2,5:2)-1,75M presentaba su máximo grado de hinchamiento a los 45 minutos en medio simulado gástrico, y después de 45 minutos el proceso predominante fue la erosión del hidrogel. En el caso del hidrogel PAA:CS:A (2,5:5:2)-1,75M la presencia de una mayor cantidad de CS produce un aumento del grado de hinchamiento máximo, alcanzando un valor de hasta 17,80 a los 15 min. La naturaleza regular de los complejos poliiónicos liofilizados (ver microfotografías de los **capítulos VI** y **VII**) y las repulsiones electrostáticas entre ambas cadenas poliméricas podría facilitar un rápido y eficiente hinchamiento (^a y ^b de la Torre y col., 2003). En medio simulado gástrico las grandes fuerzas de repulsión electrostática fueron principalmente causadas por

la protonación de las aminas primarias del quitosán. Este mayor hinchamiento de los complejos poliiónicos en pH 1,2 podría resultar beneficioso en la obtención de mayores tiempos de residencia gástrica de ambas formulaciones. La relación entre el tamaño de partícula y el vaciamiento gástrico ha sido confirmada por varios autores (Bruno y col., 1998; Meyer y col., 1988)

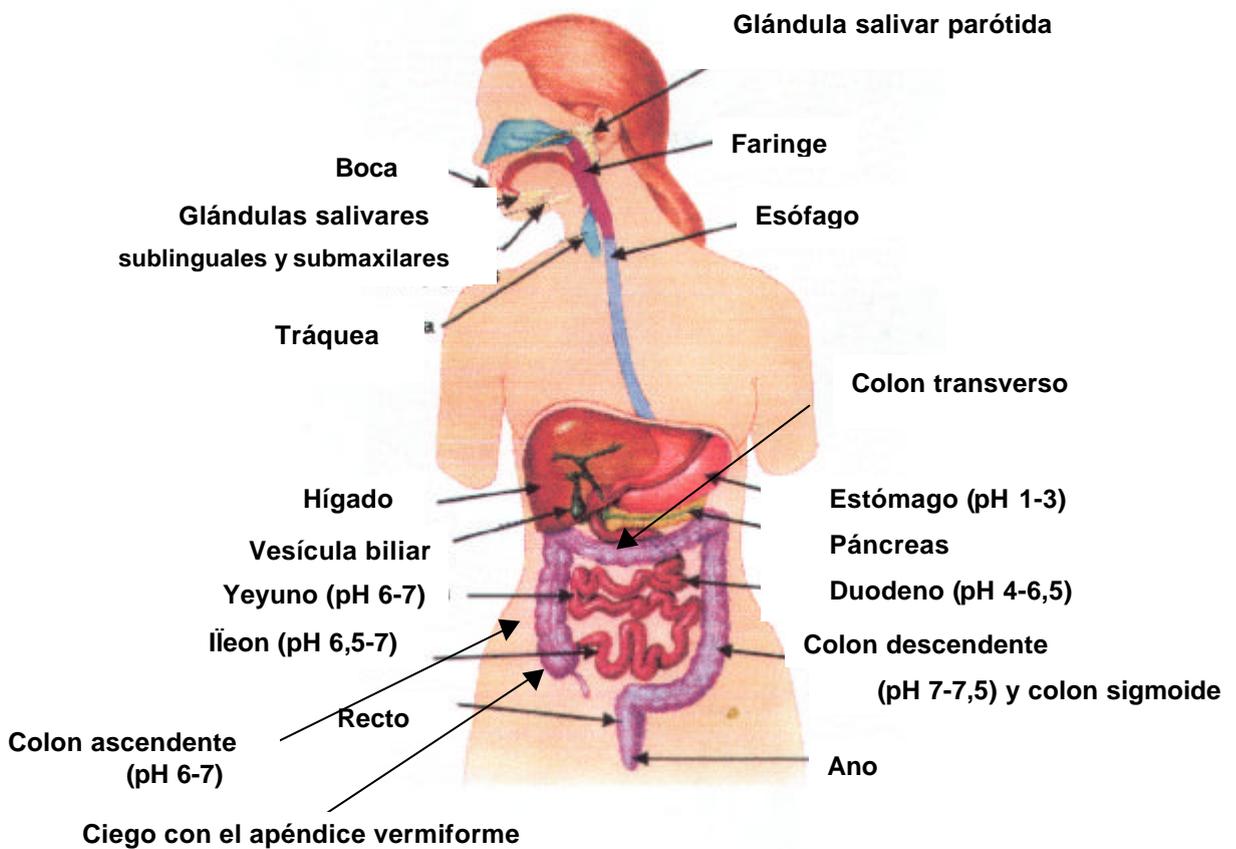


Figura 46. Tracto gastrointestinal con valores típicos de pH, aunque hay siempre fluctuaciones intra e inter individuales.

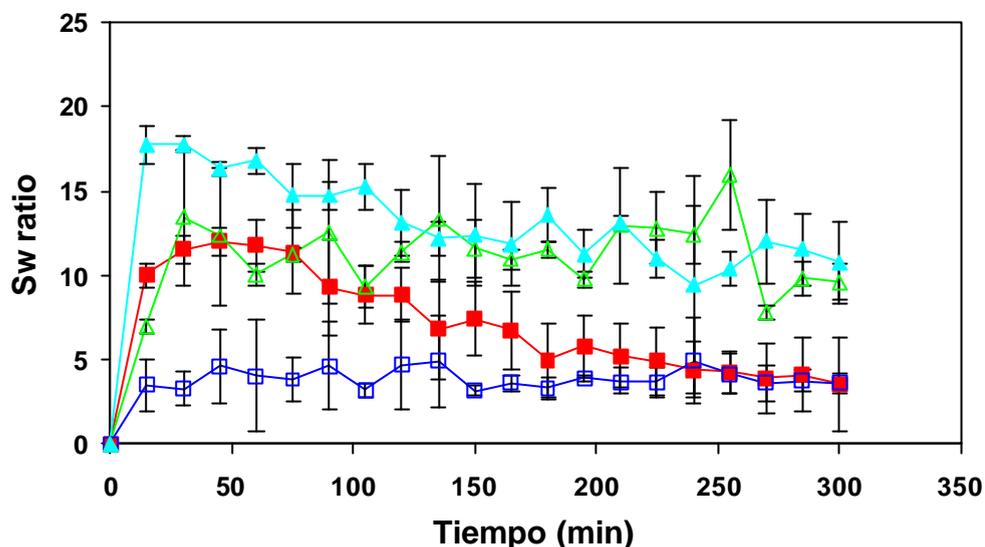
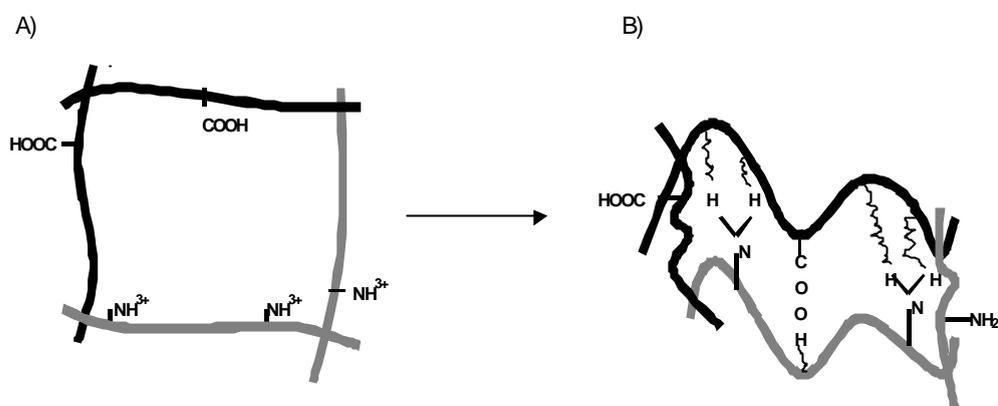


Figura 47. Cinéticas de hinchamiento y erosión de los siguientes complejos poliiónicos liofilizados de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75M en medio simulado gástrico (- -) y en pH 4,0 (- -), PAA:CS:A (2,5:5:2)-1,75M en medio simulado gástrico (- -) y en pH 4,0 (- -).

En cambio, en el medio de disolución de pH 4,0, las cinéticas de hinchamiento presentaron resultados muy dispersos en ambas formulaciones, alcanzando valores mayores de grado de hinchamiento máximo en el complejo poliiónico PAA:CS:A (2,5:5:2)-1,75M. Las mayores variaciones en las desviaciones estándar a pH 4,0 podrían estar causadas por el colapso que sufre el hidrogel en este medio, además la entrada de solvente a la red polimérica en los complejos poliiónicos PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75M y PAA:CS:A (2,5:5:2)-1,75M fue 7,72 y 3,20 veces menor, respectivamente, que en pH 1,2. La disminución del grado de hinchamiento del complejo poliiónico en pH 4,0, podría acelerar la difusión de la amoxicilina en la primera parte del tracto intestinal. Una posible explicación del colapso sufrido por la matriz polimérica a pH 4,0, es la existencia de interacciones causadas por puentes de hidrógeno inter particulares entre los grupos carboxílicos del PAA, los grupos aminos del CS y ciertas regiones de las cadenas poliméricas (ver **esquema 3**). Resultados similares han sido obtenidos por diferentes autores (Kratz y col., 2000).



Esquema 3. Transición de volumen en la red polimérica: A) matriz polimérica expandida en pH 1,2; B) matriz polimérica colapsada en pH 4,0.

El mayor número de uniones electrostáticas atribuidas a la relación de PAA:CS:A de (2,5:5:2)-1,75M, pueden ser las responsables de una velocidad de erosión más lenta en medio simulado gástrico. La cinética de erosión es diferente dependiendo del pH del medio, debido a que se generan diferentes interacciones dentro de la matriz polimérica. El proceso de erosión ha sido estudiado por diferentes autores en hidrogeles basados en quitosán (Risbud y col., 2000; Noble y col., 1999). En estos estudios se observa que en medios de pH 4,0 se produce una disociación más lenta de las interacciones interpoliméricas que ocasiona cinéticas de erosión más lentas para este complejo poliónico.

VIII.2. Estudio *in vitro* de cesión en función del pH.

La **figura 48** muestra los perfiles acumulativos de cesión de amoxicilina. En pH 1,2 los complejos poliónicos presentaron una baja cesión inicial, el hidrogel (1:2,5:2)-1,75M cedió un 53,55% y 70,97% de amoxicilina en 1h y 2h respectivamente. El complejo poliónico PAA:CS:A (2,5:5:2)-1,75M presentó porcentajes cedidos de amoxicilina, similares con

valores de 59,83% y 74,30% en 1h y 2h respectivamente. Los dos hidrogeles presentan un adecuado perfil de cesión controlado durante dos horas en medio simulado gástrico, el cual asegurará la máxima disponibilidad del principio activo en el estómago durante ese tiempo. Esta cesión controlada de amoxicilina puede estar causada por un proceso de entrapamiento de la amoxicilina trihidrato dentro del entramado del complejo poliiónico, produciéndose este entramado por la repulsión electrostática entra ambas cadenas poliméricas del hidrogel en pH 1,2 (Bettini y col., 1995).

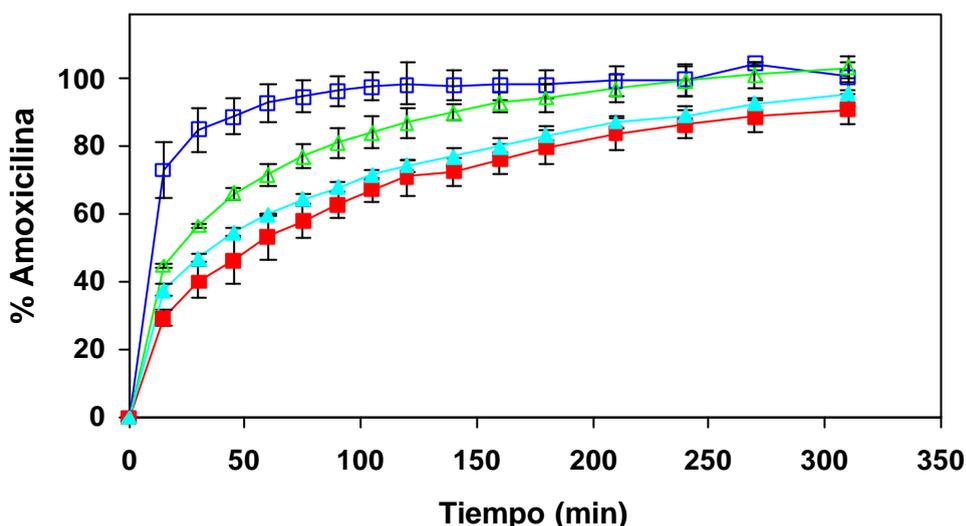


Figura 48. Perfiles de cesión de los siguientes complejos poliiónicos liofilizados de amoxicilina trihidrato: PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75M en medio simulado gástrico (- -) y en pH 4,0 (- -), PAA:CS:A (2,5:5:2)-1,75M en medio simulado gástrico (- -) y en pH 4,0 (- -).

En cambio, en pH 4,0, el complejo poliiónico (1:2,5:2)-1,75M presentó una cesión inicial muy alta, cerca del 70% de amoxicilina fue cedida después de 15 min, este resultado puede ser atribuido al colapso que sufre la red polimérica en este medio. El hidrogel (1:2,5:2)-1,75M exhibió un rápido perfil de cesión mostrando unos porcentajes de amoxicilina cedida superiores al 90 % en la primera hora. El complejo poliiónico PAA:CS:A (2,5:5:2)-1,75M presentó un valor de cesión inicial en pH 4,0 más bajo con cesiones del 42% a los 15 min. Este descenso puede ser atribuido a la existencia de una red interpolimérica más compacta. De forma similar este complejo presenta perfiles de disolución más rápidos en este medio de

pH 4,0. Estos resultados podrían deberse a los cambios sufridos en la cinética de hinchamiento de ambos hidrogeles en pH 4,0. Estos rápidos perfiles de disolución de ambas formulaciones podrían ser beneficiosos para conseguir una rápida cesión de amoxicilina después de salvar el medio gástrico. Resultados similares en medio intestinal simulado fueron obtenidos por Patel y col. (1996) desde hidrogeles basados en chitosán para el tratamiento de la infección de *H. pylori*.

VIII.3. Estudio del tránsito gástrico.

Para medir el vaciamiento gástrico de los dos complejos poliiónicos seleccionados y de una formulación de referencia, fue empleado el ácido octanoico marcado con [^{13}C], que es un isótopo estable no radioactivo. La **figura 49** muestra las cinéticas de cesión *in vitro* del ácido octanoico desde los dos hidrogeles en medios de distinto pH y la de ácido octanoico solo en medio simulado gástrico. El ácido octanoico presentó una velocidad de disolución rápida, un 73,46% del marcador estaba disuelto a los 15 min en medio simulado gástrico. Sin embargo la cesión del ácido octanoico desde los dos complejos poliiónicos sufrió un retraso en ambos pHs, en comparación con la formulación de referencia. Así, en las dos primeras horas los porcentajes de cesión desde los hidrogeles PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75M y (2,5:5:2)-1,75M en medio simulado gástrico fueron solo de un 34,0% y 25,57% respectivamente. Esta baja cesión de ácido octanoico desde ambos hidrogeles podría ser atribuida a la baja miscibilidad en medio acuoso de este ácido graso (muy ligeramente soluble en agua 0,068 g/100 g a 20°C, *Merck Index*, 2001). Así, una vez entrampado el marcador dentro de la red polimérica su miscibilidad con el solvente será muy baja y por tanto su perfil de disolución será muy lento, sin embargo los porcentajes de cesión de ácido octanoico desde diferentes comidas de prueba fue más bajo en otros estudios (Maes y col., 1994). Estas variaciones pueden ser debidas a las diferencias entre los métodos de disolución *in vitro* utilizados. El método que se ha empleado en esta tesis es el oficial para determinar la velocidad de disolución de distintos medicamentos y presenta frente al método de diálisis sin agitación empleado por Ghooos y col., 1993 diferencias importantes como

puede ser la agitación más energética que puede influir en gran medida sobre la cesión de principios activos de baja miscibilidad como el ácido octanoico. El fundamento de la prueba de aliento para medir el vaciamiento gástrico de sustancias sólidas está basado en lograr una buena fijación o retención del marcador, en este caso [¹³C]-ácido octanoico a la fase sólida de la comida durante los periodos de mezclado y molido del estómago. Una vez en el duodeno el marcador es absorbido, llegando a través de la vena porta al hígado, donde es oxidado liberando CO₂ marcado con [¹³C]. Es un hecho comprobado que el paso limitante es el vaciamiento gástrico y no el proceso posgástrico posterior (Ghoos y col., 1993; ^aMaes y col., 1994). Teniendo en cuenta que la retención del ácido octanoico en el complejo poliónico es mayor en medio simulado gástrico que en pH 4,0, el hidrogel podría ser un sustrato adecuado para evaluar el tiempo de vaciamiento gástrico.

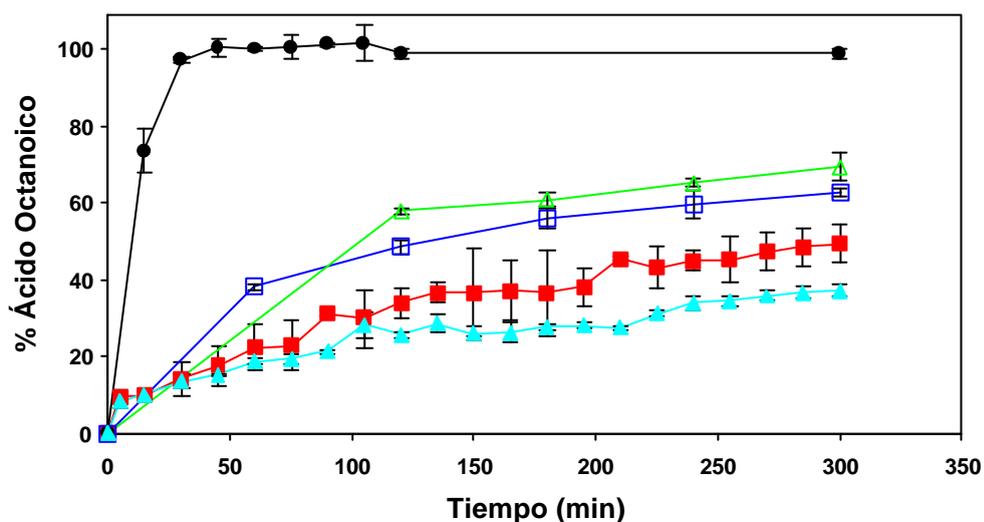


Figura 49. Perfiles de cesión de ácido octanoico a 37°C desde: el complejo poliónico liofilizado PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75M en medio simulado gástrico (- -) y en pH 4,0 (- -) y desde el complejo poliónico liofilizado PAA:CS:A (2,5:5:2)-1,75M en medio simulado gástrico (- -) y en pH 4,0 (- -). Y por último velocidad de disolución del ácido octanoico en medio simulado gástrico (- -).

En el caso de la formulación de referencia y el complejo poliónico (1:2,5:2)-1,75M, los valores experimentales de todos los voluntarios se ajustaron con menos error al modelo matemático 1 (ver **capítulo IV**). En cambio, en el ensayo con el hidrogel (2,5:5:2)-1,75M, los

valores experimentales de dos voluntarios sanos se ajustaron mejor al modelo matemático 2. En las **figuras 50-52** se muestran los valores experimentales medios de las tres formulaciones con sus respectivos ajustes a los dos modelos matemáticos.

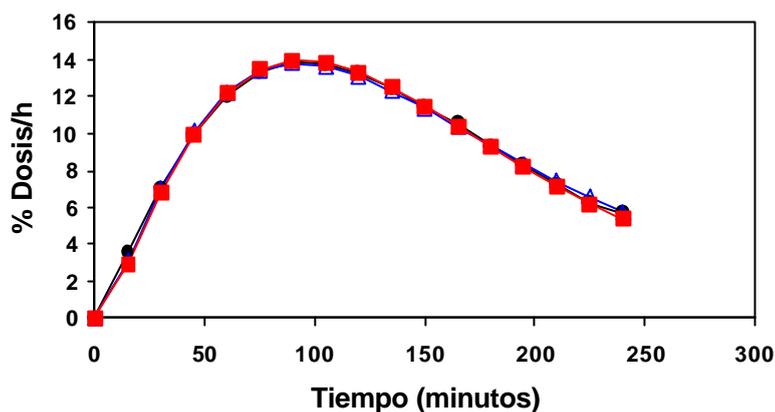


Figura 50. Valores medios experimentales de excreción de [$^{13}\text{CO}_2$] de la formulación de referencia marcada con [^{13}C - ácido octanoico] (- -), y perfiles obtenidos al ajustar los datos medios a los modelos matemáticos 1 (- -) y 2 (- -).

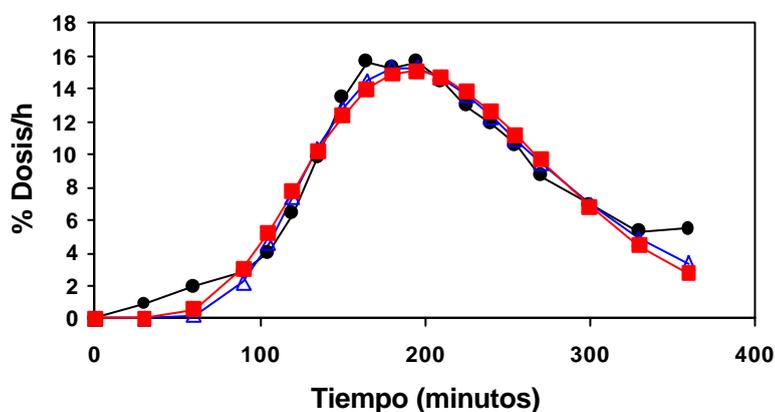


Figura 51. Valores medios experimentales de excreción de [$^{13}\text{CO}_2$] del complejo poliónico liofilizado PAA:CS:A (1:2,5:0)-1,75M marcado con [^{13}C - ácido octanoico] (- -), y perfiles obtenidos al ajustar los datos medios a los modelos matemáticos 1 (- -) y 2 (- -).

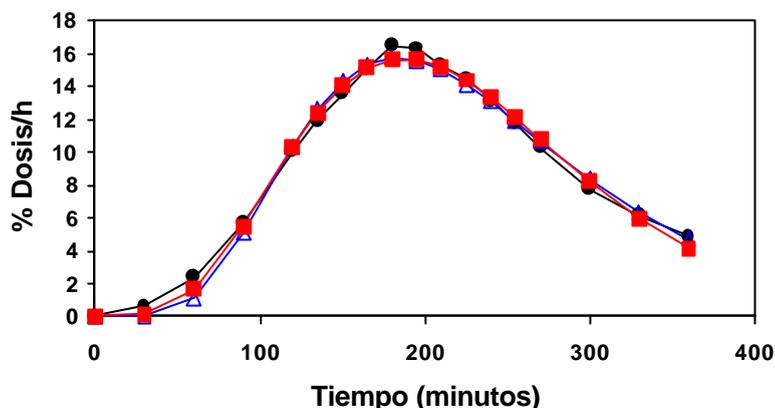


Figura 52. Valores medios experimentales de excreción de [$^{13}\text{CO}_2$] del complejo poliónico liofilizado PAA:CS:A (2,5:5:0)-1,75M marcado con [^{13}C - ácido octanoico] (- -), y perfiles obtenidos al ajustar los datos medios a los modelos matemáticos 1 (- -) y 2 (- -).

La **figura 53** compara los perfiles de excreción de [$^{13}\text{CO}_2$] de las dos formulaciones hinchables PAA:CS:A (1:2,5:0)-1,75M y PAA:CS:A (2,5:5:0)-1,75M frente al perfil de una formulación de referencia que presenta una cesión inmediata de ácido octanoico.

En las **figuras 54** y **55**, los parámetros calculados de las curvas individuales de excreción de [$^{13}\text{CO}_2$], $t_{1/2b}$ y t_{lagb} respectivamente, están resumidos para las tres formulaciones, y expresados como la mediana y rango de cuartiles (el inferior y el superior). La formulación de referencia presentó un tiempo de vaciamiento gástrico ($t_{1/2b}$) de 65,06 min (53,00-67,00), un t_{lagb} de 27,03 min (9,46-44,6) y un máximo valor de excreción de [$^{13}\text{CO}_2$] de 13,83 (12,35-15,31) % D/h. Similares valores de tiempo de residencia gástrica, con un valor medio de tiempo inicial de vaciamiento gástrico de 60 min en sujetos normales, fueron obtenidos por varios autores por medio de la prueba del aliento con [^{13}C]-ácido octanoico (Ghoos y col., 1993; ^bMaes y col., 1994). Sin embargo el complejo poliónico PAA:CS:A (1:2,5:0)-1,75M mostró un tiempo de vaciamiento gástrico retrasado en comparación con la formulación de referencia, con un valor de $t_{1/2b}$ de 134,81 min (112,24-152,82 $P=0,0000304829$), un t_{lagb} de 126,72 min (102,56-141,62 $P=0,0000317398$) y con un máximo valor de excreción de [$^{13}\text{CO}_2$] de 18,48% D/h (16,98-21,81 $P= 0,0000304829$). El hidrogel PAA:CS:A (2,5:5:0)-1,75M presentó valores parecidos al anterior complejo

poliiónico y significativamente diferentes a la formulación de referencia con un $t_{\frac{1}{2} b}$ de 137,72 min (130,79-144,07 $P=0,0000325133$), un $t_{lag b}$ de 132,01 min (118,08-137,67 $P=0,0000325133$), y con un máximo valor de excreción de $[^{13}\text{CO}_2]$ de 18,39 D/h (18,03-19,22 $P=0,0000325133$). Estos valores de $t_{\frac{1}{2} b}$ y de la fase lag mostraron un retraso significativo en el vaciamiento gástrico ($P<0,05$) en comparación con el valor de la formulación de referencia. En ambos hidrogeles no se encontraron diferencias significativas ($P>0,05$) entre los parámetros de vaciamiento gástrico estudiados.

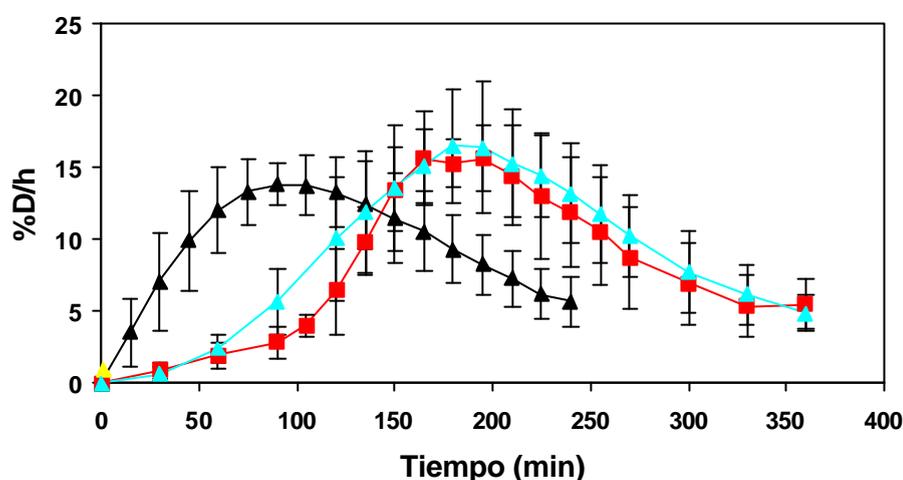


Figura 53. Perfiles de excreción de $[^{13}\text{CO}_2]$ de: la formulación de referencia marcada con ^{13}C - ácido octanoico (- -); el complejo poliiónico liofilizado PAA:CS:A (1:2,5:0)-1,75M marcado con ^{13}C - ácido octanoico (- -) y del complejo poliiónico liofilizado PAA:CS:A (2,5:5:0)-1,75M marcado con ^{13}C - ácido octanoico (- -).

Ambos complejos poliiónicos han aumentado la residencia gástrica del principio activo disuelto en el estómago. A la vista de estos resultados se puede anticipar que cualquiera de los dos hidrogeles podrá permanecer al menos 2h en el medio gástrico, y que habrá aproximadamente un 70,98% de amoxicilina cedida en ese fluido. Esto puede ser especialmente importante si tenemos en cuenta el trabajo de Endo y col. (2001) donde se encontraron concentraciones más altas de amoxicilina en el tejido gástrico después de su administración oral comparada con una administración intravenosa. Por lo tanto estos complejos poliiónicos proporcionarán elevados porcentajes de amoxicilina durante más de

dos horas en las zonas próximas al tejido gástrico lo cual puede ser importante para el tratamiento de *H. pylori*.

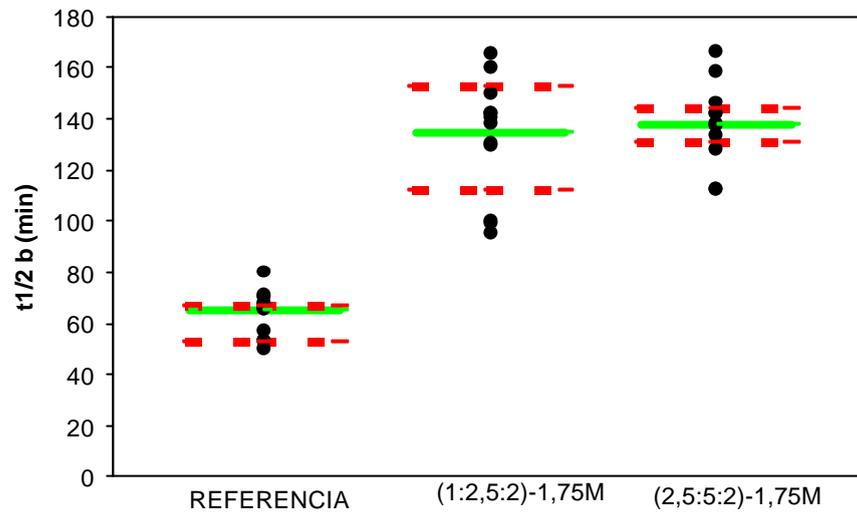


Figura 54. Valores individuales de semivida de vaciamiento gástrico de las tres formulaciones, junto con los valores de la mediana (____) y cuartiles inferior y superior(____).

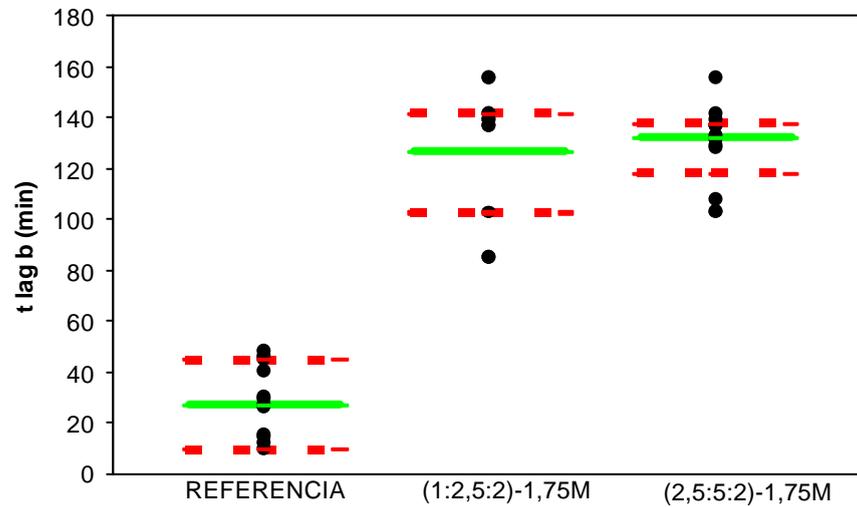


Figura 55. Valores individuales de fase lag de las tres formulaciones, junto con los valores de la mediana (____) y cuartiles inferior y superior(____).

VIII.4. Discusión parcial.

Los complejos poliiónico liofilizados muestran un perfil de cesión dependiente del pH del medio. El pH de la solución determina el grado de ionización de las cadenas poliméricas, y por lo tanto modifica el grado de hinchamiento y la difusión de la amoxicilina desde el hidrogel. Los dos complejos poliiónicos, tanto PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75M como (2,5:5:2)-1,75M proporcionan una cesión de amoxicilina sostenida en medio simulado gástrico, la cual permitirá una cesión controlada del antibiótico durante el tiempo de residencia gástrica de las dos formulaciones.

Sin embargo al aumentar el pH del medio (pH 4,0) se produce una cesión rápida tanto del antibiótico como del marcador ácido octanoico en los complejos poliiónicos PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75M, este resultado puede facilitar la cinética de difusión en la porción del tracto intestinal donde se produce una elevación del pH del medio gastrointestinal. Sin embargo los complejos poliiónicos PAA:CS:A (2,5:5:2)-1,75M siguen presentando perfiles de cesión sostenida al aumentar el pH del medio de disolución. Estos complejos poliiónicos podrían ser adecuados para emplearse en sistemas de tratamiento local de *H. pylori* en combinación con tratamientos convencionales que empleen agentes como el omeprazol, que provoca un incremento del pH del medio gástrico durante el tiempo de tratamiento.

El presente estudio sugiere o concluye que los complejos poliiónicos propuestos claramente prolongan su tiempo de residencia gástrica, en comparación con la formulación de referencia, y que ambos presentan un tiempo de residencia similar, con independencia de poseer cinéticas de hinchamiento diferentes. Esto podría deberse a que a partir de un grado de hinchamiento no se aumenta este tiempo de vaciamiento gástrico. Ambos hidrogeles proporcionan una oportunidad para mantener una adecuada concentración inhibitoria de antibiótico en zonas próximas al nicho ecológico de *H. pylori*, o al sitio diana.

VIII.5. Bibliografía.

- Bettini R., Colombo P., Peppas N. A. Solubility effects on drug transport through pH-sensitive, swelling-controlled release systems: transport of theophylline and metoclopramide monohydrochloride. *J. Control. Release* 37: 105-111 (1995).
- Bruno M.J., Borm J.J., Hoek F.J., Delzenne B., Hofmann A.F., De Goeij J.J., Van Royen E.A., Van Leeuwen D.J., Tytgat G.N.J., Gastric Transit and Pharmacodynamics of a two-millimeter enteric-coated pancreatin microspheres preparation in patients with chronic pancreatitis, *Dig. Dis. Sci.* 43 (1) 203-213 (1998).
- Endo H., Yoshida H., Ohmi N., Higuchi S. Effects of lansoprazole, clarithromycin and pH gradient on uptake of ¹⁴C amoxycillin into gastric tissue. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47, 405-410 (2001).
- Erah P.O., Goddard A.F., Barret D.A., Shaw P.N. y Spiller R.C. The stability of amoxycillin, clarithromycin and metronidazole in gastric juice: relevance to the treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 39: 5-12 (1997).
- Ghos Y. F., Maes B.D., Geypens B.J., Mys G., Hiele M.I., Rutgeerts P.J., Vantrappen G., Measurement of gastric emptying rate of solid by means of a carbon-labeled octanoic acid breath test, *Gastroenterology* 104 (6) 1640-1647 (1993).
- Kratz K., Hellweg T., Eimer W. Influence of charge density on the swelling of colloidal poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) microgels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 170, 137-149 (2000).

- Maes B.D., Ghoois Y.F., Rutgeerts P.J., Hiele M.I., Geypens B.J., Vantrappen G., octanoic acid breath test to measure gastric emptying rate of solids, *Digestive Diseases and Sciences* 39 (12): 104S-106S (1994).
- Maes B.D., Hiele M.I., Geypens B.J., Rutgeerts P.J., Ghoois Y.F., Vantrappen G., Pharmacological modulation of gastric emptying rate of solid as measured by the carbon labelled octanoic acid breath test: Influence of erythromycin and propantheline, *Gut* 35 (3): 333-337 (1994).
- The Merck Index, an encyclopedia of chemicals, drugs , and biologicals. 13th ed. Merck & Co., Inc. White house Station, NJ, USA, 2001.
- Meyer J.H., Elashoff J., Porter Fink V., Dressman J., Amidon G.L., Human postprandial gastric emptying of 1-3-millimeter spheres, *Gastroenterology* 94 (6) 1315-1325 (1988).
- Noble L., Gray A. I., Sadiq L. and Uchegbu I. F. A non-covalently cross-linked chitosan based hydrogel. *Int. J. of Pharmaceutics* 192: 173-182 (1999).
- Patel V. R., and Amiji M. M. Preparation and characterization of freeze-dried chitosan-poly (ethylene oxide) hydrogels for site-specific antibiotic delivery in the stomach. *Pharmaceutical Research* 13: 588-593 (1996).
- Perri F., Clemente R., Festa V., Annese V., Quitadamo M., Rutgeerts P., Andriulli A., Patterns of symptoms in functional dyspepsia: Role of *Helicobacter pylori* infection and delayed gastric emptying, *Am. J. Gastroenterol.* 93 (11) 2082-2088 (1998).
- De Prada P. Desarrollo de una formulación galénica para la cesión sostenida de amoxicilina en medio gástrico. Trabajo de investigación del 2º curso de doctorado (2001).

230 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

- Risbud M. V., Hardikar A. A., Bhat S. V. and Bhonde R. R. pH-sensitive freeze-dried chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogels as controlled release systems for antibiotic delivery. *J. Control. Release* 68: 23-30 (2000).
- ^aDe la Torre P.M., Torrado Susana, Torrado Santiago. Interpolymer complexes of poly(acrylic) acid and chitosan: influence of the ionic hydrogel-forming medium. *Biomaterials* 24: 1459-1468 (2003).
- ^bDe la Torre P.M., Enobakhare Y., Torrado G., Torrado S. Release of amoxicillin from polyionic complexes of chitosan and poly(acrylic) acid. Study of polymer/ polymer and polymer/ drug interactions within the network structure. *Biomaterials* 24: 1499-1506 (2003).

CAPÍTULO IX: ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE LA AMOXICILINA

En este capítulo se ha evaluado la estabilidad de la amoxicilina utilizando una técnica de HPLC durante el proceso de elaboración de los distintos complejos poliiónicos y posteriormente en el medio simulado gástrico sin enzimas (HCl 0,1N), empleando en los ensayos de velocidad de disolución.

De acuerdo con los trabajos de Erah y col. (1997) no sería necesario realizar estos estudios de estabilidad en medios de disolución con un pH superior (pH 4,0). En estos medios con un rango de pH de 4,0-7,0 la amoxicilina presenta una elevada estabilidad con porcentajes de degradación inferiores a un 0,4% después de 60 min. Estos resultados hacen que estos estudios de estabilidad se centren en un medio simulado gástrico sin enzimas (HCl 0,1N).

Este método de HPLC es selectivo para la determinación del tiempo de retención de la amoxicilina sin degradar (ver **capítulo V**). Se observó que el antibiótico y sus productos de degradación seguían cinéticas bifásicas a lo largo del tiempo del estudio (ver **figura 56**). El principio activo presentaba una cinética bifásica en sentido decreciente, con una primera fase de aceleración en el intervalo de tiempo de 0 a 140 min, en la cual se produce una degradación mucho más rápida de amoxicilina, a continuación le sigue una fase más lenta, en la que se consigue el mismo porcentaje de degradación en el doble de tiempo que en la fase anterior. En cambio los productos de degradación presentaron en general cinéticas bifásicas a los mismos intervalos de tiempo, pero en sentido creciente, con una primera fase más rápida hasta los 140 min, aunque mostraban perfiles con distintas pendientes.

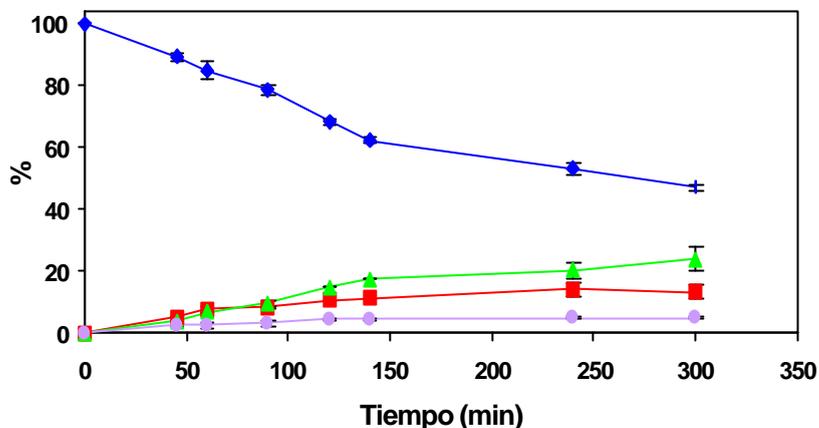


Figura 56. Cinéticas de degradación de amoxicilina (- -) y sus productos de degradación (- - -, - - - y - - -).

Los dos principales productos que aparecen al degradarse la amoxicilina son los siguientes: N-(4-hidroxifenil)-glicina y el ácido (+)-6-aminopenicilánico (Xu y col., 1999 y Bhattacharyya y col., 1978). Se intentaron caracterizar estos dos compuestos (ver **figuras 57 y 58**), pero los picos de ambos productos presentaban tiempos de retención bastante similares (5,887 y 5,977 min, respectivamente), por tanto el método no era selectivo para su determinación, imposibilitando su cuantificación y su posterior estudio cinético. Además, durante los estudios se observó que estos primeros productos de degradación sufren transformaciones a nuevos productos de degradación, como ácido penílico, ácido penáldico, penicilamina y peniloaldeído, dificultando el seguimiento de los distintos productos que van apareciendo en posteriores hidrólisis. Estos productos de degradación que aparecen durante los estudios de estabilidad en medio gástrico sin enzimas han sido ampliamente estudiados y al no presentar toxicidad hace que la Real Farmacopea Española (2000) indique que solo se debe cuantificar la disminución del porcentaje de amoxicilina durante la evaluación de estabilidad. Asimismo, el hidrogel seleccionado para estos estudios no interfirió en la determinación de la amoxicilina por HPLC.

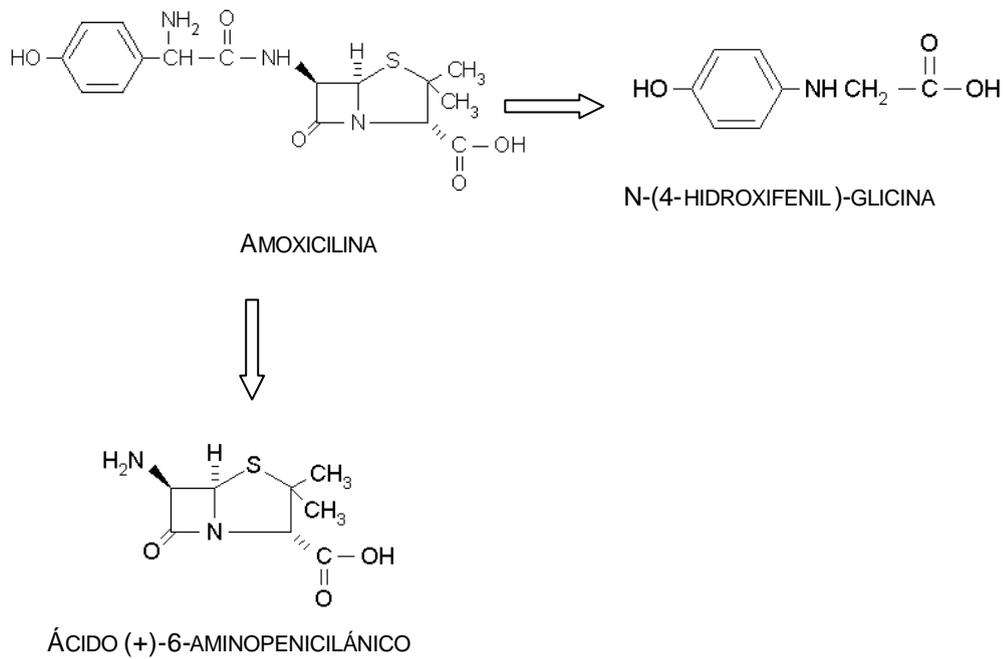


Figura 57. Primeros productos de degradación de la amoxicilina.

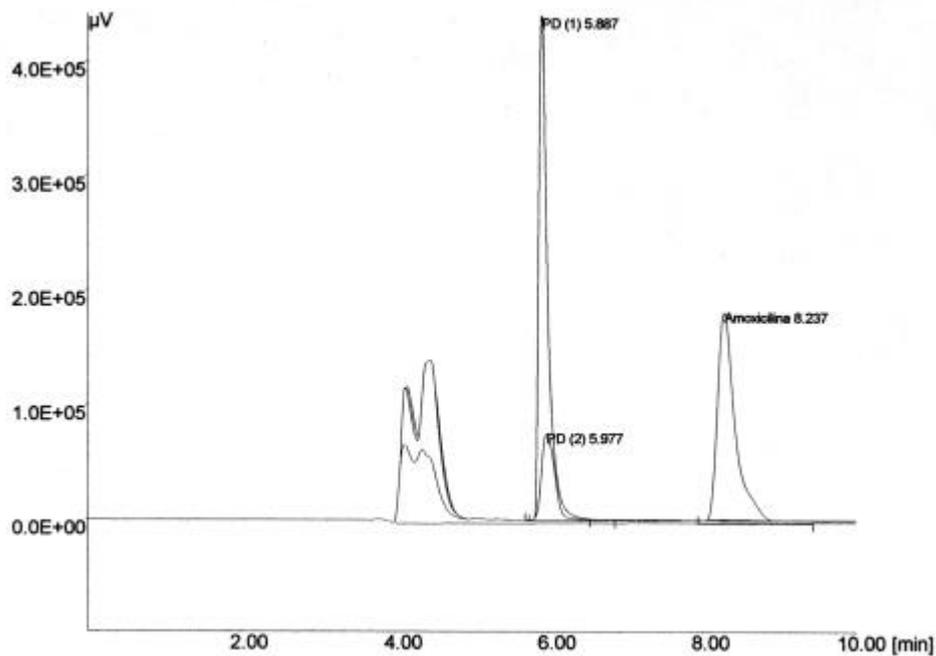


Figura 58. Cromatogramas superpuestos de las siguientes muestras patrón de igual concentración (10 g/ml) recién preparadas en HCl 0,1 N: amoxicilina, N-(4-hidroxifenil)-glicina (PD 1) y ácido (+)-6-aminopenicilánico (PD 2).

IX. 1. Estudio de estabilidad de la amoxicilina en los medios de solución empleados en la producción de los distintos hidrogeles.

Se realizó un estudio de degradación a temperatura ambiente (25°C) durante más de 5h en los dos medios de disolución más concentrados de ácido acético y en medio simulado gástrico:

- HCl 0,1 N
- Ácido acético 3,5 M
- Ácido acético 5,25 M

En la **figura 59** se observa que al final del estudio (315 min.) se degradó menos del 14 % de amoxicilina en los tres medios empleados, y no se observaron diferencias entre los medios HCl 0,1 N y ácido acético 3,5 M, presentando solo diferencias significativas ($P < 0,05$) con los porcentajes de degradación del medio ácido acético 5,25M donde hay una menor pérdida de principio activo, en ese intervalo de tiempo. Por tanto se considera que la amoxicilina es estable en los tres medios durante el tiempo que dura la producción de los hidrogeles (1 hora).

Para evitar la degradación de la amoxicilina en estos medios se marcó el tiempo de una hora como tiempo límite. En este tiempo se tienen que realizar los siguientes procesos: la neutralización del pH del gel con NaOH 3M hasta alcanzar valores de pH próximos a 4,5 y su congelación antes de someterlo al proceso de liofilización. Con este nuevo valor de pH del medio el hidrogel liofilizado será mucho más estable.

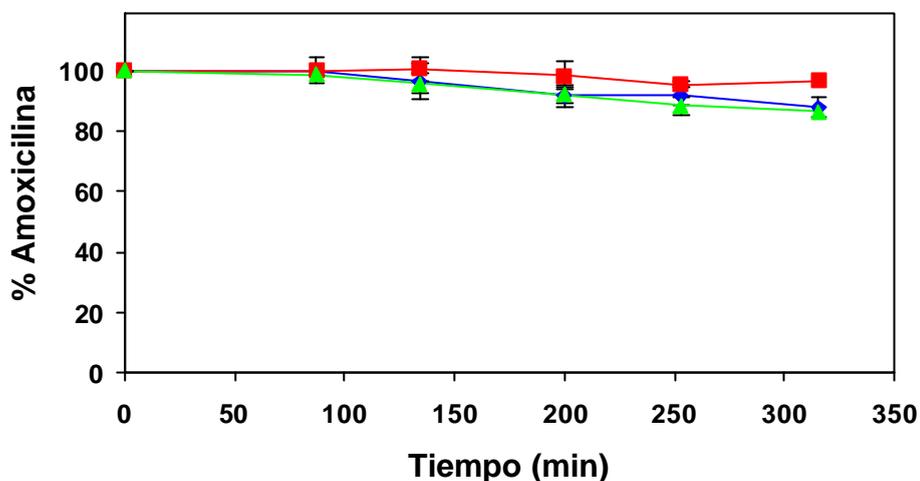


Figura 59. Estudio de degradación de la amoxicilina a temperatura ambiente en los siguientes medios de generación de hidrogeles: ácido acético 3,5 M (-♦-), y 5,25M (-■-) y HCl 0,1 N (-▲-).

IX. 2. Estudio de estabilidad de la amoxicilina en diferentes formulaciones en medio simulado gástrico (HCl 0,1 N).

En la **figura 60** se observa el estudio donde se ha evaluado la estabilidad de diferentes formulaciones con una cantidad equivalente de amoxicilina, después de determinar la riqueza del complejo poliónico seleccionado (ver **capítulo IV**). Las formulaciones fueron las siguientes:

- Solución de amoxicilina en HCl 0,1N.
- Cápsulas de amoxicilina sin excipientes.
- Complejo poliónico liofilizado PAA:CS:A (2,5:5:2)-1,75M

A los 140 min, que es aproximadamente el tiempo equivalente a la semivida de vaciamiento gástrico del hidrogel seleccionado, los porcentajes de pérdida del principio activo en la cápsula, la solución y el complejo poliónico fueron de: 44,14%, 37,67% y 12,30% respectivamente. Los perfiles de degradación de la cápsula y de la solución eran

similares, observándose que ambos presentaban una cinética de pseudo primer orden. En cambio, durante la cinética de disolución desde el complejo poliiónico PAA:CS:A (2,5:5:2)-1,75M había una combinación de la cesión del principio activo con su degradación, manteniendo una concentración superior al 75% de amoxicilina sin degradar durante aproximadamente 180 min.

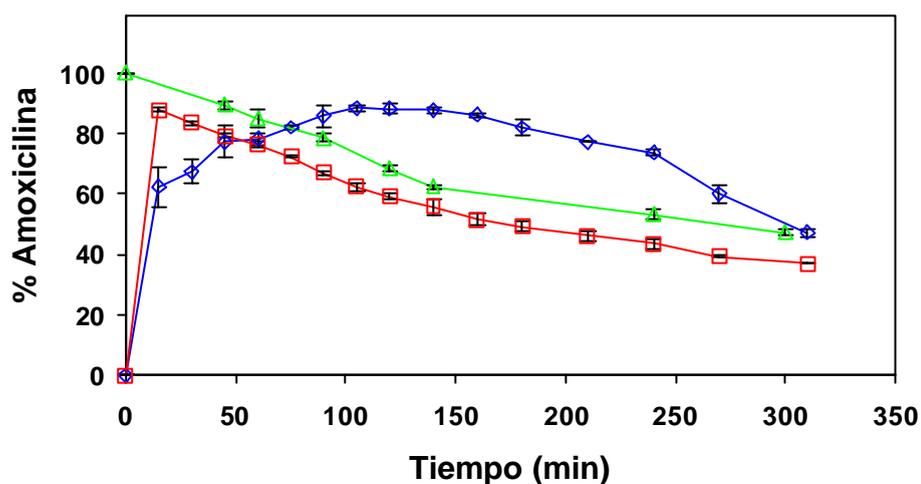


Figura 60. Cinéticas de degradación de la amoxicilina en las siguientes formulaciones: solución (- -), capsulas (- -) y complejo poliiónico PAA:CS:A (2,5:5:2)-1,75M (- -).

IX.3. Discusión parcial.

Se ha desarrollado un método de HPLC con una adecuada selectividad para la determinación de la amoxicilina sin degradar.

En los medios de generación de los hidrogeles más del 98% de la amoxicilina es estable a la hora, por tanto durante la producción de los complejos poliiónicos no se producirán degradaciones debidas a las condiciones de los medios empleados.

En medio simulado gástrico sin enzimas, se ha observado que en la cápsula de cesión inmediata, el porcentaje de amoxicilina estable a las 2h fue solo de un $59,24 \pm 1,06\%$. Esta alta degradación podría ser atribuida al bajo pH de 1,2, y ha sido previamente descrito por otros autores (Erah y col., 1997). En el caso del complejo poliiónico, PAA:CS:A (2,5:5:2)-1,75M, la amoxicilina estaba atrapada dentro de la red polimérica y por lo tanto, estaba protegido del medio externo. Aproximadamente un $88,27 \pm 1,7\%$ del principio activo estable fue encontrado a las 2h después de cuantificar el porcentaje total de la amoxicilina en el medio de disolución y dentro del hidrogel.

Los complejos poliiónicos presentan una cesión sostenida durante estas dos horas, este mecanismo permite que exista un menor tiempo de contacto con el medio de pH 1,2, mejorando la semivida de degradación de la amoxicilina en el fluido gástrico. Por lo tanto, la concentración de este antibiótico estará muy por encima de los valores de CMI_{90} descritos para *H. pylori in vitro* en la cavidad gástrica durante más de dos horas.

IX.4. Bibliografía.

- Bhattacharyya P.K. y Winifred M.C. Amoxicillin pg 20-41. Analytical profiles of Drug substances. Vol. 7. Ed. Flori K. 1978.
- Erah P.O., Goddard A.F., Barret D.A., Shaw P.N. y Spiller R.C. The stability of amoxicillin, clarithromycin and metronidazole in gastric juice: relevance to the treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 39: 5-12 (1997).
- Real Farmacopea Española, segunda edición. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, 2002.
- Xu Q.A. y Lawrence A. Trissel L.A. Stability-Indicating HPLC Methods for Drug Analysis. American Pharmaceutical Association, Pharmaceutical Press, London, England (1999).

CAPÍTULO X: ESTUDIO *IN VIVO* DE LA INFLUENCIA DEL AUMENTO DEL pH INTRAGÁSTRICO EN EL TIEMPO DE VACIAMIENTO GÁSTRICO DEL COMPLEJO POLIIÓNICO SELECCIONADO.

En este capítulo se estudia si el pH del medio intragástrico afecta al tiempo de vaciamiento gástrico de los hidrogeles. Para estos estudios se ha seleccionado el complejo poliónico PAA:CS:A (2,5:5:2), que se caracteriza por presentar una cesión sostenida de la amoxicilina, tanto en medio simulado gástrico sin enzimas (HCl 0,1N) como en medios con valores de pH más elevados. Estos estudios se realizan en voluntarios sanos por medio de la prueba del aliento con ácido octanoico marcado con [¹³C], en tres diferentes situaciones: (i) en condiciones basales (sin medicación); (ii) 30 min después de la administración de 20 mg de omeprazol, en el séptimo día de un pre-tratamiento con 20 mg de omeprazol, una vez al día, durante 6 días y (iii) 30 min después de la administración de 1,5 g de Almax[®] Forte (almagato), en el séptimo día de un pre-tratamiento con 1,5 g de almagato, dos veces al día, durante 6 días. Los sujetos tuvieron un periodo de descanso de 10 días entre cada tratamiento para evitar posibles interacciones.

La concentración de amoxicilina debe incrementarse en la zona del tejido gástrico, para mejorar su efecto erradicador de *H. pylori*. Esto puede conseguirse de las siguientes maneras: aumentando la permanencia de la formulación en la cavidad gástrica e incrementando el paso del antibiótico a través del tejido gástrico. Se ha confirmado para este antibiótico que un aumento de pH ayuda a este paso a través de la pared de la mucosa gástrica (Endo y col., 2001). De esta manera se ha estudiado la influencia del aumento del pH intragástrico en la residencia gástrica del hidrogel seleccionado utilizando dos tipos de medicamentos: a) omeprazol, un inhibidor de la bomba de protones que actúa de manera sistémica y que puede aumentar el tiempo de vaciamiento gástrico (Benini y col., 1996), y b)

244 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

almagato, un antiácido no sistémico, que al contener magnesio también retrasa el vaciamiento gástrico (Geboes y col., 2002).

La relación de PAA:CS:A del hidrogel formado por chitosán y Carbopol® 974P NF sin amoxicilina que se ha evaluado en este estudio es la siguiente: (2,5:5:2)-1,75M. Se incorpora a 100 mg de cada formulación 91 mg de ácido octanoico, marcado con [¹³C], adsorbido sobre el hidrogel.

X.1. Estudios de tránsito gástrico.

La **figura 61** compara la media de los perfiles de excreción de [¹³CO₂] del complejo poliónico PAA:CS:A (2,5:5:0)-1,75M en tres diferentes situaciones: en condiciones basales (sin ningún tipo de pre-tratamiento); después de un tratamiento con omeprazol, y con almagato. Después del pre-tratamiento con omeprazol el perfil de excreción de [¹³CO₂] del hidrogel es claramente más bajo, rápido y con pendientes ascendentes y descendentes menos inclinadas comparado a la curva de excreción en condiciones basales, en cambio después del pre-tratamiento con almagato el perfil es inesperadamente más lento, también con pendientes menos pronunciadas y valores de [¹³C] más bajos que el del hidrogel sin pre-tratamiento. En las **figuras 62 y 63**, los parámetros calculados de las curvas individuales de excreción de [¹³CO₂], $t_{1/2b}$ y t_{lagb} respectivamente, están resumidos para las tres diferentes situaciones, y expresados como la mediana y rango de cuartiles (el inferior y el superior). En los sujetos después del pre-tratamiento con omeprazol el vaciamiento gástrico del hidrogel fue significativamente más rápido que en el grupo sin pre-tratamiento: la semivida de vaciamiento gástrico fue de 112,34 min (109,98-122,94; $P=0,00426488$) y la fase lag fue de 104,97 min (96,76-110,81; $P=0,00243687$). Sin embargo, después del pre-tratamiento con almagato los parámetros de vaciamiento gástrico del complejo poliónico mostraron valores ligeramente más retrasados, en comparación con los que se obtuvieron bajo condiciones basales, con un valor de $t_{1/2b}$ de 170,11 min (142,21-173,93 $P=0,00616675$), una t_{lagb} de 158,31 min (130,81-164,38, $P=0,0337261$). Al comparar los resultados obtenidos con el pre-

tratamiento de omeprazol y con el de almagato se encontraron diferencias significativas en los valores de $t_{1/2 b}$ ($P=0,0000555089$) y de $t_{lag b}$ ($P=0,0000930411$). Con respecto a los valores experimentales de los distintos tratamientos sólo uno de los 12 voluntarios bajo pre-tratamiento con almagato mostró datos erróneos en el análisis por espectroscopía de masas, atribuida a un error en la toma de muestras.

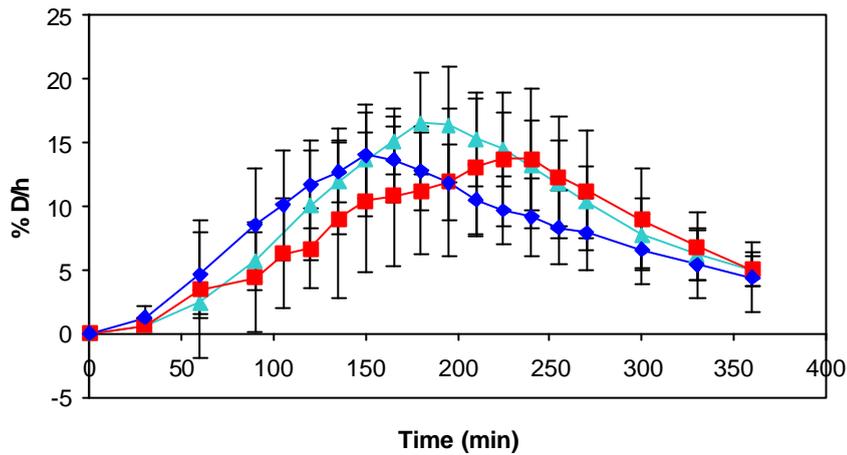


Figura 61. Perfiles de excreción de $[^{13}\text{CO}_2]$ de: el complejo poliiónico liofilizado PAA:CS:A (2,5:5:0)-1,75M marcado con ^{13}C - ácido octanoico en condiciones basales (- -), después de pre-tratamiento con omeprazol y (-◆-) después de pre-tratamiento con almagato (- -).

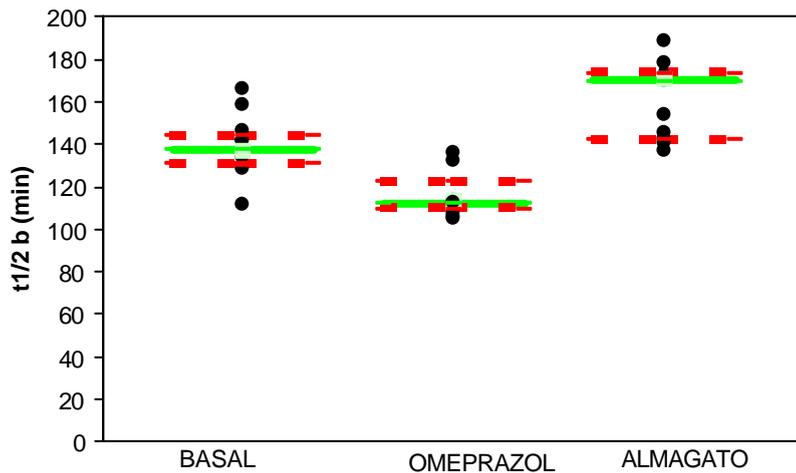


Figura 62. Valores individuales de semivida de vaciamiento gástrico en las tres situaciones, junto con los valores de la mediana (—) y cuartiles inferior y superior(---).

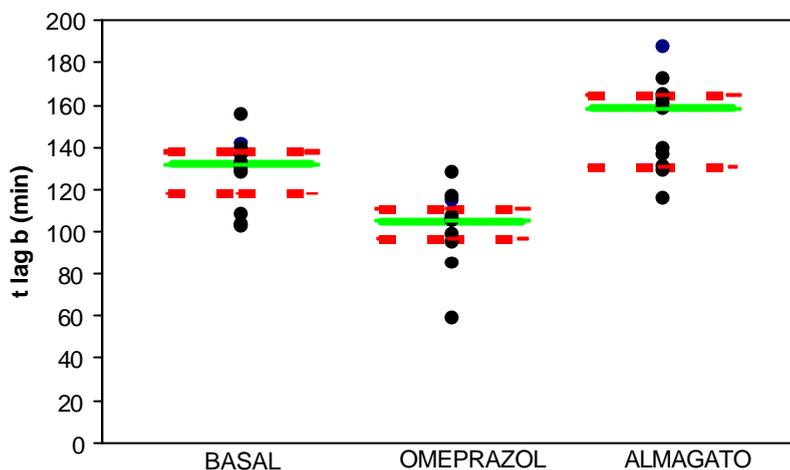


Figura 63. Valores individuales de fase lag en las tres situaciones, junto con los valores de la mediana (—) y cuartiles inferior y superior(---).

En el ensayo con el hidrogel (2,5:5:2)-1,75M en condiciones basales y después del pre-tratamiento con almagato, los valores experimentales de dos voluntarios sanos se ajustaron mejor al modelo matemático 2. En el caso del pre-tratamiento con omeprazol los valores experimentales de los voluntarios se ajustaron en todos los casos con menos error, al modelo matemático 1 a excepción de un voluntario que presentaba un mejor ajuste al modelo 2. En las **figuras 64** y **65** se muestran los valores experimentales medios del hidrogel bajo los dos tipos de pre-tratamientos con sus respectivos ajustes a los dos modelos matemáticos.

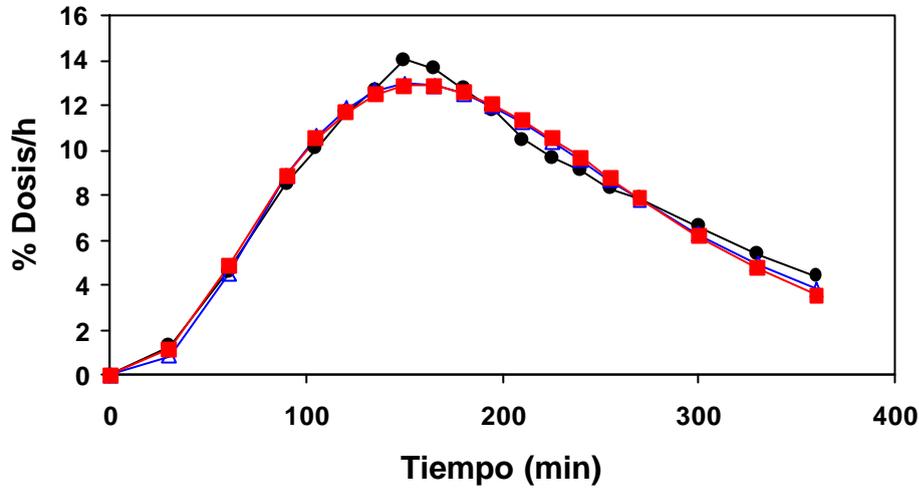


Figura 64. Valores medios experimentales de excreción de [$^{13}\text{CO}_2$] después del pre tratamiento con omeprazol del complejo poliiónico liofilizado PAA:CS:A (2,5:5:0)-1,75M marcado con ^{13}C - ácido octanoico (- -), y perfiles obtenidos al ajustar los datos medios a los modelos matemáticos 1 (- -) y 2 (- -).

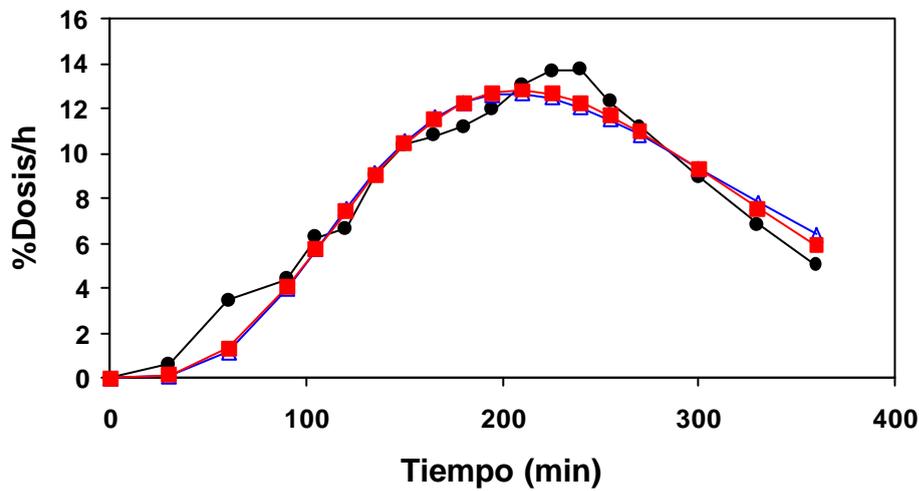


Figura 65. Valores medios experimentales de excreción de [$^{13}\text{CO}_2$] después del pre tratamiento con almagate del complejo poliiónico liofilizado PAA:CS:A (2,5:5:0)-1,75M marcado con ^{13}C - ácido octanoico (- -), y perfiles obtenidos al ajustar los datos medios a los modelos matemáticos 1 (- -) y 2 (- -).

X.2. Discusión parcial.

Algunas nuevas terapias, como por ejemplo hidrogeles, para el tratamiento de *H. pylori* están centradas en alcanzar mayores tiempos de residencia gástrica, como ya ha sido descrito previamente (ªde la Torre y col., 2003 y ºde la Torre y col., 2003). Con el fin de evaluar el papel o la influencia del omeprazol y almagato en el hidrogel seleccionado como tratamiento local, se hizo un estudio en sujetos sanos por medio de la prueba del aliento con [¹³C] ácido octanoico en tres situaciones diferentes.

En primer lugar se realizaron estudios del hidrogel bajo condiciones basales (sin pre-tratamiento).

En segundo lugar se efectuaron estudios después de un pre-tratamiento con omeprazol durante 7 días en total, este inhibidor de la bomba de protones aumenta su biodisponibilidad alcanzando una actividad terapéutica máxima en los pacientes después de cinco días de tratamiento. Esto puede ser debido a que se reduce el metabolismo de primer paso, debido a la saturación de las enzimas hepáticas del sistema multienzimático P-450, contribuyendo a incrementar de esta manera su biodisponibilidad (McColl y col., 2002 y Lew y col., 1999).

Por último se llevó a cabo un estudio después de seguir un pre-tratamiento con almagato durante 7 días. Recientes estudios (Geboes y col., 2002) han demostrado que la administración oral de una única dosis de cloruro de magnesio retrasa el vaciamiento gástrico pero no ejerce ninguna influencia en la digestión de los lípidos. El empleo de antiácidos como el Almax[®] Forte (almagato) con altos contenidos en magnesio podrían ser interesantes para conseguir retrasos en el vaciamiento gástrico.

En este estudio, al evaluar la residencia gástrica del complejo poliónico PAA:CS:A (2,5:5:0)-1,75M marcado con [¹³C] ácido octanoico en sujetos sin pre-tratamiento, y después de tomarlo junto con una comida estándar de 250 Kcal., el hidrogel mostró una semivida de vaciamiento gástrico y una fase lag más retrasada en comparación con los resultados obtenidos por varios autores mediante la misma técnica, cuando estudiaban el vaciamiento gástrico de distintas comidas sólidas de prueba, que pueden ser considerados como valores

de referencia de vaciamiento de sustancias sólidas en voluntarios sanos: así $t_{1/2b}$ de 71,22 min, 72 min y 88 min fueron obtenidos por Maes y col., 1994, Maes y col., 1999 y Perri y col., 1998. También este retraso es mayor en comparación con la formulación de referencia estudiada en el **capítulo VIII**. Este resultado sido debido a las propiedades de hinchamiento de este hidrogel, ya que se produce un importante aumento en el tamaño de partícula, parámetro que es considerado por distintos autores como una causa importante en el retraso del vaciamiento gástrico (Wilding y col., 2000, Bruno y col., 1998, Billa y col., 2000).

En el empleo de un pre-tratamiento con omeprazol durante una semana los valores de $t_{1/2b}$ y t_{lagb} mostraron una tendencia significativa a disminuir sus valores comparado con el tratamiento del hidrogel en medio ácido. Sin embargo, otros autores (Evenepoel y col., 1998) han descrito que no obtuvieron diferencias significativas en los valores de $t_{1/2b}$ y t_{lagb} después de un pre-tratamiento de 2 días con 40 mg de omeprazol. Aunque el grupo de pacientes podría no ser lo suficientemente amplio pensamos que la presencia de valores menores de delta [^{13}C] en la muestra con pre-tratamiento del inhibidor de la bomba de potasio, podrían ser atribuidos a una interacción en el sistema del citocromo P-450. Las enzimas de este sistema, aunque se encuentran en la mayoría de los tejidos, están más concentradas en el hígado, donde se encargan de transformar sustancias lipofílicas, como el ácido octanoico, en compuestos polares. El omeprazol ha demostrado un gran potencial para interaccionar con enzimas en el sistema P-450, y de inducir la síntesis de las enzimas CYP1A1 y CYP1A2, las cuales están relacionadas en el metabolismo de diferentes tipos de principios activos (Díaz y col., 1990). También existen trabajos en los que consideran que el omeprazol puede normalizar la motilidad gastroduodenal en pacientes con úlcera y dispepsia (Bortolotti y col., 1999), o que causa retrasos en el vaciamiento gástrico en sujetos sanos (Benini y col., 1996).

Sin embargo, después del pre-tratamiento con almagato el vaciamiento gástrico del complejo poliiónico mostró valores ligeramente más retrasados, en comparación con los que se obtuvieron en condiciones normales de pH intragástrico. Estudios previos han confirmado que los compuestos que contienen magnesio pueden ejercer un efecto en las funciones gástricas motoras causando un retraso en el vaciamiento gástrico (Geboes y col., 2002). Estos resultados coinciden con el trabajo de Mones y col. (1991) que ha evaluado el

250 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

vaciamiento gástrico de antiácido no sistémicos con ^{99m}Tc , en estas condiciones se determinaron porcentajes de $t_{1/2}$ remanentes en el estómago inferiores a $86,6 \pm 15,3$ min para el magaldrato, antiácido con magnesio y $52,3 \pm 5,2$ min para el Maalox, el cual contiene solo carbonato de calcio en su composición. Por lo tanto, la disponibilidad de ciertos principios activos en el estómago puede estar influenciada por la administración de algunos antiácidos, mejorando el tratamiento erradicador de *H. pylori*.

X.3. Bibliografía.

- Benini L., Castellani G., Bardelli E., Sembenini C., Brentegani M.T., Caliaris. Y Vantini I. Omeprazole causes delay in gastric emptying of digestible meals. *Dig. Dis. Sci.* 41(3): 469-74 (1996).
- Billa N., Yuen K.H., Khader M.A., Omar A., Gamma-sintigraphic study of the gastrointestinal transit and *in vivo* dissolution of a controlled release diclofenac sodium formulation in xanthan gum matrices, *Int. J. Pharm.* 201 (1): 109-120 (2000).
- Bortolotti M., Brunelli F., Sarti P., Mari C. y Miglioli M. Effect of omeprazole on interdigestive gastroduodenal motility of patients with ulcer-like dyspepsia. *Hepatogastroenterology* 46(25): 588-93 (1999).
- Bruno M.J., Borm J.J., Hoek F.J., Delzenne B., Hofmann A.F., De Goeij J.J., Van Royen E.A., Van Leeuwen D.J., Tytgat G.N.J., Gastric Transit and Pharmacodynamics of a two-millimeter enteric-coated pancreatin microspheres preparation in patients with chronic pancreatitis, *Dig. Dis. Sci.* 43 (1) 203-213 (1998).
- Diaz D., Fabre I., Daujat M. et al. Omeprazol is an aryl hydrocarbon-like inducer of human hepatic cytochrome P450. *Gastroenterology* 99: 737-47 (1990).

- Endo H., Yoshida H., Ohmi N., Higuchi S. Effects of lansoprazole, clarithromycin and pH gradient on uptake of ¹⁴C amoxicillin into gastric tissue. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47, 405-410 (2001).
- Evenepoel P., Claus D., Geypens B., Maes B., Hiele M., Rutgeers P. e Ghooos Y. Evidence for impaired assimilation and increased colonic fermentation of protein, related to gastric acid suppression therapy. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 12: 1011-1019 (1998).
- Geboes K.P., Maes B., Luypaerts A., Evenepoel P., Rutgeerts P., Ghooos Y. y Geypens B. Magnesium chloride slows gastric emptying, but does not affect digestive functions. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 16: 1571-1577 (2002).
- Ghooos Y. F., Maes B.D., Geypens B.J., Mys G., Hiele M.I., Rutgeerts P.J., Vantrappen G., Measurement of gastric emptying rate of solid by means of a carbon-labeled octanoic acid breath test, *Gastroenterology* 104 (6) 1640-1647 (1993).
- Maes B.D., Hiele M.I., Geypens B.J., Rutgeerts P.J., Ghooos Y.F., Vantrappen G., Pharmacological modulation of gastric emptying rate of solid as measured by the carbon labelled octanoic acid breath test: Influence of erythromycin and propantheline, *Gut* 35 (3) (1994) 333-337.
- Maes B.D., Spitz B., Ghooos Y.F., Hiele M.I., Evenepoel P., Rutgeerts P.. Gastric emptying in hyperemesis gravidarum and non-dyspeptic pregnancy. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 13: 237-243 (1999).
- McColl K.E., Kennerley P.. Proton pump inhibitors-differences emerge in hepatic metabolism. *Dig. Liver Dis* 34 (7): 461-7 (2002).

266 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

6. En los estudios *in vivo*, los complejos poliiónicos seleccionados, PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75M y (2,5:5:2)-1,75M, presentaron un retraso significativo en comparación con una formulación de referencia de cesión inmediata.
7. En el tiempo equivalente a la residencia gástrica de los hidrogeles seleccionados, la amoxicilina es cuatro veces más estable en el complejo poliiónico que en las formulaciones de referencia (cápsulas convencionales y solución), obteniéndose porcentajes mayores del 75% de amoxicilina sin degradar durante 3h desde el complejo poliiónico seleccionado.
8. Después de un pre-tratamiento con omeprazol la residencia gástrica del hidrogel seleccionado disminuye significativamente en comparación con los parámetros de vaciamiento gástrico obtenidos por la misma formulación en condiciones basales.
9. Después de un pre-tratamiento con almagato, antiácido que contiene magnesio en su composición, se consiguen tiempos de vaciamiento gástrico del hidrogel.
10. Los hidrogeles liofilizados desarrollados en este trabajo son candidatos adecuados para su empleo junto con terapias convencionales, que siguen una ruta sistémica normal, en los tratamientos erradicadores de *H. pylori*,

DISCUSIÓN FINAL

Se han realizado diferentes hidrogeles liofilizados compuestos por quitosán y ácido poliacrílico, unidos por enlaces no covalentes para la administración gástrica de amoxicilina en el tratamiento de *H. pylori*. Se ha estudiado la influencia de varias relaciones de ambos polímeros, la utilización de amoxicilina no ionizada o en forma de sal sódica, la fuerza iónica y el volumen del medio formador del hidrogel. A continuación se seleccionaron dos formulaciones para el estudio de su tránsito gástrico, por medio de la prueba del aliento con ácido octanoico marcado con [¹³C]. Asimismo se realizó un estudio comparativo de la estabilidad de la amoxicilina en medio simulado gástrico en tres tipos de formulaciones galénicas distintas: en solución, en cápsulas convencionales y en hidrogel mediante HPLC. Por último se estudio la influencia de la administración de dos fármacos (omeprazol y almagato) que elevan el pH intragástrico en el tránsito gástrico de un hidrogel seleccionado.

Se realizaron hidrogeles formados por distintas relaciones de quitosán (CS) y ácido poliacrílico (PAA) unidos por enlaces no covalentes, con amoxicilina trihidrato o sódica.

La caracterización de los distintos complejos poliiónicos se ha realizado mediante estudios de microscopía electrónica de barrido, espectroscopia infrarroja, estudios de hinchamiento/ erosión de los complejos poliiónicos y de velocidad de disolución de los dos tipos de principio activo en medio simulado gástrico (HCl 0,1N).

En la caracterización física por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM), se observó que los hidrogeles sin PAA presentaban una superficie irregular sin poros o con pocos orificios irregulares, que iban modificándose al aumentar la cantidad de CS en el hidrogel. En cambio al añadir PAA a las formulaciones las estructuras siempre presentaban poros, cuya morfología y tamaño dependían de la relación polimérica de CS y PAA. En los

256 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

complejos poliiónicos de CS y PAA con amoxicilina trihidrato estos poros tienen un tamaño y disposición regular cuando empleamos pequeñas proporciones de CS en la formulación (PAA:CS:A 1:2,5:2), al contrario de lo que ocurre en los complejos poliiónicos con amoxicilina sódica, donde relaciones con mayores cantidades de CS (PAA:CS:A-NA 1:5:2) presentan una estructura porosa más regular. Esto puede ser debido a una interacción electrostática diferente según el tipo de amoxicilina presente en la formulación.

En los estudios de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (IRTF), se han observado cambios importantes entre los espectros de las materias primas (CS y PAA sin liofilizar) y el del hidrogel liofilizado. Éstos pueden ser consecuencia del proceso de producción del hidrogel, en el que se emplean soluciones de ácido acético e hidróxido sódico, observándose unas bandas debidas a los grupos COO^- ($1413,05 \text{ cm}^{-1}$ y $1558,59 \text{ cm}^{-1}$) y otra atribuida a NH_3^+ ($1640,10 \text{ cm}^{-1}$). Por lo tanto estos hidrogeles son complejos poliiónicos que presentan uniones electrostáticas entre ambos tipos de cadenas poliméricas, y la amoxicilina se encuentra atrapada en el interior de esta matriz polimérica. La presencia de estas señales con intensidades elevadas impiden observar las interacciones electrostáticas entre el principio activo y ambos polímeros.

En los estudios cinéticos de hinchamiento y erosión, se observó, que como cabía esperar, al aumentar la cantidad de CS en todas las formulaciones aumentaba el grado de hinchamiento máximo. Esto podría ser atribuido a la protonación de las aminas del chitosán en medio simulado gástrico. En los hidrogeles sin PAA, la erosión era más rápida en las formulaciones con una menor cantidad de CS ya que tenían menor cantidad de polímero por unidad de superficie y no se producía una elevada expansión de las cadenas poliméricas. La existencia de un polímero de alto peso molecular, como es el PAA, produce un aumento mayor en el grado de hinchamiento máximo, debido a que facilita la protonación de los grupos aminos del CS, causando una mayor repulsión electrostática entre las cadenas poliméricas. La presencia de PAA en hidrogeles con alta cantidad de CS produce una primera fase de erosión muy rápida, que puede ser consecuencia de la gran repulsión electrostática entre las cadenas poliméricas.

También se evaluó el efecto del empleo de un principio activo ionizado en el interior del hidrogel, y se observó que a partir de relaciones de PAA:CS:A-NA 1:5:2 se producía una interacción electrostática que generaban estructuras más porosas. Este tipo de estructuras podrían facilitar la entrada del solvente a la matriz polimérica, causando mayores incrementos en el grado de hinchamiento máximo, asimismo sus pendientes de erosión son más acusadas debido a una mayor repulsión electrostática entre las cadenas.

En los ensayos de velocidad de disolución, se obtuvieron diferentes perfiles de cesión en función de las distintas relaciones poliméricas de CS y PAA y según el grado de ionización del principio activo. Todas las formulaciones presentaron unos porcentajes elevados de cesión inicial, consecuencia del hinchamiento rápido del hidrogel y de la amoxicilina que se encuentra adsorbida en la superficie de la matriz polimérica. Con principios activos no ionizados, como la amoxicilina trihidrato, los hidrogeles con mayor cantidad de CS presentaban las cesiones más rápidas del antibiótico. El complejo poliiónico PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75M mostró una adecuada cesión sostenida de amoxicilina trihidrato, cediendo un 54% y un 71% de amoxicilina trihidrato en 1 y 2h respectivamente. En estos hidrogeles con amoxicilina no ionizada las interacciones electrostáticas polímero/ polímero tiene lugar entre los grupos catiónicos del quitosán y los aniónicos del PAA, y el principio activo está atrapado dentro de los espacios de la estructura que forma el hidrogel. Los parámetros cinéticos de la ecuación de Fickian indicaron que la cesión de amoxicilina trihidrato fue controlada por una combinación del grado de hinchamiento/ erosión de la matriz polimérica y difusión de la amoxicilina no ionizada. Por el contrario, en principios activos ionizados, como la amoxicilina sódica, la velocidad de disolución fue más lenta en los complejos poliiónicos con mayor cantidad de CS. Al haber mayor cantidad de polímero catiónico la amoxicilina ionizada y el PAA se unieron a él mediante interacciones electrostáticas, produciendo una cesión inicial menor, consiguiéndose también perfiles de disolución del antibiótico más sostenidos.

En los estudios de la influencia de la fuerza iónica observamos que una mayor cantidad de iones en el medio formador del hidrogel (ver **esquema 2 capítulo VII**) produce un colapso o derrumbamiento del entramado del complejo poliiónico. Estos cambios en las interacciones polielectrostáticas causan una disminución de los valores de hinchamiento y

258 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

una cesión más rápida de la amoxicilina para los complejos obtenidos con bajas proporciones poliméricas. Por el contrario, cuando existe una mayor proporción de ambos polímeros en el entramado del hidrogel (PAA:CS:A (2,5:5:2)-1,75M) incrementos en la cantidad de iones dentro de la red polimérica no produce grandes cambios en la cesión de la amoxicilina trihidrato

Estos resultados nos permiten considerar que es posible obtener complejos poliiónicos por un proceso de liofilización, que presenten perfiles adecuados de cesión de la amoxicilina para su administración gástrica local. Así en el caso de la amoxicilina trihidrato, los complejos poliiónicos PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75M y (2,5:5:2)-1,75M son adecuados para conseguir una cesión sostenida, mientras que en el caso de la amoxicilina sódica se consiguen los mejores perfiles de cesión sostenida con mayores proporciones de CS (PAA:CS:A (1:5:2)-1,75M y PAA:CS:A (1:7,5:2)-1,75M).

Se seleccionaron dos hidrogeles formados por distintas relaciones de chitosán y ácido poliacrílico: PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75M y (2,5:5:2)-1,75M para realizar el estudio *in vivo* del tiempo de residencia gástrica. Primeramente se realizaron estudios *in vitro* de hinchamiento/erosión de los complejos poliiónicos y de velocidad de disolución de amoxicilina trihidrato para evaluar la influencia del pH del medio de disolución (1,2 y 4,0). A continuación se marcaron con [¹³C]ácido octanoico: una formulación de referencia y los dos hidrogeles seleccionados y se realizó el estudio comparativo de las dos formulaciones de hidrogeles seleccionadas y de la formulación de referencia evaluando su vaciamiento gástrico por medio de la prueba del aliento con [¹³C]ácido octanoico en voluntarios sanos.

En los estudios de hinchamiento/erosión, se observó que los dos hidrogeles seleccionados presentaban unas cinéticas sensibles a la variación del pH, ya que en pH 4,0 conseguían menores valores de hinchamiento máximo. Estos cambios de hinchamiento con el pH podrían ser debidos al colapso que sufre la matriz polimérica por la existencia de una mayor cantidad de puentes de hidrógeno entre los grupos carboxílicos del PAA y los grupos aminos del CS a este pH. La formulación con mayor cantidad de ambos polímeros consiguió mayores aumentos en grado de hinchamiento en medio simulado gástrico (pH 1,2). Las cinéticas de erosión en ambos pHs también fueron diferentes confirmando las diferentes

interacciones que se generaban en ambos medios de disolución. En estos estudios, se observó una relación inversa entre el grado de hinchamiento y la cesión del antibiótico en función del pH en las dos formulaciones. A pH 1,2, al aumentar el grado de hinchamiento la velocidad de disolución presentaba un perfil más sostenido, por el contrario a pH 4,0 los dos complejos poliiónicos presentaban menores valores de hinchamiento. Esto puede ser debido a que a un pH más alto la estructura de los hidrogeles varía produciéndose un colapso e impidiendo la formación de una adecuada matriz polimérica que controle la difusión del principio activo. Por lo tanto ambos hidrogeles proporcionarían una adecuada cesión sostenida de amoxicilina en medio gástrico. El hidrogel liofilizado PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75M presentó un perfil de cesión más rápido en pH 4,0, mientras que el complejo poliiónico PAA:CS:A (2,5:5:2)-1,75M exhibió una velocidad de disolución más independiente del pH, con unas cesiones más sostenidas a pH 4,0.

En los estudios *in vivo* se observó que los dos complejos poliiónicos seleccionados presentan un vaciamiento gástrico significativamente prolongado en comparación con la formulación de referencia. A pesar de las diferencias en los valores de hinchamiento máximo de los dos hidrogeles, ambos no presentaban diferencias significativas entre sus tiempos de residencia gástrica, con valores que sobrepasan en ambas formulaciones las dos horas de tiempo medio de vaciamiento gástrico (ver **tabla 24**). Estos resultados, unidos a sus adecuadas características de cesión sostenida permiten considerar que ambos complejos poliiónicos podrían ser utilizados para la administración gástrica local de amoxicilina trihidrato.

260 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

Tabla 24 muestra los valores (expresados como mediana y el cuartil inferior y superior) de semivida de vaciamiento gástrico ($t_{1/2b}$), la fase lag (t_{lagb}) y el porcentaje de excreción experimental máxima de [$^{13}\text{CO}_2$] (%D/h_{max}) y el tiempo al que se obtiene este valor máximo (t_{max}) de las tres formulaciones estudiadas. Asimismo, se muestra el valor ajustado a través de los datos medios.

Formulaciones		$t_{1/2b}$ (min)	t_{lagb} (min)	%D/h _{max}	t_{max}
Referencia	Mediana	65,06	27,03	13,83	89,99
	Rango Cuartiles	53,00-67,00	9,46-44,60	12,35-15,31	80,37-99,63
	Ajuste de media	67,13	28,01		
PAA:CS:A(1:2,5:0)- 1,75M	Mediana	134,81	126,73	18,42	187,50
	Rango Cuartiles	112,24-152,82	102,56-141,62	16,98-21,81	165,0-210,00
	Ajuste de media	133,77	129,40		
PAA:CS:A(2,5:5:0)- 1,75M	Mediana	137,727	132,01	18,39	187,50
	Rango Cuartiles	130,79-144,07	118,08-137,67	18,03-19,22	165,0-195,0
	Ajuste de media	136,52	124,48		

Se estudió la estabilidad de la amoxicilina por medio de un método de HPLC que presentaba una selectividad adecuada. Primero se evaluó la estabilidad en el método de producción de los hidrogeles, ya que se empleaban medios de naturaleza ácida, donde este antibiótico es fácilmente hidrolizado, y se encontró sólo un 2% de pérdidas en la primera hora del estudio. A continuación, se hizo un estudio comparativo de la estabilidad del principio activo en el complejo poliónico seleccionado PAA:CS:A (2,5:5.2)-1,75M, frente a una cápsula convencional tomando como patrón de referencia una solución de amoxicilina en medio simulado gástrico a 37°C. Se observó que en el tiempo equivalente a la semivida de vaciamiento gástrico del hidrogel (aprox. 140 min) los porcentajes de amoxicilina degradada en solución y desde la cápsula convencional eran similares (37,67% y 44,14% respectivamente), siendo aproximadamente cuatro veces más grandes que desde el complejo poliónico seleccionado (12,30%). Ésto puede ser atribuido a que la amoxicilina se encuentra atrapada dentro de la matriz polimérica y se va cediendo poco a poco al medio gástrico, predominando la cinética de cesión sobre la de degradación, lo que permite mantener porcentajes superior al 75% del principio activo sin degradar durante tiempos cercanos a 180 min. Por lo tanto, si se administraran 100 mg de amoxicilina trihidrato atrapados en el hidrogel seleccionado, la concentración de este antibiótico estaría muy

por encima de los valores de CMI_{90} descritos para *H. pylori in vitro* (Atherton y col., 1996) en la cavidad gástrica durante más de dos horas.

En el tratamiento de primera elección para la erradicación del *H. pylori* se combina un inhibidor de la bomba de protones con dos antibióticos. En esta última parte de la tesis se ha evaluado es posible la administración simultanea de este tratamiento local con tratamientos convencionales que incorporan modificadores del pH intragástrico.

En este estudio se evalúa el efecto en el tránsito gástrico del hidrogel seleccionado (PAA:CS:A (2,5:5:0)-1,75M), de dos fármacos que elevan el pH gástrico actuando por rutas diferentes, omeprazol y almagato. El tiempo de residencia gástrico se determinó, en voluntarios sanos marcando el complejo poliiónico con [^{13}C]ácido octanoico en tres situaciones diferentes: (i) el hidrogel bajo condiciones basales (sin pre-tratamiento), (ii) después de un pre-tratamiento con omeprazol durante 7 días, y (iii) siguiendo un pre-tratamiento con almagato durante 7 días.

Al estudiar la semivida de vaciamiento gástrico del complejo poliiónico en sujetos sin pre-tratamiento, con un pH intragástrico normal, se obtuvo un retraso importante en este valor ($t_{1/2b} = 137,73$ min, ver **tabla 25**). Después de un tratamiento con omeprazol de una semana, el valor de semivida de vaciamiento gástrico fue significativamente menor en comparación con el del hidrogel sin pre-tratamiento ($t_{1/2b} = 112,34$ min), estos cambios en las muestras obtenidas con un pre-tratamiento con el inhibidor de la bomba de potasio, pueden ser atribuidos a dos factores principales. El primero sería debido a una interacción metabólica ya que se ha estudiado la capacidad que tiene el omeprazol para interaccionar con el sistema multienzimático P-450, induciendo la síntesis de nuevas enzimas, las cuales podrían estar relacionadas con un aumento en la velocidad de metabolización del [^{13}C]ácido octanoico (Díaz y col., 1990). El segundo factor podría estar relacionado con las características de hinchamiento y erosión que tiene el hidrogel seleccionado a pH menos ácido. Sorprendentemente, después del pre-tratamiento con almagato, el vaciamiento gástrico del complejo poliiónico sufrió un retraso significativo en comparación con los valores obtenidos en condiciones basales ($t_{1/2b} = 170,11$ min, ver **tabla 25**). Recientemente se ha observado que los fármacos que contienen magnesio pueden influir en el vaciamiento gástrico retrasándolo (Geboes y col., 2002). A la vista de estos resultados sería interesante

262 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

utilizar este tipo de antiácidos no sistémicos para aumentar el tiempo de residencia gástrica de la amoxicilina en el estómago.

Tabla 25. muestra los valores (expresados como mediana y el cuartil inferior y superior) de semivida de vaciamiento gástrico ($t_{1/2 b}$), la fase lag ($t_{lag b}$) y el porcentaje de excreción experimental máxima de [$^{13}CO_2$] (%D/h_{max}) y el tiempo al que se obtiene este valor máximo (t_{max}) en las tres situaciones ensayadas. Asimismo, se muestra el valor ajustado a través de los datos medios.

Situaciones		$t_{1/2 b}$ (min)	$t_{lag b}$ (min)	%D/h _{max}	t_{max}
Basal	Mediana	137,727	132,01	18,39	187,50
	Rango Cuartiles	130,79-144,07	118,08-137,67	18,03-19,22	165,0-195,0
	Ajuste de media	136,52	124,48		
Omeprazol	Mediana	112,34	104,97	15,41	150,0
	Rango Cuartiles	109,98-122,94	96,76-110,81	14,28-17,62	120,0-165,0
	Ajuste de media	119,79	94,39		
Almagato	Mediana	170,11	158,31	14,82	225,0
	Rango Cuartiles	142,21-173,93	130,81-164,38	12,62-17,32	195,0-240,0
	Ajuste de media	166,15	147,79		

En conclusión estos complejos poliiónicos presentan un tiempo de vaciamiento gástrico prolongado que permitirá una cesión sostenida de la amoxicilina en el ámbito gástrico local. Estos hidrogeles podrían ser incorporados al tratamiento de elección con el fin de conseguir una mayor eficacia en la erradicación de *H. pylori*. Sería necesario realizar futuros estudios en pacientes *H. pylori* positivos para confirmar la eficacia de esta nueva terapia local en combinación con la terapia convencional.

Sería también interesante la realización de futuros estudios en pacientes *H. pylori* positivos en los que se combinen estos hidrogeles con acción local intragástrica con terapias triples que empleen un antiácido no sistémico como el almagato y dos antibióticos como la amoxicilina y claritromicina. El empleo de este antiácido no sistémico permitirá tiempos de residencia gástrica más prolongados que podrían mejorar el tratamiento erradicador del *H. pylori*.

CONCLUSIONES

1. Se han elaborado hidrogeles liofilizados compuestos por chitosán y ácido poliacrílico unidos por enlaces electrostáticos no covalentes para la administración sostenida de amoxicilina
2. Se estudió la influencia del grado de ionización del principio activo sobre estos hidrogeles. Con principios activos no ionizados, como la amoxicilina trihidrato, proporciones bajas de PAA:CS:A (1:2,5:2) producen una menor repulsión electrostática que nos permite conseguir una cesión más sostenida.
3. En principios activos ionizados, como la amoxicilina sódica, se producirán interacciones electrostáticas entre la estructura polimérica y el principio activo. El aumento en las proporciones del polímero catiónico en la formulación: PAA:CS:A-NA (1:5:2) y (1:7,5:2), produce una mayor interacción con un menor efecto inicial de cesión y un perfil de cesión sostenida.
4. La utilización de mayores fuerzas iónicas en el medio formador del hidrogel produce una disminución del grado de hinchamiento máximo de estos hidrogeles. Una mayor proporción de ambos polímeros (PAA:CS:A 2,5:5:2) es necesaria para que la cesión de la amoxicilina no se vea afectada por el incremento en la fuerza iónica.
5. Estos hidrogeles liofilizados muestran unos perfiles de hinchamiento y cesión sensibles a cambios del pH, más acusados en los complejos poliiónicos con una menor proporción de ácido poliacrílico y chitosán (PAA:CS:A 1:2,5:2).

266 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

6. En los estudios *in vivo*, los complejos poliiónicos seleccionados, PAA:CS:A (1:2,5:2)-1,75M y (2,5:5:2)-1,75M, presentaron un retraso significativo en comparación con una formulación de referencia de cesión inmediata.
7. En el tiempo equivalente a la residencia gástrica de los hidrogeles seleccionados, la amoxicilina es cuatro veces más estable en el complejo poliiónico que en las formulaciones de referencia (cápsulas convencionales y solución), obteniéndose porcentajes mayores del 75% de amoxicilina sin degradar durante 3h desde el complejo poliiónico seleccionado.
8. Después de un pre-tratamiento con omeprazol la residencia gástrica del hidrogel seleccionado disminuye significativamente en comparación con los parámetros de vaciamiento gástrico obtenidos por la misma formulación en condiciones basales.
9. Después de un pre-tratamiento con almagato, antiácido que contiene magnesio en su composición, se consiguen tiempos de vaciamiento gástrico del hidrogel.
10. Los hidrogeles liofilizados desarrollados en este trabajo son candidatos adecuados para su empleo junto con terapias convencionales, que siguen una ruta sistémica normal, en los tratamientos erradicadores de *H. pylori*,

BIBLIOGRAFÍA.

- Adamsson I., Nord C.E., Lundquist P., Sjostedt S. y Edlund C. Comparative effects of omeprazole, amoxicillin plus metronidazole versus omeprazole, clarithromycin plus metronidazole on the oral, gastric and intestinal microflora in *Helicobacter pylori*-infected patients. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 44(5). 629-40 (1999).
- Ahn J.S.; Choi H.K.; Cho C.S. Chun M; Ryu J.; Jung J.; Kim Y. And Cho CS. Release of triamcinolone acetonide from mucoadhesive polymer composed of chitosan and poly(acrylic acid) *in vitro*. *Biomaterials* 23:1411-1416 (2002).
- Annaka M. y Tanaka T. Múltiple phases of polymer gels. *Nature*, 355 (30): 430-432 (1992).
- Aspden T.J; Illium L; Skaugrud. The absence of chitosan toxicity when applied to nasal mucosa. *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 22 (1995), Controlled Release Society, Inc.
- Atherton J.C.; Cullen D.J.E.; Kirk G.E.; Hawkey C.J.; Spiller R.C. Enhanced eradication of *Helicobacter pylori* by pre-versus post-prandial amoxicillin suspension with omeprazole: Implications for antibiotic delivery. *Aliment. Pharmacol. Ther.*10: 631-635 (1996).
- Bae Y. H., Kim S. W. Hydrogel delivery systems based on polymer blends, block-copolymers or interpenetrating networks. *Adv. Drug. Del. Rev.* 11: 109-135 (1993).

270 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

- Bell C. L. and Peppas N. A. Modulation of drug permeation through interpolymer complexed hydrogels for drug delivery applications. *J. Control. Release.*; 39: 201-207 (1996).
- Benini L., Castellani G., Bardelli E., Sembenini C., Brentegani M.T., Caliaris S. Y Vantini I. Omeprazole causes delay in gastric emptying of digestible meals. *Dig. Dis. Sci.* 41(3): 469-74 (1996).
- Bettini R., Colombo P., Peppas N. A. Solubility effects on drug transport through pH-sensitive, swelling-controlled release systems: transport of theophylline and metoclopramide monohydrochloride. *J. Control. Release* 37: 105-111 (1995).
- Bhattacharyya P.K. y Winifred M.C. Amoxicillin pg 20-41. Analytical profiles of Drug substances. Vol. 7. Ed. Florey K. 1978.
- Billa N., Yuen K.H., Khader M.A., Omar A., Gamma-sintigraphic study of the gastrointestinal transit and *in vivo* dissolution of a controlled release diclofenac sodium formulation in xanthan gum matrices, *Int. J. Pharm.* 201 (1): 109-120 (2000).
- Boixeda de Miguel D. y Martín de Arguila C. Tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud* 24 (6): 141-146 (2000).
- Bortolotti M., Brunelli F., Sarti P., Mari C. y Miglioli M. Effect of omeprazole on interdigestive gastroduodenal motility of patients with ulcer-like dyspepsia. *Hepatogastroenterology* 46(25): 588-93 (1999).
- Brazel C.S., Peppas N.A. Dimensionless analysis of swelling of hydrophilic glassy polymers with subsequent drug release from relaxing structures. *Biomaterials* 20: 721-732 (1999).

- Brenciaglia M.I., Fornara A.M., Scaltrito M.M. y Dubini F. *Helicobacter pylori*: cultivability and antibiotic susceptibility of coccoid forms. *International Journal of Antimicrobials Agents* 13: 237-241 (2000).
- Bruno M.J., Borm J.J., Hoek F.J., Delzenne B., Hofmann A.F., De Goeij J.J., Van Royen E.A., Van Leeuwen D.J., Tytgat G.N.J., Gastric Transit and Pharmacodynamics of a two-millimeter enteric-coated pancreatin microspheres preparation in patients with chronic pancreatitis, *Dig. Dis. Sci.* 43 (1) 203-213 (1998).
- Chellat F., Tabrizian M., Dumitriu S., Chornet E., Rivard C. H., Yahia L. Study of biodegradation behavior of chitosan-xanthan microspheres in simulated physiological media. *J. Biomed. Mater. Res.* 53: 592-599 (2000).
- Chien Y.W. Novel drug delivery systems. 2nd ed. Marcel Dekker Inc. Amsterdam, 1992.
- Colombo P., Bettini R., Massimo G., Catellani P. L., Santi P., Peppas N. A., Drug diffusion front movement is important in drug release control from swellable matrix tablets. *J. Pharm. Sci.* 84:991-997 (1995).
- Colombo P., Bettini R., Santi P., De Ascentiis A., Peppas N. A. Analysis of the swelling and release mechanisms from drug delivery systems with emphasis on drug solubility and water transport. *J. Control. Release.* 39: 231-237 (1996).
- Coupe A.J., Davis S.S. y Wilding I.R. Variation in gastrointestinal transit of pharmaceutical dosage forms in healthy subjects. *Pharmaceutical research* 8 (3): 360-364 (1991).
- Coviello T., Grassi M., Rambone G. and Alhaique F. A crosslinked system from scleroglucan derivative; preparation and characterization, *Biomaterials*; 22: 1899-909 (2001).

272 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

- Davis S. Evaluation of the gastrointestinal transit and release characteristics of drugs. En: Johnson P. y Lloyd-Jones J-G. Drug delivery systems. Fundament and Techniques. Ellis Horwood Ltd, Chichester, England, 1981.
- De Prada P. Desarrollo de una formulación galénica para la cesión sostenida de amoxicilina en medio gástrico. Trabajo de investigación del 2º curso de doctorado (2001).
- ^aDe la Torre P.M., Torrado Susana, Torrado Santiago. Interpolymer complexes of poly(acrylic) acid and chitosan: influence of the ionic hydrogel-forming medium. *Biomaterials* 24: 1459-1468 (2003).
- ^bDe la Torre P.M., Enobakhare Y., Torrado G., Torrado S. Release of amoxicillin from polyionic complexes of chitosan and poly(acrylic) acid. Study of polymer/ polymer and polymer/ drug interactions within the network structure. *Biomaterials* 24: 1499-1506 (2003).
- Díaz D., Fabre I., Daujat M. et al. Omeprazol is an aryl hydrocarbon-like inducer of human hepatic cytochrome P450. *Gastroenterology* 99: 737-47 (1990).
- Dodane V. y Vilivalam V.D. Pharmaceutical applications of chitosan. *PSTT* 1(6): 246-253 (1998).
- Duchêne D. y Ponchel G. Bioadhesion. A new pharmacotechnical method for improving therapeutic efficiency. *S.T.P. Pharma.* 5 (12): 830-838 (1989).
- Dumitriu S. and Chornet E. Inclusion and release of proteins from polysaccharide-based polyions complexes. *Advance Drug Del. Rev.* 31: 223-246 (1998).

- Endo H., Yoshida H., Ohmi N., Higuchi S. Effects of lansoprazole, clarithromycin and pH gradient on uptake of ¹⁴C amoxicillin into gastric tissue. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47, 405-410 (2001).
- Erah P.O., Goddard A.F., Barret D.A., Shaw P.N. y Spiller R.C. The stability of amoxicillin, clarithromycin and metronidazole in gastric juice: relevance to the treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 39: 5-12 (1997).
- Evenepoel P., Claus D., Geypens B., Maes B., Hiele M., Rutgeers P. e Ghos Y. Evidence for impaired assimilation and increased colonic fermentation of protein, related to gastric acid suppression therapy. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 12: 1011-1019 (1998).
- Flórez J. Farmacología Humana. 2ªEd. Ediciones Científicas y Técnicas S.A. España, 1992.
- Gabrielli I., Gatenholm P. Preparation and properties of hydrogels based on hemicellulose. *J. Appl. Polym. Sci.* 69: 1661-1667 (1998).
- Gardner J.D., Rodriguez-Stanley S., Robinson M. Y Miner P.B. Cisapride inhibits meal-stimulated gastric acid secretion and pos-prandial gastric acidity in subjects with gastro-oesophageal disease. *Aliment Pharmacol Ther* 16: 18019-1829 (2002).
- Geboes K.P., Maes B., Luybaerts A., Evenepoel P., Rutgeerts P., Ghos Y. y Geypens B. Magnesium chloride slows gastric emptying, but does not affect digestive functions. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 16: 1571-1577 (2002).
- Ghos Y. F., Maes B.D., Geypens B.J., Mys G., Hiele M.I., Rutgeerts P.J., Vantrappen G., Measurement of gastric emptying rate of solid by means of a carbon-labeled octanoic acid breath test, *Gastroenterology* 104 (6) 1640-1647 (1993).

274 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

- Goddard A. F. and Spiller R. C. The effect of omeprazole on gastric juice viscosity, pH and bacterial counts. *Aliment. Pharm. Therap* 10: 105-109 (1996).
- Graham D.Y., Klein P.D., Evans D.J. et al. *Campylobacter pylori* detected non invasively by the urea breath test. *Lancet* 1: 1177-1187 (1987).
- Gupta K.C., Ravi Kumar M.N.V. Drug release behavior of beads and microgranules of chitosan. *Biomaterials* 21: 1115-1119 (2000).
- Handbook of Pharmaceutical Excipients. 3rd ed. The Pharmaceutical Press- American Pharmaceutical Association (2000).
- Harris D., Fell J.T., Sharma H. Taylor D.C. y Linch J. Studies on potential bioadhesive systems for oral drug delivery. *S.T.P. Pharma* 5: 852-856 (1989).
- Hoffman A., Danenberg H.D., Katzhendler I., Shuval R., Gilhar D. y Friedman M. Pharmacodynamic and pharmacokinetic rationales for the development of an oral controlled release amoxicillin dosage form. *Journal of Controlled Release* 54: 29-37 (1998).
- Illum L., Farraj N.F., Davis S.S. Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs. *Pharmaceutical Research*, 11 (8): 1186-1190 (1994).
- Inukai M., Jin Y., Yomota C. and Yonese M. Preparation and characterization of hyaluronate-hydroxyethyl acrylate blend hydrogel for controlled release device. *Chem. Pharm. Bull.*; 48: 850-4 (2000).
- Jackson S.J., Bush D., Washington N., Perkins A.C., Effect of resin surface charge on gastric mucoadhesion and residence of cholestyramine, *Int. J. Pharm.* 205 (1-2): 173-181 (2000).

- Jacques Y. y Buri P. An investigation of the physical behaviour of moisture-activated mucoadhesive hydrogels upon contact with biological and non-biological substrates. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 72: 225-232 (1997).
- Kees F.; Holstege A.; Ittner K.P.; Zimmermann M.; Lock G.; Scholmerich J.; Grobecker H. Pharmacokinetic. Interaction between proton pump inhibitors and roxithromycin in volunteers. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 14: 407-412 (2000).
- Khan M.C.I. Recent trends and progress in sustained or controlled oral delivery of some water soluble drugs: morphine salts, diltiazem and captopril. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 21(9): 1037-1070 (1995).
- Khare A. R. and Peppas N. A. Release behavior of bioactive agents from pH-sensitive hydrogels. *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.*; 4: 275-289 (1993).
- Khosla R., Feely L.C. y Davis S.S. Gastrointestinal transit of non-disintegrating tablets in fed subjects. *Int. J. Pharm.* 53: 107-117 (1989).
- Kratz K., Hellweg T., Eimer W. Influence of charge density on the swelling of colloidal poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) microgels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 170, 137-149 (2000).
- ^aMaes B.D., Hiele M.I., Geypens B.J., Rutgeerts P.J., Ghoo Y.F., Vantrappen G., Pharmacological modulation of gastric emptying rate of solid as measured by the carbon labelled octanoic acid breath test: Influence of erythromycin and propantheline, *Gut* 35 (3): 333-337 (1994).
- ^bMaes B.D., Ghoo Y.F., Rutgeerts P.J., Hiele M.I, Geypens B.J., Vantrappen G., octanoic acid breath test to measure gastric emptying rate of solids, *Digestive Diseases and Sciences* 39 (12): 104S-106S (1994).

276 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

- Maes B.D., Hiele M.I., Geypens B.J., Ghoo Y.F. y Rutgeerts P.J. Gastric emptying of the liquid, solid and oil phase of a meal in normal volunteers and patients with Billroth II gastrojejunostomy. *European Journal of Clinical Investigation*, 28 (3): 197 (1998).
- Maes B.D., Spitz B., Ghoo Y.F., Hiele M.I., Evenepoel P., Rutgeerts P.. Gastric emptying in hyperemesis gravidarum and non-dyspeptic pregnancy. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 13: 237-243 (1999).
- Martindale, the complete drug reference. Thirty-second edition. Parfitt K. Royal Pharmaceutical Society, London, England, 1999.
- McColl K.E., Kennerley P. Proton pump inhibitors-differences emerge in hepatic metabolism. *Dig. Liver Dis* 34 (7): 461-7 (2002).
- The Merck Index, an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 13th ed. Merck & Co., Inc. White house Station, NJ, USA, 2001.
- Meshali M.M., El-Sayed G.M., El-Said Y. y El-Aleem H.M. Preparation and evaluation of theophylline sustained release tablets. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 22(4): 373-376 (1996).
- Meyer J.H., Elashoff J., Porter Fink V., Dressman J., Amidon G.L., Human postprandial gastric emptying of 1-3-millimeter spheres, *Gastroenterology* 94 (6) 1315-1325 (1988).
- Mones J., Carrio I., Roca M., Estorch M., Calabuig R., Sainz S., Martinez-Duncker C. y Vilardell F.. Gastric emptying of two radiolabelled antacids. *Gut* 32(2): 147-50 (1991).
- Munjeri O.; Collet J.H. and Fell J. T. Hydrogel beads based on amidated pectins for colon-specific drug delivery: the role of chitosan in modifying drug release. *J. Control. Release*. 46: 273-278 (1997).

- Murray P.R., Kobayashi G.S., Pfaller M.A. y Rosenthal K.S. Microbiología Médica. 2nd ed. Hancourt Brace, 1997.
- Nakanishi T., Kaiho F. y Hayashi M. Improvement of drug release from carbopol 934 P formulation. *Chem. Pharm. Bull*, 46(1): 171-3 (1998).
- Netzer P., Schmitt B. y Inauen W. Effects of ABT-229, a motilin agonist, on acid reflux, oesophageal motility and gastric emptying in patients with gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 16: 1481-1490 (2002).
- Noble L., Gray A. I., Sadiq L. and Uchegbu I. F. A non-covalently cross-linked chitosan based hydrogel. *Int. J. of Pharmaceutics* 192: 173-182 (1999).
- Patel V. R., and Amiji M. M. Preparation and characterization of freeze-dried chitosan-poly (ethylene oxide) hydrogels for site-specific antibiotic delivery in the stomach. *Pharmaceutical Research* 13: 588-593 (1996).
- Peniche C., Elvira C., San Roman J. Interpolymer complexes of chitosan and polymethacrylic derivatives of salicylic acid: preparation, characterization and modification by thermal treatment. *Polymer* 39: 6549-6554 (1998).
- Peppas N.A. Analysis of Fickian and Non-Fickian drug release from polymers. *Pharm. Acta Helv.* 60 (4): 110-111 (1985)
- Peppas N.A., Bures P., Leobandung W. Y Ichikawa H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50: 27-46 (2000).
- Peppas N.A., Merrill E.W. Crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels as swollen elastic networks. *J. Appl. Polym. Sci.* 21: 1763-1770 (1977).

278 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

- Perri F., Clemente R., Festa V., Annese V., Quitadamo M., Rutgeerts P., Andriulli A., Patterns of symptoms in functional dyspepsia: Role of *Helicobacter pylori* infection and delayed gastric emptying, *Am. J. Gastroenterol.* 93 (11) 2082-2088 (1998).
- Prescott L.M., Harley J.P. y Klein D.A. Microbiología. 4th ed. McGraw Hill Interamericana, 2000.
- Podual K., Doyle F.J., Peppas N.A. Glucose-sensitivity of glucose oxidase-containing cationic copolymer hydrogels having poly(ethylene glycol) grafts. *J. Control. Release* 67: 9-17 (2000).
- Real Farmacopea Española, segunda edición. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, 2002.
- Remuñán-López C., Portero A., Vila-Jato J.L., Alonso M. J. Design and evaluation of chitosan/ ethylcellulose mucoadhesive bilayered devices for buccal drug delivery. *J. Control. Release* 55: 143-152 (1998).
- Risbud M. V., Hardikar A. A., Bhat S. V. and Bhonde R. R. pH-sensitive freeze-dried chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogels as controlled release systems for antibiotic delivery. *J. Control. Release* 68: 23-30 (2000).
- Ritschel W.A. Targeting in the gastrointestinal tract: new approaches. *Meth.Ind. Exp.Cli. Pharmacol.* 13 (5): 313-336 (1991).
- Salyers A.A. y Whitt D.D. Bacterial Pathogenesis, a Molecular Approach. 1st ed. ASM Press, Washington, D.C., 1994.
- Shanta K. L., Harding D. R. K. Preparation and in-vitro evaluation of poly [N-vinyl-2-pyrrolidone-polyethylene glycol diacrylate]-chitosan interpolymeric pH-responsive hydrogels for oral drug delivery. *Int. J. Pharmaceutics* 207: 65-70 (2000).

- Shin H. S., Kim S. Y., Lee Y. M. Indomethacin release behaviours from pH and thermoresponsive poly (vinyl alcohol) and poly (acrylic acid) IPN hydrogels for site-specific drug delivery. *J. Appl. Polym. Sci.* 65: 685-693 (1997).
- Singla A.K., Chawla M. y Singh A. Potential Applications of Carbomer in Oral Mucoadhesive Controlled Drug Delivery System: A Review. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 26 (9): 913-924 (2000).
- Shun P.L., Pendharkar C.M., Mehta G.N., Karth M.G. y Feld K.M. Sucralfate as a bioadhesive gastric intestinal retention system: preliminary evaluation. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 19(19): 2519-2537 (1993).
- Slovin E.M., Robinson J.R. *In vivo* swelling kinetics of a series of hydrogel polymers in the cannulated gastrointestinal tract of the canine. *Int. Journal of Pharmaceutics*, 155 (1): 53-63 (1997).
- Sugimoto K., Yoshida M., Yata T., Higaki K., Kimura T. Evaluation of poly (vinyl alcohol)-gel spheres containing chitosan as dosage form to control gastrointestinal transit time of drugs. *Biol. Pharm. Bull.* 21: 1202-1206 (1998).
- Tabata Y., Matsui Y. and Ikada Y. Growth factor release from amylopectin hydrogel based on copper coordination. *J. Control. Release* 56: 135-48 (1998).
- Talley N.J., Verlinden M., Snape W., Beker J.A., Ducrotte P., Dettmer A., et al. Failure of a motilin receptor agonist (ABT-229) to relieve the symptoms of functional dyspepsia in patients with and without delayed gastric emptying: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther* 14: 1653-1661 (2000).
- Tortora G.J. y Grabowski S.R. Principios de Anatomía y Fisiología. 7ª ed. Harcourt Brace. España, 1998.

280 Nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para el tratamiento de *H. pylori*

- Tuleu C., Basit A.W., Waddington W.A., Ell P.J. y Newton J.M. Colonic delivery of 4-aminosalicylic acid using amylose-ethylcellulose-coated hydroxypropylmethylcellulose capsules. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 16: 1771-1779 (2002).
- United States Pharmacopoeia, 24 edition, United States Pharmacopoeia Convention, Rockville, 2000.
- Valvo L., Alimonti S., Alimenti R., De Sena C., Ciranni Signoretti E., Draisci R. Y Giannetti L. Investigation of a new amoxicillin sodium impurity unstable in solution. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 15: 487-493 (1997).
- Valvo L., Manna, Alimenti R., Alimonti S., Bertocchi P. y Ciranni E. Amoxicillin sodium-potassium clavunate: evaluation of gamma radiation induced effects by liquid chromatography on both the individual drugs and their combination. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 21: 9-14 (1999).
- Vázquez Carrasco M^aA. Pruebas de aliento con isótopos marcados. *Salud Rural* 19 (5): 1-12 (2002).
- Wan L.S.C., Lim L.Y. y Soh B.L. Drug release from chitosan beads. S.T.P. *Pharma Sciences*, 4 (3): 195-200 (1994).
- Wang H.; Li W.; Lu Y. and Wang Z. Studies on chitosan and poly (acrylic acid) interpolymer complexes. I. Preparation, structure, pH-sensitivity and salt sensitivity of complex-forming poly (acrylic acid): chitosan semiinterpenetrating polymer network. *J. Appl. Polym. Sci.* 65: 1445-1450 (1997).

- Whitehead L., Fell J.T., Collett J.H., Sharma H.L., Smith A.M., Floating dosage forms: an *in vivo* study demonstrating prolonged gastric retention, *J. Control. Release* 55 (1) (1998) 3-12.
- Wilding I.R., Kenyon C.J. y Hooper G.. Gastrointestinal spread of oral prolonged-release mesalazine microgranules (Pentasa) dosed as either tablets or sachet. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 14: 163-169 (2000).
- Xu Q.A. y Trissel L.A. Stability-Indicating HPLC Methods for Drug Analysis. American Pharmaceutical Association. Pharmaceutical Press, London, England, 1999.
- Zala Y.R., Samarth M.M. y Sanhavi N.M. Utility of mucoadhesive polymers in oral controlled release delivery of furosemide. 14th Pharm. Techn. Conf. 14 (2a): 490-508 (1995).

- Direcciones de Internet.

- European *Helicobacter pylori* Study group: <http://www.helicobacter.org/>
- HAN, Sang-Mun, Ph. D. 's Chitin and Chitosan Sciences: <http://www.user.chollian.net>
- *Helicobacter pylori*, retos para el siglo XXI: <http://www.helicobacterspain.com/>
- Noveon Pharmaceuticals: <http://www.pharma.noveoninc.com/>
- The *Helicobacter pylori* foundation: <http://www.helico.com/>

Interpolymer complexes of poly(acrylic acid) and chitosan: influence of the ionic hydrogel-forming medium

Paloma M. de la Torre, Susana Torrado, Santiago Torrado*

Department of Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, Complutense University, Avda. Complutense S/N, Madrid 28040, Spain

Received 20 July 2002; accepted 27 October 2002

Abstract

Non-covalent polyionic complexes were developed for localized antibiotic delivery in the stomach. Freeze-dried interpolymer complexes based on polyacrylic acid (PAA) and chitosan (CS) were prepared in a wide range of copolymer compositions by dissolving both polymers in acidic conditions. The influence of hydrogel-forming medium on the swelling and drug release was evaluated.

The properties of these complexes were investigated by using scanning electron microscopy, dynamic swelling/eroding and release experiments in enzyme-free simulated gastric fluid (SGF). The electrostatic polymer/polymer interactions generate polyionic complexes with different porous structures. In a low pH environment, the separation of both polymer chains augmented as the amount of cationic and carboxylic groups increased within the network. However, the presence of higher amount of ions in the hydrogel-forming medium produced a network collapse, decreasing the maximum swelling ratio in SGF. PAA:CS:A (1:2.5:2)—1.75 M complexes released around 54% and 71% of the amoxicillin in 1 and 2 h, respectively, in acidic conditions. A faster drug release from this interpolymer complex was observed when the ionic strength of the hydrogel-forming medium increased. Complexes with a high amount of both polymer chains within the network, PAA:CS:A(2.5:5:2), showed a suitable amoxicillin release without being affected by an increased amount of ions in the hydrogel-forming medium. These freeze-dried interpolymer complexes could serve as potential candidates for amoxicillin delivery in an acidic environment.

© 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Chitosan; Poly(acrylic acid); Polyionic complexes; Interpolymer complexes; Ionic strength; Amoxicillin

1. Introduction

Triple therapy, including two antibiotics and a proton pump inhibitor, is a rational approach to the treatment of *Helicobacter pylori*. Recently, it has been reported that these proton pump inhibitors increase the local concentration of antibiotics in the stomach, which may contribute to the clinically proven synergic beneficial action in eradication therapy of *H. pylori* [1,2].

Swelling polyionic hydrogels have been employed for localized delivery of antibiotics in the stomach [3,4]. Only chitosan (CS) or in combination with several anionic polymers has been used in many studies of polyionic hydrogels because of its suitable sustained drug release properties and its good biocompatibility [4,5]. The electrostatic polymer/polymer and polymer/

drug interactions generate hydrogels without the need for covalent cross-linking [5–8].

The controlled drug release from these polyionic hydrogels could respond to changes in environmental parameters such as pH or temperature. Thus, interpolymer complexes as poly (acrylic acid/polyvinyl alcohol) or poly (methacrylic-g-ethylene glycol) exhibit temperature- and pH-sensitive, reversible complexation [9,10]. In the case of some polyelectrolyte hydrogels, the equilibrium swelling and mesh sizes were mainly governed by the percentage of the ionic component in the polymer and the degree of ionization of the drug [10–12]. For example, Peniche et al. [13] have verified the complexation ability of salicylic acid acrylic derivatives with polyvalent cationic ligands as CS. Also, in poly (methacrylic acid-g-ethylene glycol) copolymers, Bell et al. [10] have reported that the presence of specific ions modified the solute diffusivity. Finally, Gabrielli et al. [14], studied the swelling properties of xylan/CS hydro-

*Corresponding author. Tel.: +34-1-3941727; fax: 34-1-3941736.
E-mail address: torrado1@farm.ucm.es (S. Torrado).

gels at various pH and salt concentrations (0.075 and 0.15 M). The effect of NaCl addition could be explained by the fact that increasing the total amount of ions decreases the ratio of ions between the inside of the gel and the surrounding solution. Thus, in pH extreme conditions (pH=3 and 12) the degree of swelling decreases when the ionic strength of the medium increases.

Nevertheless, there are few studies about the influence of solutions, with different ionic strengths, employed in the preparation of freeze-dried hydrogels.

The aim of this paper is to evaluate the different electrostatic interactions in polyionic hydrogels produced between the cationic chains from CS and the carboxylic groups from poly(acrylic acid) chains (PAA). The main emphasis was placed on the investigation of (I) how the changes produced in the ionic groups of both polymeric chains affect drug release (II) the influence of different ionic strengths, employed during the production of these hydrogels.

2. Materials and methods

2.1. Materials

CS (low molecular weight) was purchased from Fluka Biochemika (MW 150000). Carbopol[®] 974P NF (PAA) was obtained from BF Goodrich (OH, USA). Amoxicillin trihydrate BP/USP was obtained from Antibiotics (Madrid, Spain). Glacial acetic acid PRS and hydrochloric acid PA 37% were purchased from Panreac Química S.A. (Barcelona, Spain). All chemical reagents were of pharmaceutical grade or better.

2.2. Hydrogel preparation

Hydrogels were prepared with CS and Carbopol[®] 974P NF (PAA). A constant proportion of 2.0 of amoxicillin trihydrate (A) was added to all formulations. The ratios of freeze-dried PAA:CS:A—1.75 M hydrogels with the least amount of CS were: 0:2.5:2, 1:2.5:2, 2.5:2.5:2 and 5:2.5:2. The freeze-dried PAA:C-S:A—1.75 M hydrogel with the highest amount of CS presented the ratios: 0:5:2, 1:5:2, 2.5:5:2 and 5:5:2.

The procedure was as follows: PAA was dissolved in 25.0 ml of acetic acid 1.75 M. Next, 250.0 mg of amoxicillin trihydrate was added to the gel gradually while mixing, until a uniform dispersion of drug was formed. CS was added gradually and mixed to get a homogeneous gel. The hydrogel was neutralized with sodium hydroxide 3 M to reach a pH of 5.0 and the volume was adjusted to 40.0 ml for each formulation. The interpolymer complexes were cast onto petri-dishes of 100.0 ml with 100.0 mm i.d. Finally, gels were freeze-dried using a Liolabar 7 (Telstat Inc Madrid, Spain).

The different hydrogel formulations after being freeze-dried presented similar volumes. Samples were cut into $2 \times 2 \text{ mm}^2$ squares.

In the second part of this study, the effect of ionic strength of the hydrogel-forming medium employing three different molarities of acetic acid: 1.75, 3.50, and 5.25 M was evaluated. Hydrogels PAA:CS:A (1:2.5:2) and PAA:CS:A (2.5:5:2) were chosen to carry out those experiments. Therefore, freeze-dried hydrogels obtained with different concentrations of acetic acid were: PAA:CS:A (1:2.5:2)—1.75 M, PAA:CS:A (2.5:5:2)—1.75 M, PAA:CS:A (1:2.5:2)—3.50 M, PAA:CS:A (2.5:5:2)—3.50 M, PAA:CS:A (1:2.5:2)—5.25 M and PAA:CS:A (2.5:5:2)—5.25 M.

Polyionic complexes obtained with a 1.75 M acetic acid solution were prepared as described before. And the hydrogels developed with 3.50 and 5.25 M acetic acid solutions were prepared in the same manner, the difference being the concentration of acetic acid.

2.3. Scanning electron microscopy (SEM) studies

Freeze-dried samples were mounted on an aluminum sample mount. After coating with gold–palladium, the hydrogel samples were analyzed with a Jeol[®] 6400 SEM. All micrographs were the product of secondary electron imaging used for surface morphology identification at different magnifications and an accelerating voltage of 20 kV.

2.4. Swelling experiments

Freeze-dried hydrogels were swollen in 450 ml 0.1 M HCl of enzyme-free simulated gastric fluid (SGF, pH 1.2) at a temperature of 37°C prepared by the procedure described in USP 24. The swelling studies were carried out using testing apparatus 1 (Vankel[®] dissolution apparatus). Empty dry baskets were weighted. The basket's rotation speed was set at 100 rpm. At 15 min time intervals, the samples were removed from the swelling medium and blotted on a piece of filter paper prior to weighing to remove excess surface moisture. The swelling ratio (SW) was determined according to the following expression:

$$SW(\text{wt}) = W_s / W_d,$$

where W_s is the weight of the swollen hydrogel and W_d is the weight of the dried hydrogel. The data represent mean \pm S.D. from three samples per formulation. The studies were carried out for 5 h.

2.5. Release experiments

The release studies of all formulations were performed using testing apparatus 1 of the USP 24 (Vankel[®] dissolution apparatus), 100 rpm. The dissolution

medium was 450 ml SGF (0.1 M HCl) at 37°C. At predetermined time points, 5 ml of SGF was removed and filtered using a 0.45 µm filter and assayed for amoxicillin at 228.5 nm using a UV–VIS Beckman DU[®]-7 Spectrophotometer. The cumulative amount of amoxicillin trihydrate released from the hydrogel was determined from the appropriate calibration curves. The data represent mean ± S.D. from three independent experiments.

To investigate more precisely the effect of interpolymer complex formation on the release of amoxicillin, the results were analyzed according to the following equation [15]:

$$M_t/M = kt^n,$$

where M_t/M is the amount of amoxicillin (%) released at time $t(h)$, n is a diffusional exponent and k is the apparent release rate (%/h).

3. Results and discussion

3.1. Study of the influence of increasing PAA content on the structure and behavior of CS-based hydrogels

Fig. 1 shows different scanning electron micrographs of freeze-dried hydrogels with several ratios of PAA and CS. The top-view of a freeze-dried hydrogel without PAA (PAA:CS:A 0:5:2)—1.75 M at a high magnification (300 ×) is depicted in Fig. 1A. It is characteristic for

these hydrogels to present a non-porous surface with flakes. However, when PAA is incorporated into the formulation, the hydrogels present a highly porous structure. Fig. 1B shows the polyionic complex PAA:CS:A (5:2.5:2)—1.75 M (50 ×) where an irregular structure is seen on its surface with a pore size of 60–95 µm. The formation of an open cell structure on its surface could be attributed to the electrostatic interaction between the anionic groups from PAA and the cationic groups from CS. This characteristic structure was confirmed by examining the cross-section of the interpolymer complex. Various authors observed a similar morphology in freeze-dried CS-based hydrogels [3,5]. The electrostatic interaction between both polymeric chains is shown clearly in the interpolymer complex PAA:CS:A (2.5:5:2)—1.75 M (Fig. 1C). The pore size is generally regular with values of 25–50 µm. However, an ionic increase in the hydrogel-forming medium, as in the interpolymer complex, PAA:CS:A (2.5:5:2)—5.25 M (Fig. 1D), produces a change in its morphology. The surface presents less quantity of pores with values of 10–30 µm in diameter. A new electrostatic interaction between both polymeric chains is produced by ions of the hydrogel-forming medium. Similar hydrogel structure was obtained in xylan/CS complexes [14].

In Fig. 2, swelling and drug release from the interpolymer complexes of various ratios of PAA and CS were studied to investigate the effect of polyionic complex formation.

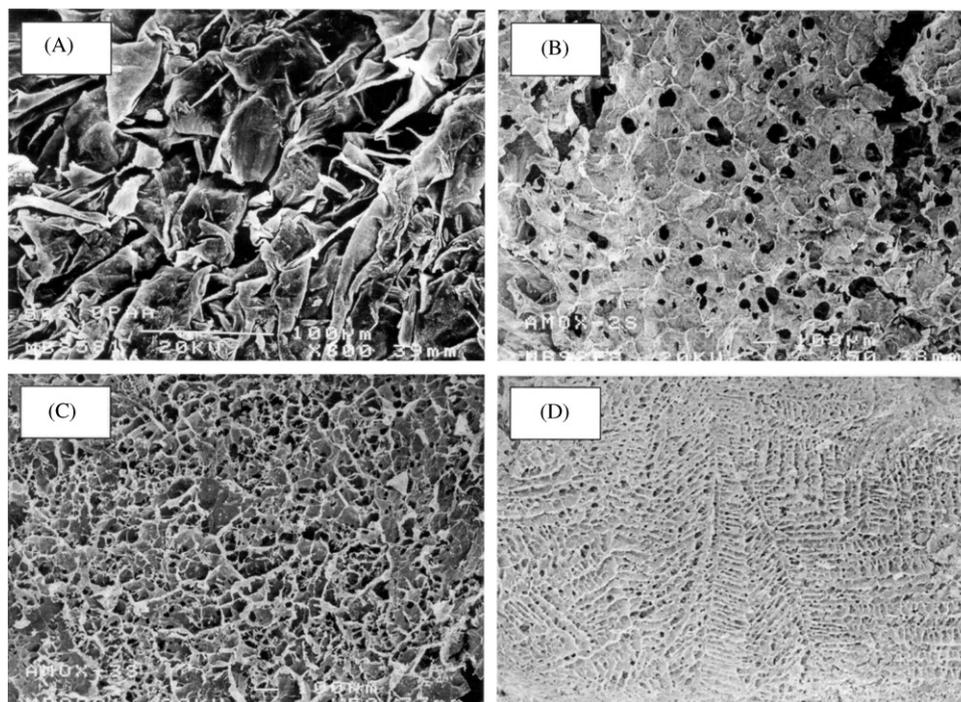


Fig. 1. Scanning electron micrographs of freeze-dried CS-based hydrogels without or with PAA. The micrographs depict top view of the following interpolymer complexes: PAA:CS:A (0:5:2)—1.75 M at a high magnification (300 ×) (A), PAA:CS:A (5:2.5:2)—1.75 M (50 ×) (B), PAA:CS:A (2.5:5:2)—1.75 M (C), and PAA:CS:A (2.5:5:2)—5.25 M produced in different hydrogel-forming media (D).

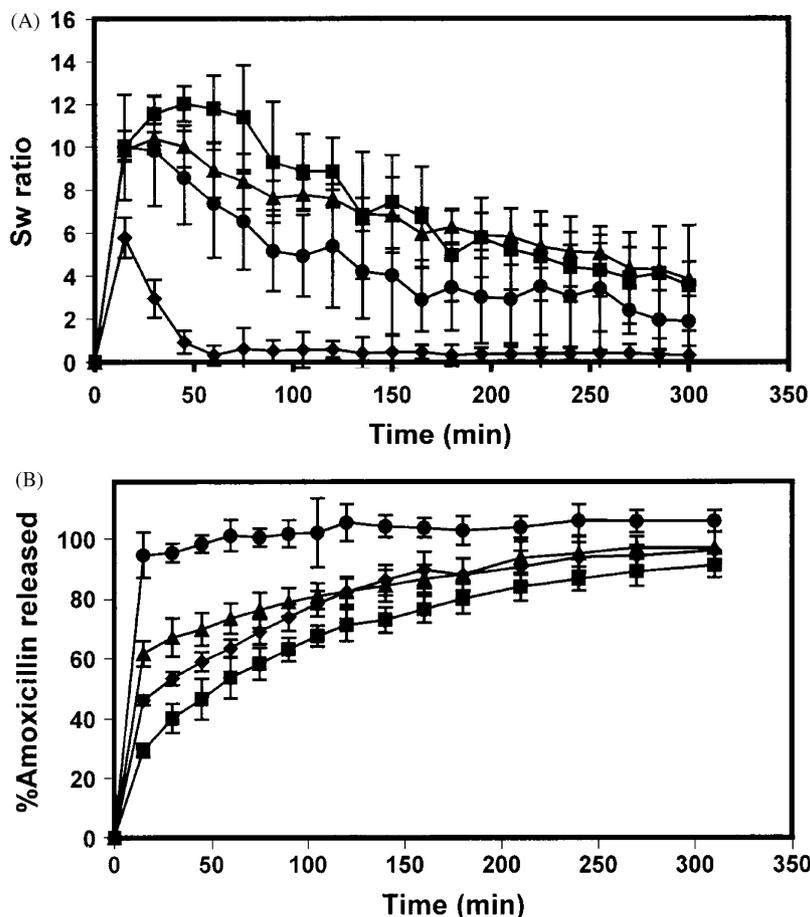


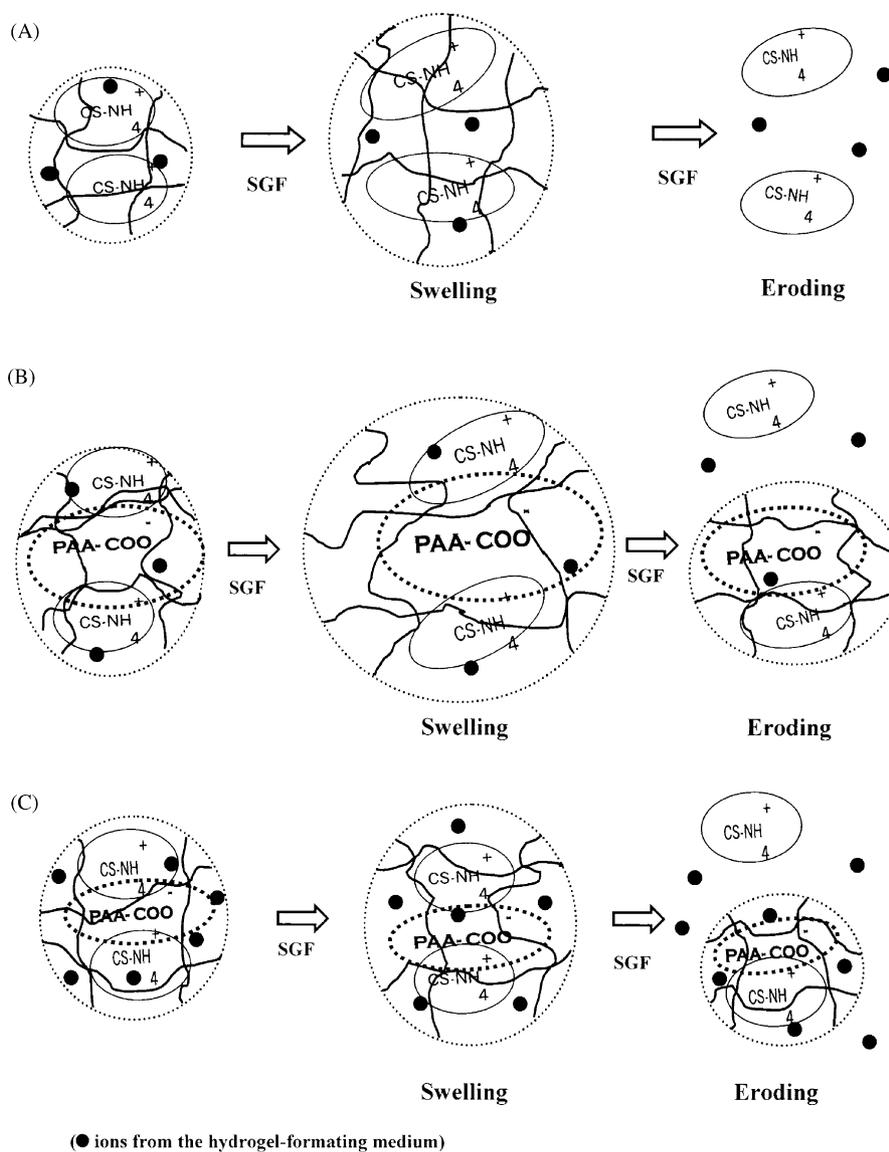
Fig. 2. Swelling/eroding (A) and release kinetics (B) in SGF of freeze-dried polyionic complexes with a CS proportion of 2.5: PAA:CS:A (0:2.5:2)—1.75 M (\blacklozenge), PAA:CS:A (1:2.5:2)—1.75 M (\blacksquare), PAA:CS:A (2.5:2.5:2)—1.75 M (\blacktriangle), and PAA:CS:A (5:2.5:2)—1.75 M (\bullet).

Fig. 2A depicts the swelling kinetics of these formulations. Freeze-dried hydrogels without PAA (PAA:CS:A 0:2.5:2)—1.75 M exhibited the lowest maximum S_w ratio at 5.78 in the first 15 min, the other formulations with PAA achieved in the same time similar S_w ratios (from 9.85 to 10.04). Furthermore, when the PAA proportion was lower in the polyionic complexes, the time to reach the maximum S_w ratio changed, thus the formulation PAA:CS:A (1:2.5:2)—1.75 M presented the maximum S_w at 45 min. The regular porous nature of the freeze-dried polyionic complex and a stronger electrostatic interaction between both polymeric chains would facilitate a better matrix–solvent interaction, allowing an efficient and rapid swelling (see Scheme 1A and B).

Hydrogels, which are not covalently cross-linked, are not permanent and can dissolve when polymer–polymer interactions dissociate. The addition of PAA to the hydrogel slowed down the rate of erosion (see Fig. 2A). But in polyionic complexes with PAA, erosion rate increased as the amount of this polymer augmented in the hydrogel (PAA:CS:A (2.5:2.5:2)—1.75 M and (5:2.5:2)—1.75 M). Possibly, the presence of greater PAA amounts within the complex produced a structure,

where it was easy to get a fast breaking of the interpolymer network, due to the greater separation among the polymeric chains.

Fig. 2B shows the release rates of these formulations. The formulation with the lowest ratio of PAA:CS:A (1:2.5:2)—1.75 M presented a suitable controlled release profile, about 53.55% and 70.98% of amoxicillin was released after 1 and 2 h, respectively. These release results will ensure maximum availability of the drug in the stomach [3,4]. The reason for this is based on a number of factors, which include: the rate of erosion, the existence of a different electrostatic interaction within the network that controlled the drug release and the presence of different kinds of structures with pores of different sizes [13,16,17]. The greater the PAA content in the interpolymer complexes, the faster the release rate of amoxicillin was achieved; therefore the polyionic complex with the highest PAA:CS:A ratio (5:2.5:2)—1.75 M attained a 94.54% of amoxicillin released in the first 15 min. This may be attributed to the fact that PAA presented a greater amount of free carboxylic pendant groups that would lead to a major expansion of the polymeric chains, increasing the rate of movement of the



Scheme 1. Schematic diagrams of swelling/eroding of polyionic complexes: PAA:CS:A (0:2.5:2)—1.75 M (A); PAA:CS:A (1:2.5:2)—1.75 M (B), and PAA:CS:A (1:2.5:2)—5.25 M (C).

erosion front. Shin et al. [9] have reported that a similar expansion of the polymeric chains was achieved when there was an increase of ionic groups in the formulation.

To investigate more precisely the effect of interpolymer complex formation on the release of amoxicillin, the results were analyzed according to the Peppas equation [15]. The hydrogel PAA:CS:A (5:2.5:2)—1.75 M did not present an adequate fitting to this equation because it showed a high initial burst effect. In other cases, the n values were lower than 0.5 (Table 1). These non-Fickian behaviors may suggest that the amoxicillin release from hydrogels was controlled by a combination of drug diffusion and swelling dissolution.

Fig. 3 shows the swelling and release kinetics of different interpolymer complexes with increasing amounts of PAA and a higher proportion of CS (5.0).

In comparison to the formulations with 2.5 of CS content, Fig. 3A shows that the presence of a higher amount of CS in the hydrogel caused an increase in the maximum S_w ratio. This could be attributed to the effect of cationic materials, like CS, that contain pendent groups such as amines. These groups ionize in a low-pH environment (SGF), causing increased electrostatic repulsions [4,18]. The S_w ratio was increased by the presence of PAA, attaining a maximum S_w at 17.59 and 17.80 for PAA:CS:A ratios of (1:5:2)—1.75 M and (2.5:5:2)—1.75 M, respectively. However, the polyionic complex with the greatest amount of both components, PAA:CS:A (5:5:2)—1.75 M, presented a maximum S_w ratio slightly lower than in the latter formulations, owing to the fact that this hydrogel was less porous and the existence of a higher amount of PAA and CS chains

Table 1

Initial burst effects (%), kinetic constants (K), release exponents (n), determination coefficients (r^2) following linear regression of release data of amoxicillin CS–PAA interpolymers produced in 1.75 M acetic acid medium

Polyionic complex PAA:CS:A	Initial burst release (%)	n	k	r^2
(0:2.5:2)—1.75 M	46.03	0.32	0.17	0.9925
(1:2.5:2)—1.75 M	29.32	0.42	0.09	0.9992
(2.5:2.5:2)—1.75 M	61.51	0.16	0.38	0.9945
(0:5:2)—1.75 M	24.78	0.48	0.07	0.9983
(1:5:2)—1.75 M	54.04	0.18	0.99	0.9919
(5:2.5:2)—1.75 M	94.54	—	—	—
(2.5:5:2)—1.75 M	37.61	0.31	0.17	0.9966
(5:5:2)—1.75 M	74.26	0.11	0.55	0.9957

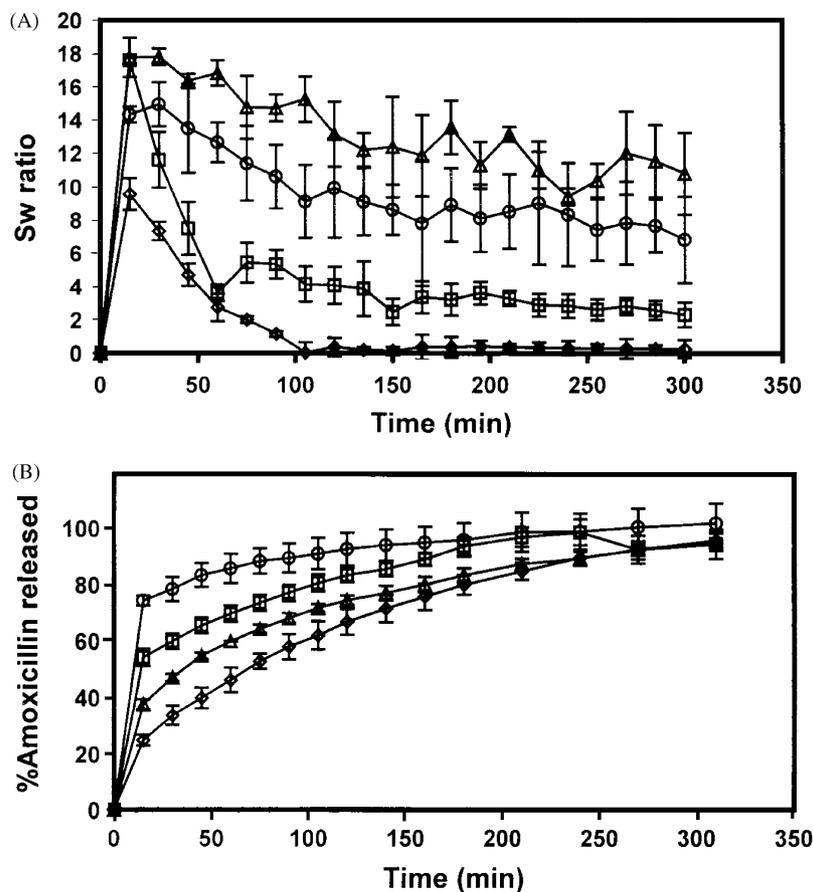


Fig. 3. Swelling/eroding (A) and release kinetics (B) in SGF of freeze-dried polyionic complexes with a CS proportion of 5.0: PAA:CS:A (0:5:2)—1.75 M (\diamond), PAA:CS:A (1:5:2)—1.75 M (\square), PAA:CS:A (2.5:5:2)—1.75 M (\triangle), and PAA:CS:A (5:5:2)—1.75 M (\circ).

within the interpolymer complex obstructed the uptake of solvent in the network [16].

A greater number of electrostatic repulsions generated a fast swelling and a slow down in the erosion profile for PAA:CS:A polyionic complexes with ratios of (2.5:5:2)—1.75 M and (5:5:2)—1.75 M, respectively [4,18]. The electrostatic interaction between both polymeric chains in the network was not permanent, originating a faster erosion rate than in other cross-

linked CS-based hydrogels obtained by different processes [5–7].

Fig. 3B shows that the existence of greater amounts of CS caused slower release profiles, PAA:CS:A (0:5:2)—1.75 M, and that it could be attributed to a greater number of bonds in the network structure that retarded the amoxicillin diffusion.

Drug release from these interpolymer complexes followed a non-Fickian diffusion mechanism (see

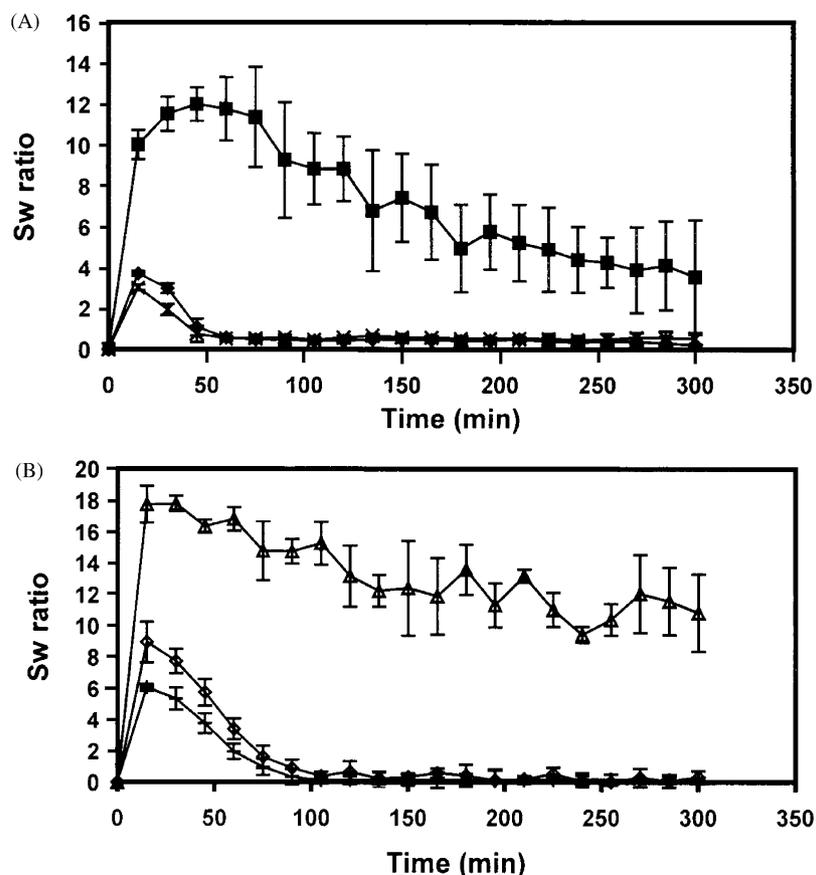


Fig. 4. Swelling/eroding profiles at 37°C in SGF (pH=1.2) of freeze-dried polyionic complexes produced in different hydrogel-forming media. (A) Formulations with a CS proportion of 2.5: PAA:CS:A (1:2.5:2)—1.75 M (-■-), PAA:CS:A (1:2.5:2)—3.50 M (-X-) and PAA:CS:A (1:2.5:2)—5.25 M (-◆-). (B) Formulations with a CS proportion of 5.0: PAA:CS:A (2.5:5:2)—1.75 M (-△-), PAA:CS:A (2.5:5:2)—3.50 M (-+-), and PAA:CS:A (2.5:5:2)—5.25 M (-◇-).

Table 1). Most of our hydrogels show that low n values are related to a high initial burst release. The polyionic complex PAA:CS:A (2.5:5:2)—1.75 M showed an n value of 0.31, similar to the hydrogels containing only CS. However, this polyionic complex showed a suitable release in an early stage (37.61% initial burst effect percentage). These results suggested that the release was controlled by the diffusion of amoxicillin and a combination of swelling and dissolution of hydrogel.

3.2. Study of the influence of ionic strength in two different interpolymer complexes

The effect of the hydrogel-forming medium on hydrogel swelling and eroding was studied (see Fig. 4). Results showed that increasing the ionic strength of the medium greatly reduced the maximum S_w ratio. Formulations PAA:CS:A (1:2.5:2)—3.50 M and PAA:CS:A (1:2.5:2)—5.25 M had similar results at 3.03 and 3.72, respectively (Fig. 4A), and hydrogels PAA:CS:A (2.5:5:2)—3.50 M and PAA:CS:A (2.5:5:2)—5.25 M achieved the maximum S_w ratio at 6.06 and 8.94,

respectively (Fig. 4B). There are several possible explanations for the drastic decrease in maximum S_w ratios of the polyionic complexes developed in high ionic strength hydrogel-forming media, firstly, absence of pores on the surface would result in decreased water rise by capillary action leading to decreased swelling, secondly, increasing the ionic strength would cause a greater collapse in the structure of the network, therefore erosion was quick and extensive. Water uptake was reduced by a lower swelling, thus, the repulsion between amino groups was decreased hindering the uncoiling and expansion of polymer chains (see Scheme 1C). Similar result with water uptake was obtained by Coviello et al. [19] with a crosslinked system from scleroglucan derivative, which was remarkably affected by ionic strength.

Fig. 5 shows the effect of the hydrogel-forming medium on amoxicillin release. Fig. 5A shows that polyionic complexes PAA:CS:A (1:2.5:2)—3.50 M and PAA:CS:A (1:2.5:2)—5.25 M exhibited high drug release in the first hour at 95.26% and 92.77%, respectively, much faster than PAA:CS:A (1:2.5:2)—1.75 M. These

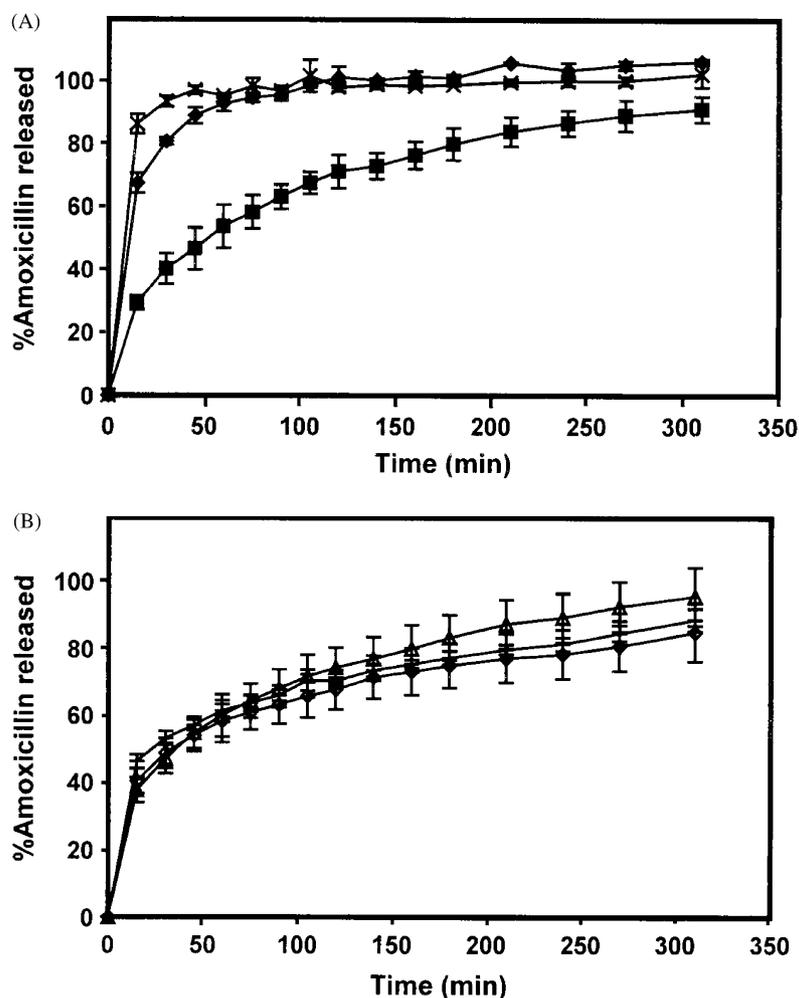


Fig. 5. Release profiles at 37°C in SGF (pH=1.2) of freeze-dried polyionic complexes produced in different hydrogel-forming media. (A) Formulations with a CS proportion of 2.5: PAA:CS:A (1:2.5:2)—1.75 M (-■-), PAA:CS:A (1:2.5:2)—3.50 M (-X-) and PAA:CS:A (1:2.5:2)—5.25 M (-◆-). (B) Formulations with a CS proportion of 5.0: PAA:CS:A (2.5:5:2)—1.75 M (-△-), PAA:CS:A (2.5:5:2)—3.50M (-+-), and PAA:CS:A (2.5:5:2)—5.25M (-◇-).

Table 2

Initial burst effects (%), kinetic constants (K), release exponents (n), determination coefficients (r^2) following linear regression of release data of amoxicillin from CS-PAA interpolymer complexes produced in 3.50 and 5.25 M acetic acid media

Polyionic complex PAA:CS:A	Initial burst release (%)	n	k	r^2
(1:2.5:2)—3.50 M	86	—	—	—
(1:2.5:2)—5.25 M	67.23	—	—	—
(2.5:5:2)—3.50 M	46.13	0.21	0.26	0.9966
(2.5:5:2)—5.25 M	40.30	0.24	0.21	0.9970

interpolymer complexes presented a high proportion of drug released during the initial hydration. The release from these hydrogels is too rapid for them to be useful for controlled drug delivery. A similar release by increasing the ionic strength was obtained by Inukai et al. [20] in hyaluronate hydroxyethyl acrylate blend hydrogels.

However, the release rates from formulations with a higher CS content were independent of the ions amount

of the hydrogel-forming medium, achieving values from 58.10% to 61.31% in the first hour (see Fig. 5B). Possibly, this could be attributed to the existence of a higher amount of both polymers within the hydrogel that produced a greater entwining of both polymeric chains within the network. In these conditions, drug was greatly entrapped into the mesh space of the network structure. Tabata et al. [21] have reported similar results, showing that an increased ionic strength in the solution

did not affect the drug release, indicating the occurrence of coordinate bonding of drug to specific groups within the hydrogel.

Table 2 shows that interpolymer complexes developed in the hydrogel-forming medium with greater ion concentration (3.50 and 5.25 M). A good fitting of polyionic complexes that contain a lower amount of CS (PAA:CS:A 1:2.5:2 3.50 and 1:2.5:2 5.25 M) was difficult to perform due to the high initial burst release. These could be related to a reduced swelling in an early stage and to a weak electrostatic interaction during a late stage.

Table 2 also shows hydrogels with a higher CS content, PAA:CS:A (2.5:5:2)—3.5 M and PAA:CS:A (2.5:5:2)—5.25 M, which presented a non-Fickian release, with similar n values (0.21, 0.23, respectively). Similar non-Fickian release has been obtained by Anh et al. [15]. These results pointed out: firstly, that the ionic strength of hydrogel-forming medium had less effect on amoxicillin release in these interpolymer complexes, and secondly, that swelling and dissolution hydrogel kinetics were the predominant mechanisms of release in diffusion of amoxicillin.

4. Conclusions

These results lead to the conclusion that for a fixed amount of CS, the presence of PAA in the formulation, produced electrostatic polymer/polymer interactions within the network, between cationic and carboxylic chains of both polymers. In gastric simulated fluid, these kind of interactions caused a greater swelling extent and a slower eroding rate of these interpolymer complexes, compared to freeze-dried hydrogels without PAA (see Scheme 1A and B). The presence of higher CS content in the complexes, for example PAA:CS:A (2.5:5:2)—1.75 M, generated a higher repulsion between the polymeric chains, therefore a further increase in its maximum S_w ratio and a more sustained erosion profile were obtained in the SGF. Finally, the presence of higher ion amount in the hydrogel-forming medium (see Scheme 1C) produced a network collapse. These changes of interactions caused a decrease in their S_w and a fast amoxicillin release for complexes with low amount of both polymers. However, increased ion amount within the network did not affect the amoxicillin release in hydrogels with higher amount of both polymers.

The diffusion exponents (n) of these polyionic complexes show that swelling and dissolution of the hydrogel are the predominant release mechanisms on amoxicillin diffusion process.

PAA:CS:A (1:2.5:2)—1.75 M and PAA:CS:A (2.5:5:2)—1.75 M polyionic complexes could be the most suitable hydrogels for site-specific drug delivery to the

stomach for *H. pylori* treatment, due to its controlled release profile, porosity and good swelling-erosion kinetics.

Acknowledgements

This work was supported by FIS project no. PI 020418 and Complutense project no. PR78/02-11056.

References

- [1] Kees F, Holstege A, Ittner K, Zimmermann M, Lock G, Scholmerich J, Grobecker H. Pharmacokinetic. Interaction between proton pump inhibitors and roxithromycin in volunteers. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14:407–12.
- [2] Atherton JC, Cullen DJE, Kirk G, Hawkey C, Spiller R. Enhanced eradication of *Helicobacter pylori* by pre-versus post-prandial amoxicillin suspension with omeprazole: implications for antibiotic delivery aliment. *Pharmacol Ther* 1996;10:631–5.
- [3] Patel VR, Amiji MM. Preparation and characterization of freeze-dried chitosan-poly (ethylene oxide) hydrogels for site-specific antibiotic delivery in the stomach. *Pharm Res* 1996;13:588–93.
- [4] Risbud MV, Hardikar AA, Bhat SV, Bhonde RR. PH-sensitive freeze-dried chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogels as controlled release systems for antibiotic delivery. *J Control Rel* 2000;68:23–30.
- [5] Noble L, Gray AI, Sadiq L, Uchegbu IF. A non-covalently cross-linked chitosan based hydrogel. *Int J Pharm* 1999;192:173–82.
- [6] Chellat F, Tabrizian M, Dumitriu S, Chornet E, Rivard CH, Yahia L. Study of biodegradation behavior of chitosan-xanthan microspheres in simulated physiological media. *J Biomed Mater Res* 2000;53:592–9.
- [7] Bae YH, Kim SW. Hydrogel delivery systems based on polymer blends, block-copolymers or interpenetrating networks. *Adv Drug Del Rev* 1993;11:109–35.
- [8] Dumitriu S, Chornet E. Inclusion and release of proteins from polysaccharide-based polyions complexes. *Adv Drug Del Rev* 1998;31:223–46.
- [9] Shin HS, Kim SY, Lee YM. Indomethacin release behaviors from pH and thermoresponsive poly (vinyl alcohol) and poly (acrylic acid) IPN hydrogels for site-specific drug delivery. *J Appl Polym Sci* 1997;65:685–93.
- [10] Bell CL, Peppas NA. Modulation of drug permeation through interpolymer complexed hydrogels for drug delivery applications. *J Control Rel* 1996;39:201–7.
- [11] Khare AR, Peppas NA. Release behavior of bioactive agents from pH-sensitive hydrogels. *J Biomater Sci Polym Ed* 1993;4:275–89.
- [12] Bettini R, Colombo P, Peppas NA. Solubility effects on drug transport through pH-sensitive, swelling-controlled release systems: transport of theophylline and metoclopramide monohydrochloride. *J Control Rel* 1995;37:105–11.
- [13] Peniche C, Elvira C, San Roman J. Interpolymer complexes of chitosan and polymethacrylic derivatives of salicylic acid: preparation characterization and modification by thermal treatment. *Polymer* 1998;39:6549–54.
- [14] Gabrieli I, Gatenholm P. Preparation and properties of hydrogels based on hemicellulose. *J Appl Polym Sci* 1998;69:1661–7.
- [15] Ahn JS, Choi HK, Chun MK, Ryu JM, Jung JH, Kim YU, Cho CS. Release of triamcinolone acetonide from mucoadhesive polymer composed of chitosan and poly(acrylic acid) in vitro. *Biomaterials* 2002;23:1411–6.

- [16] Wang H, Li W, Lu Y, Wang Z. Studies on chitosan and poly (acrylic acid) interpolymer complexes. I. Preparation structure pH-sensitivity and salt sensitivity of complex-forming poly (acrylic acid): chitosan semiinterpenetrating polymer network. *J Appl Polym Sci* 1997;65:1445–50.
- [17] Munjeri O, Collet JH, Fell JT. Hydrogel beads based on amidated pectins for colon-specific drug delivery: the role of chitosan in modifying drug release. *J Control Rel* 1997;46:273–8.
- [18] Peppas N, Bures P, Leobandung W, Ichikawa H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur J Pharm Biopharm* 2000;50:27–46.
- [19] Coviello T, Grassi M, Rambone G, Alhaique FA. Crosslinked system from scleroglucan derivative; preparation and characterization. *Biomaterials* 2001;22:1899–909.
- [20] Inukai M, Jin Y, Yomota C, Yonese M. Preparation and characterization of hyaluronate–hydroxyethyl acrylate blend hydrogel for controlled release device. *Chem Pharm Bull* 2000;48:850–4.
- [21] Tabata Y, Matsui Y, Ikada Y. Growth factor release from amylopectin hydrogel based on copper coordination. *J Control Rel* 1998;56:135–48.

Release of amoxicillin from polyionic complexes of chitosan and poly(acrylic acid). study of polymer/polymer and polymer/drug interactions within the network structure

Paloma M. de la Torre^a, Yewande Enobakhare^a, Guillermo Torrado^b, Susana Torrado^{a,*}

^a Department of Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, Complutense University, Avda. Complutense SIN, Madrid 28040, Spain

^b Department of Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, Alcalá de Henares University, Madrid 28040, Spain

Received 30 September 2002; accepted 18 October 2002

Abstract

Polyionic complexes of chitosan (CS) and poly(acrylic acid) (PAA) were prepared in a wide range of copolymer composition and with two kind of drugs. Release of amoxicillin trihydrate and amoxicillin sodium from these different complexes were studied. The swelling behavior of and solute transport in swellable hydrogels were investigated to check the effect of polymer/polymer and polymer/drugs interactions. The electrostatic polymer/polymer interactions take place between the cationic groups from CS and the anionic ones from PAA. The diffusion of amoxicillin trihydrate was controlled only by the swelling/eroding ratio of the polyionic complexes. The swelling degree of amoxicillin sodium hydrogels was more extensive when compared to the swelling degree of amoxicillin trihydrate formulations. It was concluded that the water uptake was mainly governed by the degree of ionization. Restriction of amoxicillin sodium diffusion could be achieved by polymer/ionized-drug interaction that retards the drug release.

Freeze-dried polyionic complexes could serve as suitable candidates for amoxicillin site-specific delivery in the stomach.

© 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Chitosan; Poly(acrylic acid); Polyionic complexes; Amoxicillin

1. Introduction

The localized treatment of *Helicobacter pylori* infections of the stomach could be scientifically improved if a site specific antibiotic drug delivery system could be developed. In vivo *Helicobacter pylori* is closely associated with the adherent mucus layer, living both within and beneath it and adhering to the gastric epithelial cells [1]. The failure of conventional treatments could be due to poor permeability of the antibiotics across the mucus layer, or due to the availability of sub-therapeutic antibiotic concentrations at the site of infection after administration from conventional tablets or capsules. Recently, several authors have pointed out that pH-sensitive swelling covalently and non-covalently cross-linked hydrogels seem to be useful for localized antibiotic delivery in the acidic environment of the gastric fluid. One of the most important advantages of these hydrogels is that formulations remain during more

time than conventional ones on the targeted site. Patel et al. [2] and Risbud et al. [3] have employed freeze-dried hydrogels for site-specific amoxicillin and metronidazole delivery in the stomach. Several covalently cross-linked chitosan-based hydrogels have been developed for site-specific therapy by different authors [2–4]. Chitosan has been used in many studies of hydrogels because of its good properties such as non-toxicity and biodegradability [5–14]. This polymer possesses reactive functionalities represented by the amino groups, it is easily degraded by enzymes, and the degradation products are not toxic [6,11–13]. However, heterogeneous polymer mixtures may also be used to form hydrogels without the need for covalent cross-linking [5,12,13]. The slow erosion of this non-covalently cross-linked hydrogel in aqueous environments gives a more biodegradable material than covalently cross-linked hydrogels [5]. Some complexes are formed by ionic association of repeating units on the polymer chains. Polymers that exhibit polyelectrolyte complexation include chitosan (CS) with poly(acrylic acid) (PAA) [8].

*Corresponding author. Tel.: +34-1-3941727; fax: +34-1-3941736.
E-mail address: torrado1@farm.ucm.es (S. Torrado).

Recently, certain aspects of a possible interaction between charged groups of the polymer and drug has been studied [15–17]. Those results showed that a lower diffusivity was observed in high water-soluble drugs [15] and when the solute size increased [17].

In the present study we have developed freeze-dried CS-PAA non-covalently polyionic complexes. The aim of the present work was to clarify the grade of network complexation obtained by the different ratios of both polymers within the hydrogel and the associated transport of ionized and non-ionized drugs. The main emphasis was placed on the investigation of the possible interactions between polymer and drug, as well as their effects on amoxicillin release in simulated gastric fluid.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Chitosan (low molecular weight) (CS) was purchased from Fluka Biochemika (Mol Wt 150 000). Carbopol[®] 974P NF (PAA) was obtained from BF Goodrich (Ohio, USA). Amoxicillin trihydrate BP/USP was obtained from Antibiotics (Madrid, Spain), amoxicillin sodium BP/USP was obtained from Normon (Madrid, Spain). Glacial acetic acid PRS and hydrochloric acid PA 37% were both purchased from Panreac Química S.A. (Barcelona, Spain). All chemicals were of analytical grade.

2.2. Hydrogel preparation

Hydrogels were prepared with Chitosan (CS) and Carbopol[®] 974P NF (PAA). A constant ratio of 2 of amoxicillin trihydrate (A) or sodium (A-NA) was added to all formulations to study the influence of drug solubility on the swelling and release kinetics of the hydrogels. The ratios of freeze-dried CS-only hydrogels were: formulation A (CS:PAA:A 2.5:0:2), B (CS:PAA:A 5:0:2), C (CS:PAA:A 7.5:0:2); and the ones of CS: PAA hydrogels were: D (CS:PAA:A 2.5:1:2), E (CS:PAA:A 5:1:2), F (CS:PAA:A 7.5:1:2), D-NA (CS:PAA:A-NA 2.5:1:2), E-NA (CS:PAA:A-NA 5:1:2) and F-NA (CS:PAA:A-NA 7.5:1:2). The procedure was as follows: 125.0 mg of PAA was dissolved in 25.0 ml of acetic acid 1.75 M. Next, 250.0 mg of amoxicillin trihydrate or sodium was then added to the gel gradually while mixing, until a uniform dispersion of drug was formed. Chitosan was added gradually and mixed to get a uniform gel. The hydrogel was neutralized with sodium hydroxide 3 M to reach a pH of 5.0 and the volume was adjusted to 40.0 ml for each formulation. The polyionic complexes were cast onto Petri dishes of 100.0 ml with 100.0 mm i.d. Finally, gels were freeze-dried using a Liolabar 7 (Telstat Inc., Madrid, Spain). The different

hydrogel formulations after the freeze-dried process presented similar volumes. Changes of porosity and network structure were obtained by varying the polymers ratio. Samples were cut into $2 \times 2 \text{ mm}^2$ squares.

2.3. Scanning electron microscopy (SEM) studies

Freeze-dried samples were mounted on an aluminum sample mount. After coating with gold-palladium, the hydrogel samples were analyzed with a Jeol[®] 6400 scanning electron microscope. All micrographs were the product of secondary electron imaging used for surface morphology identification at different magnifications and an accelerating voltage of 20 KV.

2.4. Swelling experiments

Freeze-dried hydrogels were swollen in 450 ml 0.1 M HCl of enzyme-free simulated gastric fluid (SGF, pH 1.2) at temperature 37°C prepared in the procedure described in the USP 24. The swelling studies were carried out using testing apparatus 1 (Vankel[®] dissolution apparatus). Empty dry baskets were weighted. The basket's rotation speed was set at 100 rpm. At 15 min time intervals, the samples were removed from the swelling medium and blotted on piece of filter paper prior to weighing to remove excess surface moisture. The swelling ratio (SW) was determined according to the following expression:

$$\text{SW}(\text{wt}) = W_s / W_d$$

where W_s is the weight of the swollen hydrogel and W_d is the weight of the dried hydrogel. The data represents mean \pm SD from three samples per formulation. The studies were carried out for 5 h.

2.5. Release experiments

The release studies of all formulations were performed using testing apparatus 1 of the USP 23 (Vankel[®] dissolution apparatus), 100 r.p.m. The dissolution medium was 450 ml SGF (0.1 M HCl) at 37°C. At pre-determined time points, 5 ml of SGF was removed and filtered using a 0.45 μm filter and assayed for amoxicillin at 228.5 nm using a UV-VIS Beckman DU[®]-7 Spectrophotometer. The cumulative amount of amoxicillin trihydrate or sodium released from the hydrogel was determined from the appropriate calibration curves. The data represents mean \pm SD from three independent experiments.

To investigate more precisely the effect of polyionic complex formation on the release of amoxicillin, the results were analyzed according to the following

equation [18]:

$$M_t/M = kt^n,$$

where M_t/M is the amount of amoxicillin (%) released at time t (h), n is a diffusional exponent and k is the apparent release rate (%/h).

2.6. Characterization of hydrogels via infra-red spectroscopy

A Perkin Elmer[®] FTIR Paragon 1000 infra-red spectrometer was used. The scan range was 500–4000 cm^{-1} . Each spectrum was automatically averaged over 16 scans obtained at a spectral resolution of 4 cm^{-1} . Samples were thoroughly ground with exhaustively dried KBr and pellets were prepared by compression under vacuum. A sample cup filled with dried KBr powder was used as the background data set.

3. Results and discussion

3.1. SEM characterization

The complexes formed by chitosan and poly(acrylic acid) are highly porous. Patel et al. [2] reported that it

has to be taken into account that since SEM analysis was done with dry hydrogels, the pore size cannot reflect the magnitude of drug diffusion in the swollen state. Figs. 1a and b shows the scanning electron micrographs of different freeze-dried hydrogels with amoxicillin trihydrate at the same magnification. The top view of formulation D (CS:PAA:A 2.5:1:2) (Fig. 1a) showed a highly porous surface with an approximate pore size of 25–50 μm , and those regular pores were all connected each other to form capillary channels. This structure has been previously described in the literature [2,3]. In contrast, the morphology is different when the freeze-dried formulation only contains amoxicillin trihydrate and CS as in formulation A (CS: PAA:A 2.5:0:2) (Fig. 1b), it was not porous and it possessed a scaly structure. Those morphological changes between D and A could have a significant influence on the rate and extent of hydrogel swelling and drug release in SGF.

Fig. 1c and d show the scanning electron micrographs of different freeze-dried hydrogels with amoxicillin sodium at the same magnification. Thus, the complex D-NA (CS:PAA:A-NA 2.5:1:2) (Fig. 1c) presented a irregular surface highly porous with irregular orifices of different sizes. The formulation CS:PAA:A-NA 5:1:2 shows a regular disposition on its surface with an

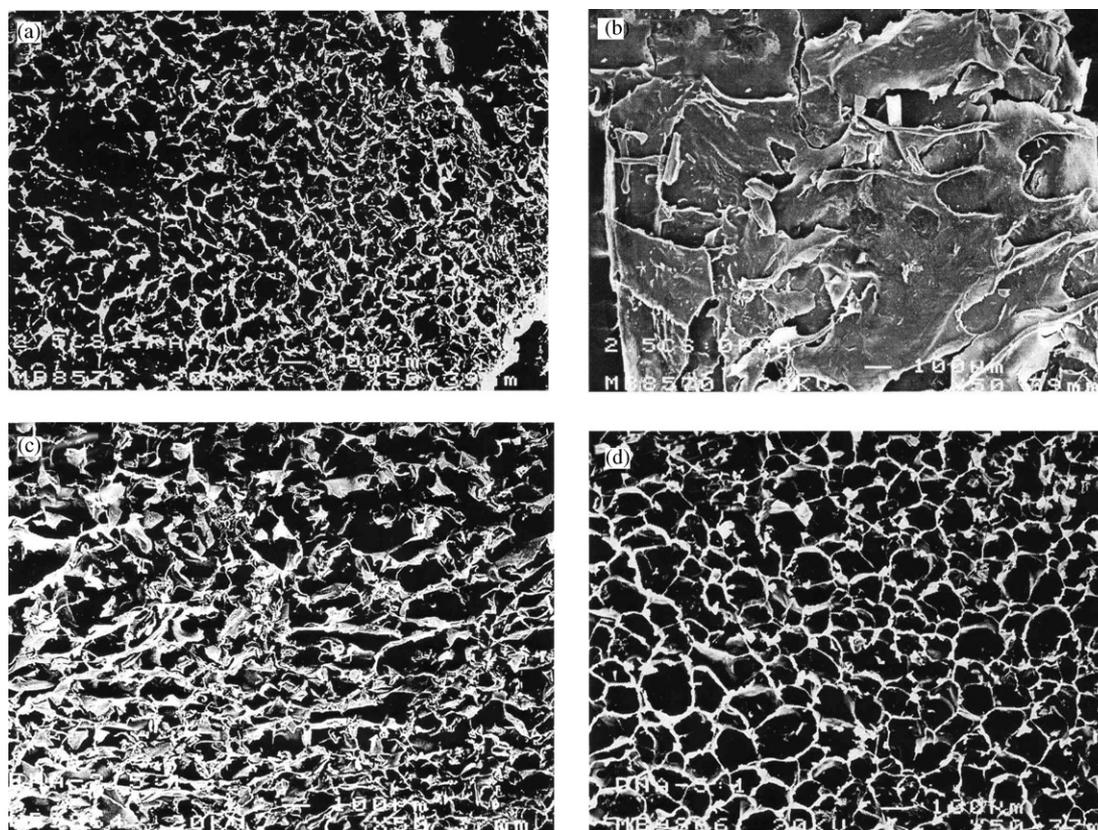


Fig. 1. Scanning electron micrographs of freeze-dried CS-based hydrogels. The first two micrographs depict top view of amoxicillin trihydrate formulations: D (CS:PAA:A 2.5:1:2) (a) and A (CS:PAA:A 2.5:0:2) (b). The other two micrographs outline surface of formulation D-NA (CS: PAA:A-NA 2.5:1:2) (c) and E-NA (CS: PAA:A-NA 5:1:2) (d). Original magnification was $50\times$ and the scale bar is equal to 100 μm .

approximate pore size of 100–150 μm (Fig. 1d). The presence of an ionized drug produces changes in the network structure when a higher amount of chitosan was added to the complex, which could affect the swelling behavior and drug release from the hydrogels.

3.2. IR studies

The IR spectrum of CS (Fig. 2a) showed characteristic peaks of amide groups: amide I and amide III bands at 1653.31 and 1322.92 cm^{-1} , respectively. At 1715.62 cm^{-1} in the IR spectrum of PAA (Fig. 2b), has been assigned to C=O stretching vibration of carboxylic groups.

In comparison with Figs. 2a and b it is shown important changes in the spectrum of freeze-dried hydrogels without entrapped drug with a ratio of CS:PAA 2.5:1. In Fig. 2c two strong peaks at 1413.05 and 1558.59 cm^{-1} can be observed due to the asymmetrical and symmetrical stretching of COO^- groups, respectively, while the peak at 1640.10 cm^{-1} was attributed to the formation of NH_3^+ during the preparation of freeze-dried hydrogels. These results let us consider that our freeze-dried hydrogels presented electrostatic bonds between COO^- groups from PAA and protonated amino groups from CS. In Fig. 2d it is shown the IR spectrum of formulation D with amoxicillin trihydrate. This spectrum is similar to the one of Fig. 2c, this is an indication of non-interaction between both polymer and amoxicillin trihydrate. Similar electrostatic interaction was observed by Anh et al. [18] and Hu et al. [19].

3.3. Analysis of polyionic complex swelling and eroding behavior

Since drug release from our hydrogels is affected by the swelling and the rate of hydrogel degradation when exposed to gastric media we have studied both processes.

First, amoxicillin trihydrate formulations of increasing amounts of CS within the network were compared without PAA (Fig. 3a) and with PAA (Fig. 3b). The maximum swelling ratio (maximum Sw ratio) of all formulations occurred at short times (15 min) with the exception of formulation C (CS: PAA:A 7.5:0:2) and D (CS:PAA:A 2.5:1:2) at 45 min. The porous nature of the freeze-dried hydrogel may be responsible for offering a larger surface area and, therefore, a better matrix-solvent interaction, allowing faster solvent uptake getting an efficient and rapid swelling [3]. Fig 3a shows the direct correlation between increased proportion of CS within the network and the effect on maximum Sw ratio. Formulation A with the least proportion of CS (CS: PAA:A 2.5:0:2) exhibited the lowest maximum Sw ratio at 5.77. Increasing CS content within the network increased the degree of swelling as seen in the case of formulations B (CS: PAA:A 5:0:2) and C (CS:PAA:A 7.5:0:2) with maximum Sw ratio at 9.76 and 11.26, respectively. This could be attributed to the presence of a greater amount of polymer (CS) within the network structure with a major amount of pendant groups. These groups ionize in a low pH environment (SGF), thus, ionization increased, causing increased electrostatic repulsions [3,20].

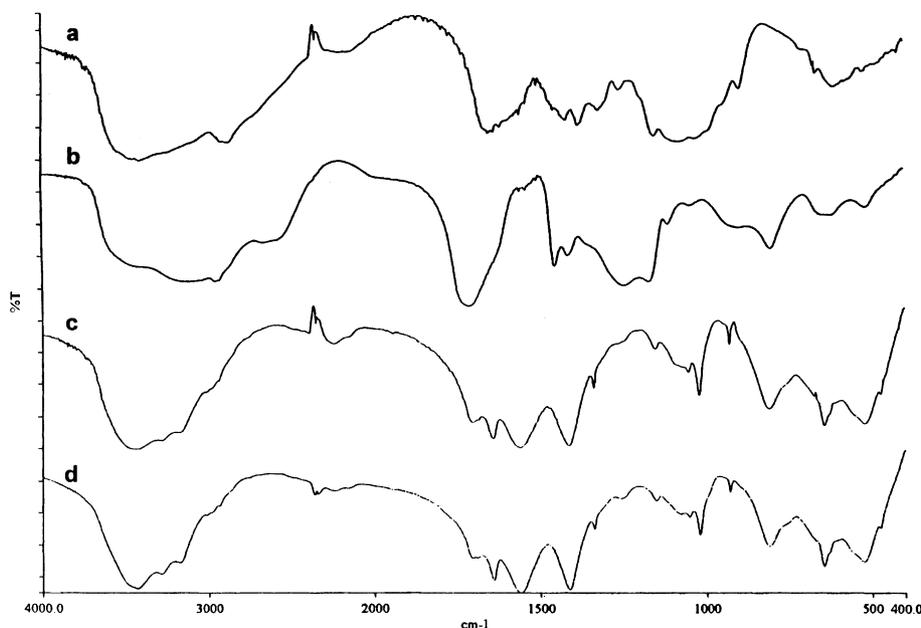


Fig. 2. FTIR spectra of (a) not freeze-dried chitosan of low molecular weight, (b) not freeze-dried carbopol[®] 974P NF, (c) freeze-dried CS: PAA hydrogel (ratio 2.5:1) without entrapped amoxicillin and (d) formulation D (CS: PAA:A 5:1:2) containing amoxicillin trihydrate.

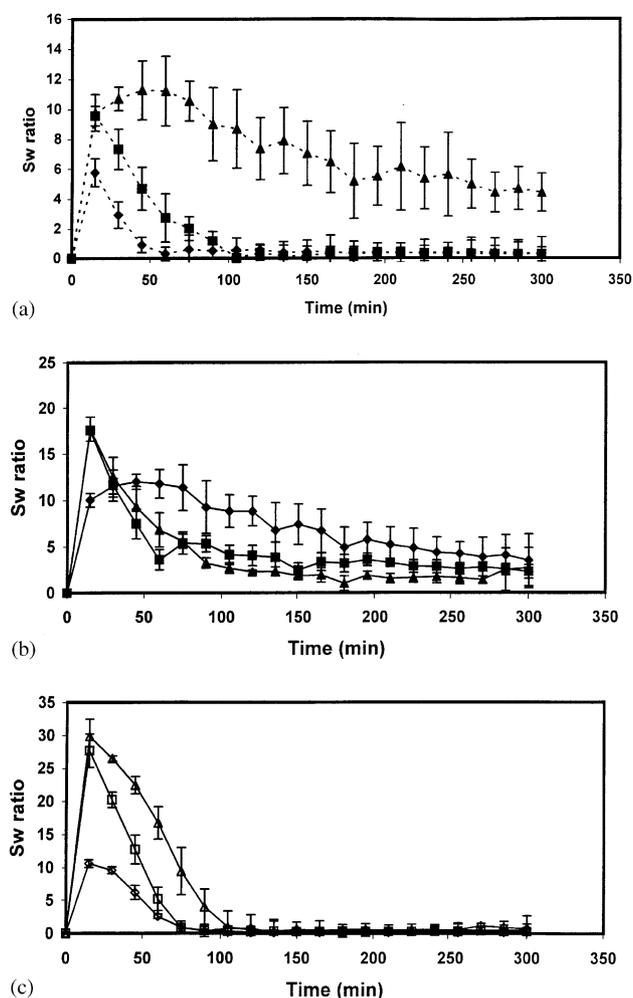


Fig. 3. Swelling and eroding kinetics of freeze-dried hydrogels containing a non-ionized drug ((a) and (b)) and freeze-dried CS: PAA hydrogels with amoxicillin sodium (c). (a) Formulation A (CS:PAA:A 2.5:0:2) (—◆—), formulation B (CS:PAA:A 5:0:2) (---■---) and formulation C (CS:PAA:A 7.5:0:2) (-▲-). (b) Formulation D (CS:PAA:A 2.5:1:2) (-◆-), formulation E (CS:PAA:A 5:1:2) (-■-) and formulation F (CS:PAA:A 7.5:1:2) (-▲-). (c) Formulation D-NA (CS:PAA:A-NA 2.5:1:2) (-◇-), formulation E-NA (CS:PAA:A-NA 5:1:2) (-□-) and formulation F-NA (CS:PAA:A-NA 7.5:1:2) (-△-).

In ionic cross-linked hydrogels, erosion of the network structure is prevented by ionic interactions, which exist between both polymer chains. These labile bonds can be broken in simulated gastric fluid as a result of electrostatic repulsions. The erosion profile of the hydrogel was taken as the time point after the maximum Sw ratio was observed. Fig. 3a shows the effect of increasing the proportion of CS on the erosion rate, the lower the content of CS the greater the rate of erosion. There are two different factors that control this phenomenon: the first one is the higher density of CS in the erosion front [21,22]. And the second one is, increasing CS content within the network will increase the expansion of the chains in the medium (due to the ionic repulsion of amino groups).

In Fig. 3b, it is shown the direct correlation between presence of PAA and the proportion of CS within the network and its swelling properties. The maximum Sw ratio was greatly increased by the presence of PAA. The existence of a high molecular weight polymer in the formulation could help in facilitating the initial hydration of the hydrogels by creating an osmotic gradient [2]. And the presence of PAA within these hydrogels could help the protonation of amine groups from CS causing an electrostatic repulsion among polymeric chains [3, 8]. Formulation E and F had increases in the maximum Sw ratio however the difference between the two was very narrow. For an equal amount of PAA there was a ratio CS:PAA:A of 5:1:2 (formulation E) that presented maximum electrostatic repulsion.

Regarding to eroding behavior of these hydrogels, increasing proportions of CS and the presence of PAA (Fig. 3b) exhibits a different effect to that stated in Fig. 3a. Presence of PAA in a ratio of CS: PAA:A 2.5:1:2 (formulation D) retards the rate and degree of erosion due to increased interaction between carboxylic groups of PAA and amines of CS. However, this effect may be limited by the ratio of CS and PAA. Therefore, this electrostatic interaction is less effective when the CS: PAA ratio is higher increasing the rate of movement of erosion front (as seen in formulation E and F). Shin et al. [23] have reported that there was a similar expansion of the polymeric chains when it was an increase of ionic groups in the formulation.

Also, formulations with an ionized drug entrapped within the network were studied, where it was observed that the drug altered the swelling behavior of hydrogels. For amoxicillin sodium the swelling degree varied with copolymer composition (Fig. 3c). Formulation D-NA with the least proportion of CS (CS: PAA:A-NA 2.5:1:2) exhibited the lowest maximum Sw ratio at 10.61, like amoxicillin trihydrate formulations with the same ratio 12.01. At that ratio of CS: PAA, ionized-drug produced slightly changes in the structure of the formulation that were not enough to modify the electrostatic interaction within the hydrogel. Although, formulations of increasing amounts of CS exhibited a higher Sw ratio than amoxicillin trihydrate formulations, thus, formulation F-NA (CS: PAA:A-NA 7.5:1:2) with the drug in its ionized form presented a Sw ratio at 29.88 greater than formulations of the same ratio with non ionized drug that exhibited a Sw ratio at 17.74. Relating to the eroding studies of these amoxicillin sodium formulations, it was observed a greater degree of erosion causing lower Sw ratio values at the end of the study when they were compared with non-ionized drug formulations. In the same way, CS: PAA ratio of 2.5:1 presented the most important differences in erosion rate between ionized- non-ionized drug formulations where it was observed that the presence of amoxicillin sodium caused greater erosion rates. Those results could be

attributed to a higher expansion of the hydrogel chains when amoxicillin in its ionized form was added to the formulation. This effect let us consider that ionized amoxicillin could facilitate the water uptake which produces changes in the electrostatic interactions within the network.

3.4. The release studies of formulations

Fig. 4 shows the cumulative release rates of different formulations with varying amounts of CS and PAA. All formulations present an initial burst effect may be attributed to the diffusion of the drug caused by rapid gel swelling and also the release of drug adsorbed towards the surface of the gel matrix [4].

In Figs. 4a and b it is showed that CS and CS: PAA hydrogels of amoxicillin trihydrate with higher amount of CS presented faster drug delivery. The use of pure chitosan formulations in oral administration is limited due to their fast dissolution in the stomach and their limited capacity for controlling the release of drugs [3]. The formulation with the lowest ratio of CS:PAA (2.5:1) presented a suitable controlled release profile, about 53.55% and a 70.98% of amoxicillin trihydrate was released after 1 and 2 h, respectively. These release results will ensure maximum availability of the drug in the stomach. The use of hydrogels for drug delivery in the stomach has been studied by several authors thus Nobel et al. [5] have prepared a non-covalently cross-linked hydrogel by means of a freeze-drying process yielding a soft, slowly eroding gel that had a controlled release. Amoxicillin release from covalently CS-based hydrogels have been studied by Patel et al. [2] and Risbud et al. [3], where the release was 65% in the first 2 h in freeze-dried CS-poly(ethylene oxide) semi-interpenetrating polymer network (semi-IPN) [2] and 51% after 3 h in freeze-dried CS-polyvinyl pyrrolidone semi-IPN [3]. The reason behind this is based on a number of factors, which include: the rate of erosion and the presence of irregular pores of different sizes, observed by SEM from the different formulations, that could explain the fast release of these hydrogels. Thus, formulation D, unlike the rest of formulations containing amoxicillin trihydrate, presents a regular porous surface that will allow a greater control of release.

Table 1 shows that amoxicillin trihydrate hydrogels presented a non-Fickian release with n values between 0.32–0.48. The kinetic parameters obtained here may suggest that release of non-ionized amoxicillin (trihydrate) was controlled by a combination of diffusion/dissolution of the polyionic complex.

The rapid swelling and drug release demonstrated by formulation D might be beneficial for site-specific antibiotic delivery in the stomach, because of the limitations of the gastric emptying time.

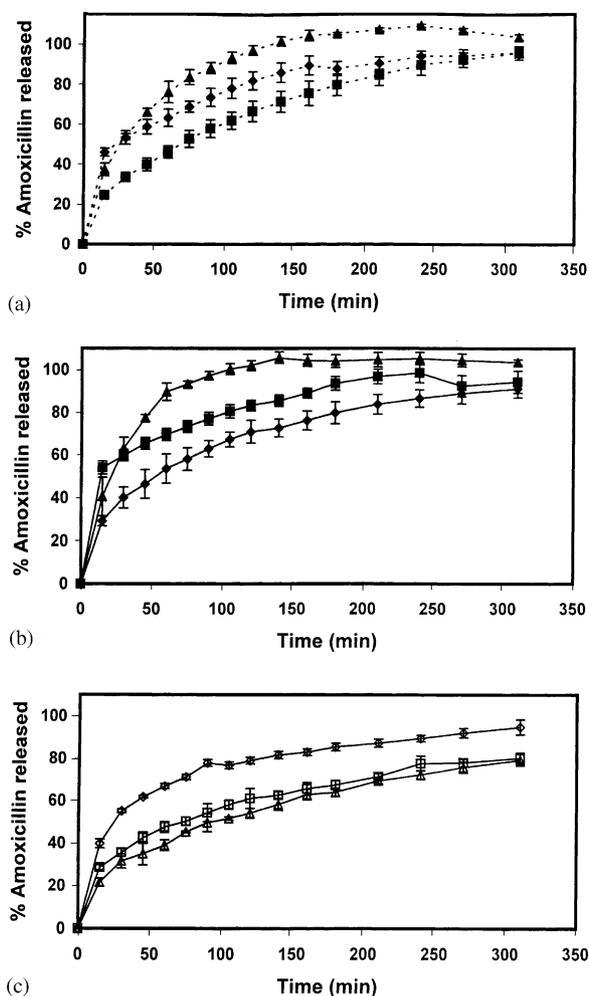


Fig. 4. Release profiles at 37°C in SGF (pH=1.2) of freeze-dried hydrogels containing a non-ionized drug ((a) and (b)) and freeze-dried CS: PAA hydrogels with amoxicillin sodium (c). (a) Formulation A (CS:PAA:A 2.5:0:2) (—◆—), formulation B (CS:PAA:A 5:0:2) (—■—) and formulation C (CS:PAA:A 7.5:0:2) (—▲—). (b) Formulation D (CS:PAA:A 2.5:1:2) (—◆—), formulation E (CS:PAA:A 5:1:2) (—■—) and formulation F (CS:PAA:A 7.5:1:2) (—▲—). (c) Formulation D-NA (CS:PAA:A-NA 2.5:1:2) (—◇—), formulation E-NA (CS:PAA:A-NA 5:1:2) (—□—) and formulation F-NA (CS:PAA:A-NA 7.5:1:2) (—△—).

Table 1

Initial burst effect (%), kinetic constants (K), release exponents (n), determination coefficients (r^2) following linear regression of release data of amoxicillin trihydrate from CS-PAA polyionic complexes

CS:PAA:A	Initial burst (%)	n	K	r^2
2.5:0:2	46.02	0.32	1.75	0.9925
5:0:2	24.78	0.48	2.71	0.9983
7.5:0:2	37.50	0.43	2.09	0.9854
2.5:1:2	29.31	0.42	2.37	0.9992
5:1:2	54.06	—	—	—
7.5:1:2	37.50	0.43	2.09	0.9854

Table 2

Initial burst effect (%), kinetic constants (K), release exponents (n), determination coefficients (r^2) following linear regression of release data of amoxicillin sodium from CS-PAA polyionic complexes

CS:PAA:A-NA	Initial burst (%)	n	K	r^2
2.5:1:2	39.78	—	—	—
5:1:2	28.54	0.35	2.20	0.9961
7.5:1:2	21.56	0.43	2.66	0.9955

The cumulative release rates of three different formulations of amoxicillin sodium are shown in Fig. 4c. Formulation D-NA has shown a slightly faster release profile than amoxicillin trihydrate formulation with the same ratio of CS: PAA. Unlike the others formulations of amoxicillin trihydrate, for ratios of CS: PAA 5:1 and 7.5:1, drug release is retarded, thus in the first 2 h the percentages of release from formulations E-NA and F-NA were 61.19% and 54.28%, respectively. These hydrogels adequately fit to a non-Fickian release with a lower burst effect (see Table 2). Similar non-Fickian releases were obtained by Ahn et al. [18] in triamcinolone acetonide release studies from chitosan and poly(acrylic acid) polymer complex films obtained by template polymerization. Therefore, a water soluble drug exhibited a lower diffusion coefficient into the swollen hydrogel than the less water soluble drug, and the diffusivity of ionized drugs was controlled by the water uptake [15].

4. Conclusions

Different release profiles could be obtained by the degree of ionization drug. With non-ionized drugs, such as amoxicilina trihydrate, the electrostatic polymer/polymer interactions take place between the cationic groups from CS and the anionic ones from PAA and the drug is entrapped into the mesh space of the hydrogel. The non-ionized amoxicillin release was controlled by the swelling/eroding ratio. Although, ionized drugs release, was controlled by electrostatic polymer/drug interactions and drug diffusion was retarded as the ionic interactions augmented within the network structure.

On the basis of dynamic swelling/eroding and release data, we demonstrate that is possible to obtain polyionic complexes by a freeze-drying process with suitable amoxicillin release profiles for site-specific antibiotic delivery in the stomach.

Acknowledgements

This work has been supported by a FIS project no. 99/0118 and PI020418.

References

- [1] Goddard AF, Spiller RC. The effect of omeprazole on gastric juice viscosity, pH and bacterial counts. *Aliment Pharm Therap* 1996;10:105–9.
- [2] Patel VR, Amiji MM. Preparation and characterization of freeze-dried chitosan-poly(ethylene oxide) hydrogels for site-specific antibiotic delivery in the stomach. *Pharm Res* 1996;13: 588–93.
- [3] Risbud MV, Hardikar AA, Bhat SV, Bhonde RR. PH-sensitive freeze-dried chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogels as controlled release systems for antibiotic delivery. *J Control Release* 2000;68:23–30.
- [4] Shanta KL, Harding DRK. Preparation and in-vitro evaluation of poly [N-vinyl-2-pyrrolidone-polyethylene glycol diacrylate]-chitosan interpolymeric pH-responsive hydrogels for oral drug delivery. *Int J Pharm* 2000;207:65–70.
- [5] Noble L, Gray AI, Sadiq L, Uchegbu IF. A non-covalently cross-linked chitosan based hydrogel. *Int J of Pharm* 1999;192: 173–82.
- [6] Peniche C, Elvira C, San Roman J. Interpolymer complexes of chitosan and polymethacrylic derivatives of salicylic acid: preparation, characterization and modification by thermal treatment. *Polymer* 1998;39:6549–54.
- [7] Gabrieli I, Gatenholm P. Preparation and properties of hydrogels based on hemicellulose. *J Appl Polym Sci* 1998;69:1661–7.
- [8] Wang H, Li W, Lu Y, Wang Z. Studies on chitosan and poly (acrylic acid) interpolymer complex. I. Preparation, structure, pH-sensitivity and salt sensitivity of complex-forming poly (acrylic acid): chitosan semiinterpenetrating polymer network. *J Appl Polym Sci* 1997;65:1445–50.
- [9] Dumitriu S, Chornet E. Inclusion and release of proteins from polysaccharide-based polyions complexes. *Adv Drug Del Rev* 1998;31:223–46.
- [10] Sugimoto K, Yoshida M, Yata T, Higaki K, Kimura T. Evaluation of poly (vinyl alcohol)-gel spheres containing chitosan as dosage form to control gastrointestinal transit time of drugs. *Biol Pharm Bull* 1998;21:1202–6.
- [11] Remuñán-López C, Portero A, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Design and evaluation of chitosan/ethylcellulose mucoadhesive bilayered devices for buccal drug delivery. *J Control Release* 1998;55:143–52.
- [12] Bae YH, Kim SW. Hydrogel delivery systems based on polymer blends, block-copolymers or interpenetrating networks. *Adv Drug Del Rev* 1993;11:109–35.
- [13] Chellat F, Tabrizian M, Dumitriu S, Chornet E, Rivard CH, Yahia L. Study of biodegradation behavior of chitosan-xanthan microspheres in simulated physiological media. *J Biomed Mater Res* 2000;53:592–9.
- [14] Gupta KC, Ravi Kumar MNV. Drug release behavior of beads and microgranules of chitosan. *Biomaterials* 2000;21:1115–9.
- [15] Bettini R, Colombo P, Peppas NA. Solubility effects on drug transport through pH-sensitive, swelling-controlled release systems: transport of theophylline and metoclopramide monohydrochloride. *J Control Release* 1995;37:105–11.
- [16] Khare AR, Peppas NA. Release behavior of bioactive agents from pH-sensitive hydrogels. *J Biomater Sci Polym Edn* 1993;4:275–89.
- [17] Bell CL, Peppas NA. Modulation of drug permeation through interpolymer complexed hydrogels for drug delivery applications. *J Control Release* 1996;39:201–7.
- [18] Ahn JS, Choi HK, Cho CS, Chun M, Ryu J, Jung J, Kim Y, Cho CS. Release of triamcinolone acetonide from mucoadhesive polymer composed of chitosan and poly(acrylic acid) in vitro. *Biomaterials* 2002;23:1411–6.

- [19] Hu Y, Jiang X, Ding Y, Ge H, Yuan Y, Yang C. Synthesis and characterization of chitosan-poly (acrylic acid) nanoparticles. *Biomaterials* 2002;23:3193–201.
- [20] Peppas NA, Bures P, Leobandung W, Ichikawa H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur J Pharm Biopharm* 2000;50:27–46.
- [21] Colombo P, Bettini R, Massimo G, Catellani PL, Santi P, Peppas NA. Drug diffusion front movement is important in drug release control from swellable matrix tablets. *J Pharm Sci* 1995;84:991–7.
- [22] Colombo P, Bettini R, Santi P, De Ascentiis A, Peppas NA. Analysis of the swelling and release mechanisms from drug delivery systems with emphasis on drug solubility and water transport. *J Control Release* 1996;39:231–7.
- [23] Shin HS, Kim SY, Lee YM. Indomethacin release behaviors from pH and thermoresponsive poly (vinyl alcohol) and poly (acrylic acid) IPN hydrogels for site-specific drug delivery. *J Appl Polym Sci* 1997;65:685–93.

Publicación enviada a **Biomaterials** el 17 de enero de 2003.

Chitosan-poly(acrylic) acid polyionic complex: *in vivo* study to demonstrate prolonged gastric retention.

Susana Torrado, Pablo Prada, Paloma M. de la Torre and Santiago Torrado*

Abstract

The aim of this study was to develop a chitosan-poly(acrylic) acid based controlled drug release system for gastric antibiotic delivery. Different mixtures of amoxicillin (A), chitosan (CS), and poly(acrylic) acid (PAA) were employed to obtain these polyionic complexes. A non-invasive method was employed for determining the gastric residence time of the formulations. It was studied the swelling behavior and drug release from these complexes. Gastric emptying rate study was performed by means of the [¹³C]octanoic acid breath test. The gastric emptying rates of two different formulations (conventional and gastric retentive system) were studied. Swelling studies indicated that the extent of swelling was greater in the polyionic complexes than in the single chitosan formulations. The amoxicillin diffusion from the hydrogels was controlled by the polymer/drug interaction. The property of these complexes to control the solute diffusion depends on the network mesh size, which is a significant factor in the overall behavior of the hydrogels. The gastric half-emptying time of the polyionic complex was significantly delayed compared to the reference formulation, showing mean values of 164.32 ± 26.72 min and 65.06 ± 11.50 min respectively ($P < 0.01$). The results of this study suggest that, these polyionic complexes are good systems for specific gastric drug delivery.

Keywords. hydrogels; chitosan; poly(acrylic) acid; amoxicillin; gastric emptying.

Introduction

Gastric *Helicobacter pylori* infection plays a crucial role in gastroduodenal diseases [1]. The antimicrobials used in the therapeutic regimes of these diseases are amoxicillin, clarithromycin and metronidazole and a proton pump inhibitor as omeprazole [2]. *In vivo*, *Helicobacter pylori* is closely associated with the adherent mucus layer, living both within and beneath it and adhering to the gastric

epithelial cells [3]. *In vitro*, *H. pylori* is susceptible to amoxicillin with MIC₉₀ of 0.12 mg/L [4], if amoxicillin could be delivered to local sites/areas very close to the mucus layer, pharmaceutical formulations, with lower antibiotic doses, might be employed.

Recently, several authors stated that swellable interpolymer hydrogels were useful for localized delivery of antibiotics in the acidic environment of the gastric fluid [5,6]. In previous studies we have observed that chitosan-poly(acrylic) acid polyionic complexes present suitable swelling and erosion characteristics [7, 8]. Thus, one of the most important advantages of this kind of hydrogels is that formulation remains during more time than conventional ones on the target site, and together with a controlled drug release would improve local therapy. In order to complete our studies we have carried out an *in vivo* study to elucidate the gastric residence time of a chitosan-poly(acrylic) acid polyionic complex.

The particle size is an important factor in the gastric emptying. [9]. The use of polyionic complexes with a particle size of 2mm would ensure a prolonged swelling /eroding process in gastric fluid.

The gastrointestinal transit behavior of pharmaceutical formulations as floating dosage forms [10], ion exchange resins [11] or matrix tablets [12], is usually determined by gamma scintigraphy. However, this technique requires a competent operation, and prolonged use of complex and expensive equipment. Moreover, the use of penetrating γ -ray emitters makes it less suitable for repeated applications in the same subject. Measurement of gastric emptying rate of solids by means of a carbon-labeled octanoic acid test may be used as an alternative method because it is easy to perform by the laboratory technician, not unpleasant for the patient, and correlates well with the results obtained by γ -scintigraphy when using a solid standard test meal of 250 kcal [13,14].

The aim of the present study is to develop polyionic complexes and to study their gastric emptying rates by means of the [¹³C]octanoic acid breath test. This multi-particular system must comply with the following objectives: I) to allow a drug-sustained release during the gastric residence time, and II) to present a significant delay of its gastric emptying as compared with conventional formulations.

Materials and methods

2.1. Materials

Poly(acrylic) acid (PAA) commercially available under the trade name of Carbopol® 974P NF was purchased from BFGoodrich, (Brussels, Belgium), [¹³C]octanoic acid was obtained from Isomed Lab. (Madrid, Spain), amoxicillin was purchased from Sigma Chemical Company (Madrid, Spain), and chitosan (CS) with an average molecular weight of 600.000 was obtained from Fluka (Madrid, Spain).

2.2. Preparation of polyionic complex formulations

Hydrogels were prepared with poly(acrylic) acid (PAA) and Chitosan (CS). A constant proportion of 2.0 of amoxicillin trihydrate (A) was added to all formulations. The ratios of freeze-dried CS-only hydrogels were: PAA:CS:A (0:2.5:2), PAA:CS:A (0:5:2), PAA:CS:A (0:15:2); and the polyionic complexes of PAA:CS:A were: PAA:CS:A (1:2.5:2), PAA:CS:A (1:5:2), PAA:CS:A (1:15:2). The procedure was as follows: 125.0 mg of PAA was dissolved in 15.0 ml of acetic acid 1.75M. Next, 250.0 mg of amoxicillin trihydrate or sodium was then added to the gel gradually while mixing, until a uniform dispersion of drug was formed. Chitosan was added gradually and mixed to get a uniform gel. The hydrogel was neutralized with sodium hydroxide 3M to reach a pH of 5.0 and the volume was adjusted to 30.0 ml for each formulation. The polyionic complexes were cast onto petri-dishes of 100.0 ml with 100.0 mm i.d. Finally, gels were freeze-dried using a Liolabar 7 (Telstat Inc Madrid, Spain). The different hydrogel formulations after the freeze-dried process presented similar volumes. Changes of porosity and network structure were obtained by varying the polymers ratio. The formulations were cut into cubes of 2 mm³, this particle size (2 mm) was selected in order to get an equal or slower gastric emptying rate in comparison to a solid meal [9,15].

The hydrogel developed for [¹³C]octanoic acid assays was prepared in the same manner the difference being that amoxicillin was not added to the formulation. The freeze-dried PAA:CS polyionic complex was loaded with 100 mg of [¹³C]octanoic acid. For *in vivo* studies the formulation was introduced into 2 zero number capsules.

Reference formulation. 100 mg of [¹³C]octanoic acid were adsorbed into microcrystalline cellulose granules, (composed by 97% of microcrystalline cellulose and 3% of polyvinyl pyrrolidone). These granules presented a diameter of 2 mm. Since this formulation is a non-swellaible system and it presents a fast [¹³C]octanoic acid release it could be employed as a reference system. This formulation was dosed into 2 zero number capsules.

2.3. Swelling studies

The pre-weighted samples were immersed in enzyme-free simulated gastric fluid (SGF) and maintained for 24 h at 37°C. At predetermined time intervals, the swollen samples were removed from the solution, quickly wiped with filter paper to remove droplets on the surface, and weighed. The water uptake (Q) of hydrogels was determined according to the following expression [16]:

$$Q = (WS - Wd / Wd) \times 100$$

Where Ws and Wd represent the weight of the swollen and dry hydrogel, respectively.

2.4. "In vitro" release studies

For drug release, testing apparatus 1 of the USP 24 (Van-Kel) with a rotation speed of 50 rpm, was used. Samples were immersed in 900 ml of SGF at 37°C. At predetermined time points, 5 ml of SGF was withdrawn, filtered and assayed for amoxicillin in a Beckman DU 7 spectrophotometer at 260 nm. The data represents mean ± S.D. from three independent experiments.

2.5. Gastric emptying rate study

A [¹³C]octanoic acid breath test has been recently developed to measure the gastric emptying rate of solids [13,14]. 8 healthy volunteers (5 women and 3 men); mean age, 32 years (range 26-42 years) were included in the present study. None, had a history of gastrointestinal disease or surgery, or was taking any medication. This single-blind 2-way crossover study was approved by the Ethical Committee of the "Princesa" Hospital. All subjects gave their informed consent. All tests were carried out after an overnight fast.

The polyionic complex PAA:CS (1:5) (average diameter of 2 mm) was loaded with 100 mg of [¹³C]octanoic acid. Microcrystalline cellulose granules (2 mm) with 100 mg [¹³C]octanoic acid adsorbed were employed as reference formulation. Each formulation was dosed into 2 zero number

capsules that were taken with 150 ml of water, together with a standard meal, which consisted of one egg, two slices of white bread, and 5 g of margarine. Total caloric value of the meal was 250 kcal [13]. All meals and drug were consumed in less than 10 minutes. Breath sample were taken before the meal as a blank and after the formulation administration at predetermined times. The [¹³C]-enrichment was measured using an isotope ratio mass spectrometer ABCA (Automated Breath ¹³Carbon Analyser, Europe Scientific). The curves with the measured ¹³CO₂ recovery in breath, are expressed as percentage excretion per hour of the given ¹³C dose, and they were fitted by two mathematical formulas as follows: (A) $y=at^b e^{-ct}$, where y is the percentage of ¹³C excretion in breath per hour; t is the time in hours; and a, b and c are regression estimated constants; and (B) $y=m(1-e^{-kt})^\beta$, where y is the percentage of ¹³C excretion in breath, t is time in hours; and m, k, and β are regression estimated constants with m as the cumulative ¹³C recovery when time is infinite. Half gastric emptying time ($t_{1/2}$) and lag phase (t_{LAGb}) in the breath test were calculated from this model as [13,17].

$$t_{1/2} = [-1/k] \times \ln [1-2^{1/\beta}]$$

and

$$t_{LAGb} = (1/k) \ln (\beta)$$

2.6. Statistics

Results are expressed as mean \pm S.D. The significance of differences was evaluated by analysis of variance (ANOVA) using the SAS/STAT package. A significance level of 0.01 was used for all tests.

3. Results and discussion.

3.1. Swelling studies

The swelling /eroding assay of the freeze-dried chitosan-only hydrogels was performed. Simultaneous swelling and eroding processes were observed during the study. In the first 15 minutes (see figure 1A) the main process was the swelling one, the degree of swelling strongly depended on chitosan content. As the chitosan proportion of the formulation augmented the water uptake increased considerably. At 15 minutes, the swelling degree of the formulations PAA:CS:A 0:2.5:2 and 0:5:2 were 7.50 and 17.51 % respectively. Therefore the formulation with the highest CS proportion, PAA:CS:A 0:15:2, presented a remarkable increase in their swelling degree values (50.75 %). However, after 15 minutes, the eroding of the polymeric network was the main process. In formulations PAA:CS:A 0:2.5:2 and 0:5:2 the swelling degree became zero at 60 minutes as a result of

the erosion process. However, the formulation PAA:CS:A 0:15:2 achieved this zero value at 3 hours. This eroding process has been observed by different authors in chitosan-based hydrogels [18, 19].

Since our chitosan-poly(acrylic) acid polyionic complexes has been formed through an electrostatic interaction between ionic groups from both polymers it is necessary to evaluate the influence of different proportions of the two polymers in the swelling process. Figure 1B shows the swelling and eroding kinetics of the freeze-dried polyionic complexes (PAA and CS) in SGF. The polyionic complexes PAA:CS:A (1:2.5:2) and (1:5:2) showed similar swelling ratios at 15 minutes with values of 9.24 and 8.74 % respectively. On the other hand, the polyionic complex PAA:CS:A (1:15:2) presented higher swelling values (12.25 %), which is lower than in the chitosan –only hydrogel with the same chitosan proportion, although all the polyionic complexes showed a remarkable increase in comparison to their initial 2 mm diameter. The gastric emptying of these polyionic complexes would be delayed by presenting a particle size greater than other formulations studied by various authors [9,15]. These complexes presented an initial equilibrium stage of swelling (from 15 to 30 min) that did not appear in the formulations without PAA. This equilibrium between swelling and eroding processes could affect the initial burst release of amoxicillin [18]. The kinetic of the erosion process ended at 1 hour in the formulation PAA:CS:A (1:2.5:2) and at 2 h for PAA:CS:A (1:5:2) and (1:15:2) respectively. After this erosion stage the swelling grade was sustained in all formulations, achieving values of 4.35% in the formulation PAA:CS:A (1:2.5:2) and 7.50 % in the both complexes with greater amount of chitosan PAA:CS:A (1:5:2) and (1:15:2). The ionic interaction between both polymers caused changes in the porosity of the network, thus the water uptake varied [6,20].

3.2. Drug release

Chitosan hydrogels without PAA (see figure 2), showed an initial burst effect. About 88 % and a 59% of amoxicillin was released from PAA:CS:A 0:2.5:2 and 0:15:2 formulations respectively, at 15 min. These initial high values of drug release were attributed to the high swelling degree of these hydrogels caused by the electrostatic repulsion within the network. Similar electrostatic repulsions have been previously described by de la Torre et al. (2003) [7] and Bell et al. (1996) [20].

The formulations of PAA:CS:A in spite of containing different ratios of both polymers showed similar release profiles (see figure 3). These results can be attributed to a similar electrostatic interaction in all the polyionic complexes. This initial drug release could be attributed to a lower

swelling degree of these complexes. Due to the limitations of the gastric emptying time, it is desirable to have both a rapid swelling and a controlled drug release during the stay of the formulation in the stomach. Only a 25% and 35% of amoxicillin was released from PAA:CS:A 1:5:2 and 1:15:2 complexes in the first 15 minutes. Therefore, the drug release results suggest that these PAA-CS polyionic complexes present the advantages of controlling the initial burst release, and of achieving a sustained drug release up to 2 h. This amoxicillin controlled release can be related to the degree of ionization of both polymers within the network [21]. The post-prandial stomach is assumed to hold 1 L and the MIC₉₀ of amoxicillin for *H. pylori* is 0.12 mg/L [4]. Therefore, according to the in vitro data, a 100mg dose of amoxicillin included in the polyionic complexes will yield a concentration higher than 95 mg/L for 160 min, more than 790 times the upper limit quoted for the MIC₉₀ of this antibiotic.

3.3. Gastric transit

The gastric emptying rate of a polyionic hydrogel PAA:CS:A 1:5:2 was compared with a reference formulation. These studies were performed by using a carbon-labeled octanoic acid indirect method.

Figure 4 compares the ¹³CO₂ breath excretion pattern of the swellable formulation PAA:CS:A 1:5:2 versus a reference formulation which presented an immediate release.

The reference formulation showed a mean gastric emptying ($t_{1/2b}$) of 65.06±11.50 min, a t_{LAGb} of 27.03±17.57 min and a maximum value of 13.83±1.48 % D/h. Similar results have been previously reported in a study about gastric emptying rate of solids, measured by the same method [14]. Likewise, Whitehead et al., (1998) [10] obtained a similar gastric residence time, with a mean onset emptying time of 1 h, for a conventional formulation of beads measured by the traditional gamma-scintigraphy method.

However, the use of freeze-dried polyionic complex clearly affected the shape of the ¹³CO₂ excretion profile. In the polyionic system, both the maximum peak and the slope of the ascending and descending limb of the ¹³CO₂ excretion curve were decreased. This polyionic complex had a significantly delayed gastric emptying time ($P<0.01$), with a $t_{1/2b}$ value of 164.32±26.72 min and the lag phase was increased (140.52±30.19 min). Similar delayed gastric emptying rates have been previously observed by the carbon labeled octanoic acid breath test after peroral administration of 30 mg propantheline [14].

4. Conclusions

This polyionic complex PAA:CS:A (1:5:2) allows an amoxicillin sustained release during the gastric residence time. The *in vivo* results demonstrated that the gastric emptying could be controlled by the swelling process of the polyelectrolyte complex. The results of the present study suggest that the polyionic complex formulation proposed presents a sustained drug release and clearly prolongs its gastric residence time when compared with the reference formulation. Therefore it provides an opportunity to improve the local gastric drug action.

A possible strategy to improve *H. pylori* eradication would be to combine this amoxicillin local treatment system with the conventional systemic route.

Acknowledgments

This study was supported by the FIS project n° PI020418 and the Complutense project n° PR78/02-11056.

References

- [1]. Ateshkadi A., Lam N. P., Johnson C. A., *Helicobacter pylori* and peptic ulcer disease, Clin. Pharm. 1993; 12: 34-48.
- [2]. Hentschel E., Brandstatter G., Dragosics B., Hirschi A. M., Nemeč H., Shutze K., M. Taufer, Wurzer H., Effect of ranitidine and amoxicillin plus metronidazole on the eradication of *Helicobacter pylori* and the recurrence of duodenal ulcer, New Engl. J. Med. 1993; 5: 308-312.
- [3]. Goddard A. F. and Spiller R. C. The effect of omeprazole on gastric juice viscosity, pH and bacterial counts. Aliment. Pharm. Therap. 1996; 10: 105-109.
- [4]. Atherton J. C., Cullen D. J. E., Kirk G.E., Hawkey C. J., Spiller R. C., Enhanced eradication of *Helicobacter pylori* by pre- versus post-prandial amoxycillin suspension with omeprazole: implications for antibiotic delivery. Aliment. Pharmacol. Ther. 1996; 10: 631-635.

- [5] Patel V. R., and Amiji M. M. Preparation and characterization of freeze-dried chitosan-poly (ethylene oxide) hydrogels for site-specific antibiotic delivery in the stomach. *Pharm. Res.* 1996; 13: 588-593.
- [6] Risbud M. V., Hardikar A. A., Bhat S. V. and Bhonde R. R. pH-sensitive freeze-dried chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogels as controlled release systems for antibiotic delivery. *J. Control. Release.* 2000; 68: 23-30.
- [7] De la Torre P.M., Torrado Susana, Torrado Santiago. Interpolymer complexes of poly(acrylic) acid and chitosan: influence of the ionic hydrogel-forming medium. *Biomaterials* 2003; 24: 1459-1468.
- [8] De la Torre P.M., Enobakhare Y., Torrado G., Torrado S. Release of amoxicillin from polyionic complexes of chitosan and poly(acrylic) acid. Study of polymer/ polymer and polymer/ drug interactions within the network structure. *Biomaterials* 2003; 24: 1499-1506.
- [9]. Bruno M. J., Borm J. J., Hoek F. J., Delzenne B., Hofmann A. F., De Goeij J. J., Van Royen E. A., Van Leeuwen D. J., Tytgat G. N. J., Gastric Transit and Pharmacodynamics of a two-millimeter enteric-coated pancreatin microspheres preparation in patients with chronic pancreatitis, *Dig. Dis. Sci.* 1998; 43: 203-213.
- [10]. Whitehead L., Fell J. T., Collett J. H., Sharma H. L., Smith A. M. Floating dosage forms: an in vivo study demonstrating prolonged gastric retention, *J. Control. Release* 1998; 55: 3-12.
- [11] Jackson S. J., Bush D., Washington N., Perkins A. C. Effect of resin surface charge on gastric mucoadhesion and residence of cholestyramine, *Int. J. Pharm.* 2000; 205: 173-181.
- [12] Billa N., Yuen K. H., Khader M. A., Omar A. Gamma-sintigraphic study of the gastrointestinal transit and *in vivo* dissolution of a controlled release diclofenac sodium formulation in xanthan gum matrices, *Int. J. Pharm.* 2000; 201: 109-120.

- [13] Ghos Y.F., Maes B.D., Geypens B.J., Mys G., Hiele M.I., Rutgeerts P.J., Vantrappen G. Measurement of gastric emptying rate of solid by means of a carbon-labeled octanoic acid breath test. *Gastroenterology* 1993; 104: 1640-1647.
- [14] Maes B. D., Jiele M. I., Geypens B. J., Rutgeerts P. J., Ghos Y. F., Vantrappen G., Pharmacological modulation of gastric emptying rate of solid as measured by the carbon labeled octanoic acid breath test: Influence of erythromycin and propantheline *Gut* 1994; 35: 333-337.
- [15] Meyer J. H., Elashoff J., Porter Fink V., Dressman J., Amidon G. L., Human postprandial gastric emptying of 1-3-millimeter spheres *Gastroenterology* 1998; 94: 1315-1325.
- [16] Peniche C., Elvira C., San Roman J. Interpolymer complexes of chitosan and polymethacrylic derivatives of salicylic acid: preparation, characterization and modification by thermal treatment. *Polymer*. 1998; 39: 6549-6554.
- [17] Perri F., Clemente R., Festa V., Annese V., Quitadamo M., Rutgeerts P., Andriulli A. Patterns of symptoms in functional dyspepsia: Role of *Helicobacter pylori* infection and delayed gastric emptying, *Am. J. Gastroenterol.* 1998; 93: 2082-2088.
- [18] Risbud M.V., Bhonde R.R., Polyacrylamide-chitosan hydrogels in vitro biocompatibility and sustained antibiotic release studies, *Drug Deliv. Targeting Ther. Agents* 2000; 7:69-75.
- [19] Noble L., Gray A. I., Sadiq L. and Uchegbu I. F. A non-covalently cross-linked chitosan based hydrogel. *Int. J. of Pharmaceutics.* 1999; 192: 173-182.
- [20] Bell C. L. and Peppas N. A. Modulation of drug permeation through interpolymer complexed hydrogels for drug delivery applications. *J. Control. Release.* 1996; 39: 201-207.
- [21] Bettini R., Colombo P., Peppas N. A. Solubility effects on drug transport through pH-sensitive, swelling-controlled release systems: transport of theophylline and metoclopramide monohydrochloride. *J. Control. Release* 1995; 37: 105-111.

FIGURES AND LEGENDS

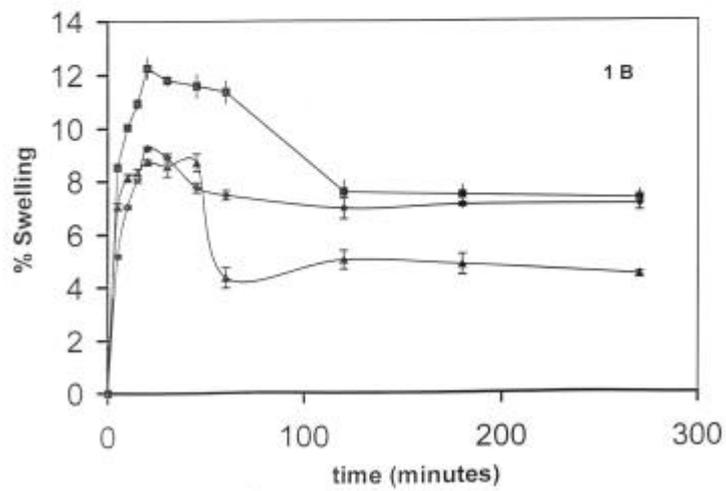
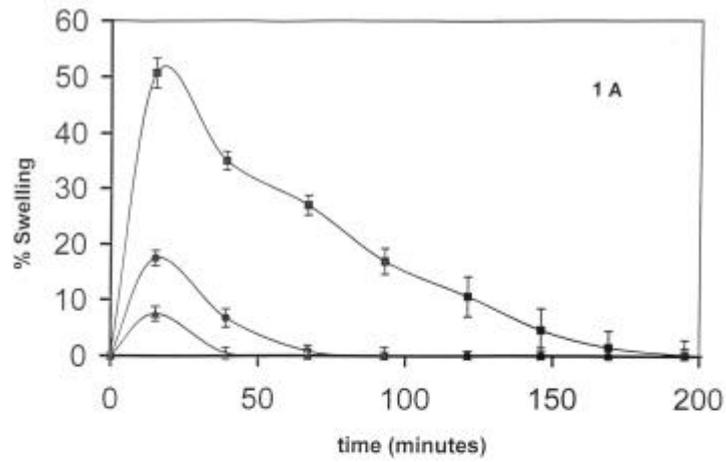


Figure 1. Swelling and eroding kinetics of freeze-dried PAA:CS:A hydrogels in SGF (pH 1.2) at 37°C. Figure 1A, PAA:CS:A 0:2.5:2 (---), PAA:CS:A 0:5:2 (—●—) and PAA:CS:A 0:15:2 (—○—). Figure 1B, PAA:CS:A 1:2.5:2 (---), PAA:CS:A 1:5:2 (—●—) and PAA:CS:A 1:15:2 (—○—).

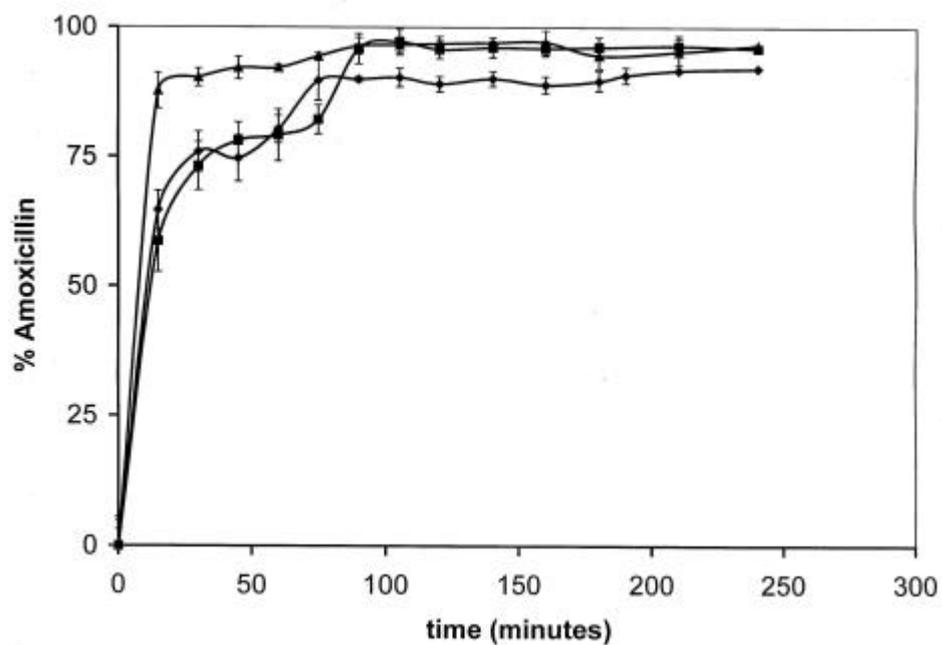


Figure 2. Amoxicillin release profiles at 37°C in SGF (pH 1.2) of hydrogels. PAA:CS:A 0:2.5:2 (---), PAA:CS:A 0:5:2 (—) and PAA:CS:A 0:15:2 (· · ·).

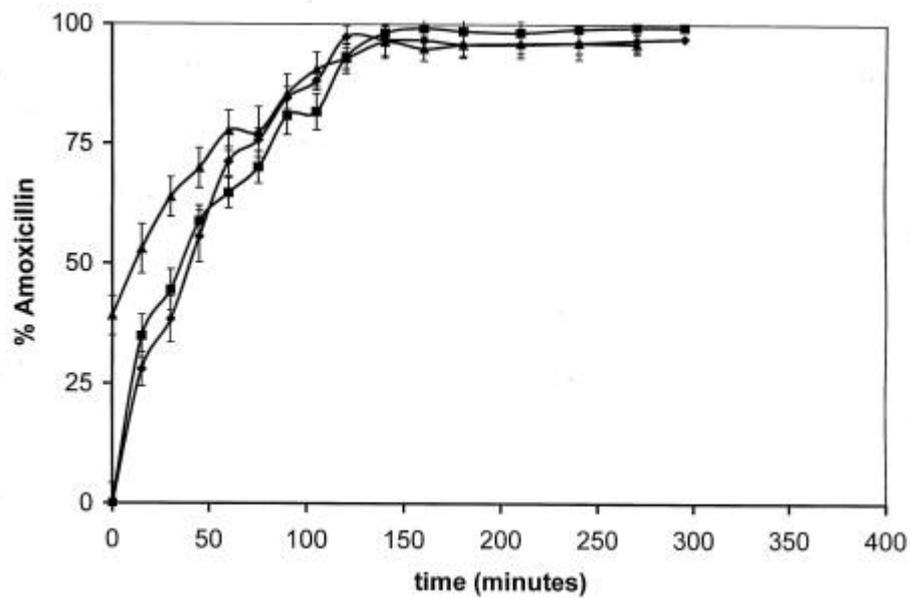


Figure 3, Amoxicillin release profiles at 37°C in SGF (pH 1.2) of polyionic complexes. PAA:CS:A 1:2.5:2 (---), PAA:CS:A 1:5:2 (—) and PAA:CS:A 1:15:2 (· · ·).

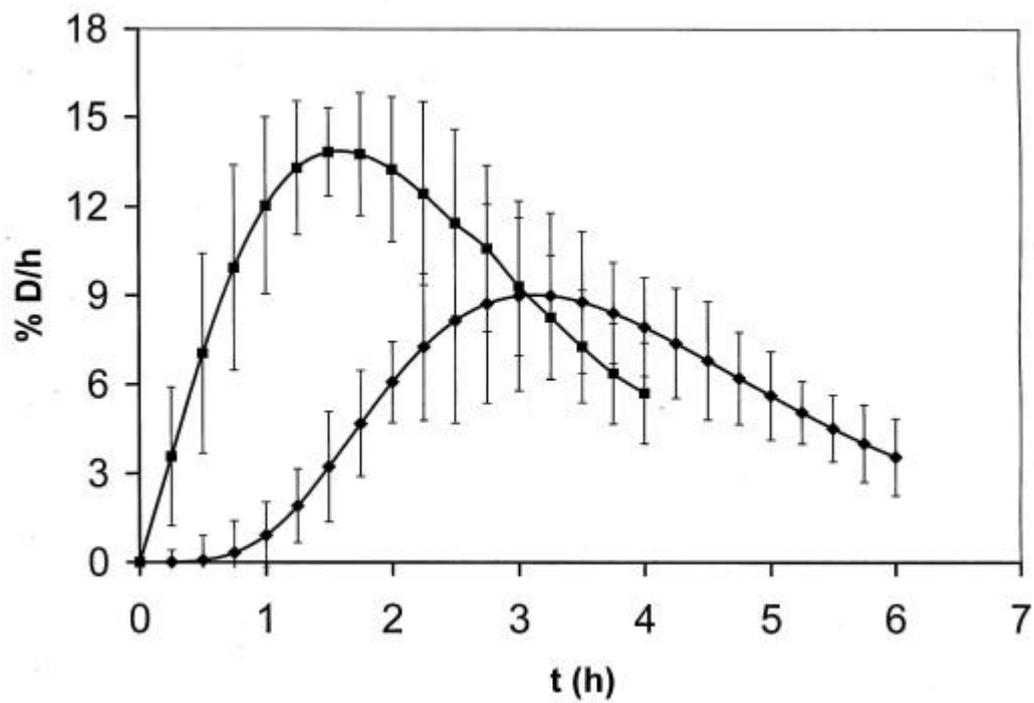


Figure 4. In vivo $^{13}\text{CO}_2$ breath excretion pattern of PAA:CS:A 1:5:2 polyionic complex (---) and a reference formulation (—).

Publicación enviada a **Alimentary Pharmacology and Therapeutics** el 3 de abril de 2003.

The effect of omeprazole and alginate on the gastric transit of a pH-sensitive chitosan-poly(acrylic) acid polyionic complex in healthy subjects.

Department of Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, Complutense University, Madrid, Spain.

*Corresponding author:

Dr. Santiago Torrado

Department of Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, Complutense University, Avda. Complutense S/N. Madrid, 28040, Spain.

e-mail: torrado2@farm.ucm.es

SUMMARY

Background: It has been suggested that amoxicillin concentration should be enhanced at the gastric tissue to improve the anti-*Helicobacter pylori* effect of this drug. This could be achieved by allowing the drug to remain longer in the stomach and by enhancing its local concentration in the stomach through the addition of a proton pump inhibitor. Freeze-dried hydrogels could serve as suitable candidates for amoxicillin site-specific delivery in the stomach.

Aim: To investigate the effect of intragastric pH conditions on the release of amoxicillin from the hydrogel and on the gastric emptying of this poly (acrylic acid) and chitosan hydrogel.

Methods: The amoxicillin release profiles from gastric retentive hydrogels were investigated at pH 1.2 and 4.0. The hydrogel gastric emptying rate study was performed in twelve healthy volunteers by the [¹³C]octanoic acid breath test on three different occasions in a randomized crossover study design: (i) without medication, (ii) on the seventh day of a treatment with

omeprazole and (iii) on the seventh day of a treatment with aluminium-magnesium-containing antacids.

Results: An amoxicillin sustained release from the hydrogel during more than 2h were obtained at different pH conditions (1.2 and 4.0). Amoxicillin was considered to be stable in the hydrogel at 140 min as assessed by degradation studies in enzyme-free simulated gastric fluid. The hydrogel exhibited a delayed gastric emptying. *In vivo* gastric disposition of our formulation after a pre-treatment with omeprazole or a non-systemic antacid was investigated in terms of gastric emptying.

Conclusions: An *in vitro* amoxicillin sustained released and a slow gastric emptying *in vivo* were obtained from our hydrogel in different gastric conditions.

INTRODUCTION

Triple therapy including two antibiotics and a proton pump inhibitor is a rational approach to the treatment of *Helicobacter pylori*. The mechanisms of action of drug employed for the eradication of *H. pylori* may act: (a) topically following oral absorption, (b) indirectly following intestinal absorption, after which they could be transferred from blood to the stomach across the gastric mucosa, or (c) both.¹

It has been reported that enhancing the concentration of antibiotics at the target site, gastric tissue, following oral administration is useful in curing *H. pylori* infection.²⁻⁶ Thus, azithromycin achieves remarkably high concentrations in gastric tissues after oral administration.⁷ Other drugs with lower fluxes across gastric mucosa, as amoxicillin⁶ or roxithromycin⁸ may enhance *in vivo* activity by promoting the gastric mucus permeability of the compounds or by allowing the compounds to remain longer in the gastric cavity.⁹

In a previous study we have observed that chitosan-poly(acrylic) acid hydrogels present suitable swelling and erosion characteristics in simulated gastric fluid, they could be useful for localised antibiotics delivery in the acidic environment of the gastric fluid.^{10,11}

H. pylori is capable of altering acid secretion, therefore the gastric pH is about 4 in *H. pylori* positive patients¹. Nevertheless, an increase of the gastric pH (about 6) is obtained after following triple therapies which include several proton pump inhibitors and other antacids¹²⁻¹⁴. Gastric pH can affect various processes such as luminal drug degradation, drug concentration gradient across the gastric mucosa and the gastric residence time of certain drug formulations, such as our hydrogels. Therefore, the effect of intragastric pH on the half-emptying time of our hydrogels is important to evaluate.

Only a few *in vivo* studies has been carried out in order to elucidate gastric residence time of several pharmaceutical formulations.^{15,16} Measurement of gastric emptying rate of our hydrogels may be determined by means of a carbon-labelled octanoic acid breath test.^{17,18}

The aim of this paper was to study the delay of gastric emptying of a chitosan-poly(acrylic) acid hydrogel in healthy volunteers without pre-treatment and after following a pre-treatment with omeprazole or a non-systemic antacid.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Chitosan (low molecular weight) (CS) was purchased from Fluka Biochemika (Mol Wt 150000). Carbopol® 974P NF (PAA) was obtained from BF Goodrich (Ohio, USA). [¹³C]octanoic acid was obtained from Isomed Lab. (Madrid, Spain), amoxicillin trihydrate (A) BP/USP was obtained from Antibiotics (Madrid, Spain). Omeprazole was purchased from Normon (Madrid, Spain), aluminium-magnesium antacid (almagate) from Almirall Prodesfarma (Almax® Forte, Barcelona, Spain). Glacial acetic acid PRS and hydrochloric acid PA 37% were both purchased from Panreac Química S.A. (Barcelona, Spain). All chemicals reagents were of pharmaceutical grade or better.

Preparation of formulations

Four different formulations were used in this study: a polyionic complex containing amoxicillin (PAA:CS:A) for *in vitro* assays, a polyionic complex labelled with [¹³C]octanoic acid (PAA:CS) for *in vitro* release studies and for *in vivo* studies, a solution of amoxicillin in 0.1 M HCl and amoxicillin powder dosed into zero capsules, the two last formulations were used for *in vitro* antibiotic stability studies.

The hydrogel or polyionic complex was prepared with Chitosan (CS) and Carbopol[®] 974P NF (PAA). A constant proportion of 2.0 of amoxicillin trihydrate (A) was added to the formulation. The ratio of this freeze-dried PAA:CS:A polyionic complex was 2.5:5:2.

The procedure of the hydrogel preparation is described in previous papers.^{10,11} Finally, the hydrogel was freeze-dried using a Liolabar 7 (Telstat Inc Madrid, Spain). The formulation was cut into 2 mm³ cubes, this particle size (2 mm) was selected in order to get an equal or slower gastric emptying rate in comparison to a solid meal.^{19,20}

The hydrogel developed for [¹³C]octanoic acid assays was prepared in the same manner the difference being that amoxicillin was not added to the formulation. The freeze-dried PAA:CS polyionic complex was loaded with 91 mg of [¹³C]octanoic acid. For *in vivo* studies the formulation was introduced into 2 zero number capsules.

In vitro release studies

The release studies of all formulations were performed using testing apparatus 1 of the USP 24 (Vankel[®] dissolution apparatus), 100 r.p.m. The dissolution media were 450 ml of SGF (0.1M HCl) and 450 ml of a pH 4.0 solution, both of them at temperature 37°C. At predetermined time points, 5 ml of medium was removed and filtered using a 0.45 µm filter and assayed for amoxicillin at 228.5 nm using a UV-VIS Beckman DU[®]-7 Spectrophotometer. The cumulative amount of amoxicillin trihydrate released from the hydrogel was determined from the appropriate calibration curves. The data represents mean ± S.D. from three independent experiments.

In the case of formulations labelled with [¹³C]octanoic acid samples were assayed for octanoic acid at 209 nm, using high performance liquid chromatography (HPLC). The cumulative amounts of octanoic acid released from the formulations were determined from the appropriate calibration curves. The data represents mean ± S.D. from three independent experiments.

The chromatographic system from Jasco (Tokyo, Japan) consisted of a Jasco PU-1580 pump, a Gilson 231 XL sampling injector (Middleton, WI, U.S.A.) and a Jasco UV-1575 UV absorbance detector. Chromatography was carried out using a Hypersyl ODS 5 µm (Symta, Madrid, Spain) 150 x 4.6 mm reverse-phase column. The octanoic acid release studies were carried out employing the following mobile phase: acetonitrile-10⁻³M monobasic potassium phosphate solution adjusted with a 5% (v/v) solution of ortho-phosphoric acid to pH 4.4±0.5 (50:50 v/v). The flow rate was 1.0 ml/min and the temperature was ambient. The eluate was monitored by UV absorbance at 209 nm.

Gastric emptying rate study

The duration of the lag phase and the gastric half-emptying time were assessed by the [¹³C]octanoic acid breath test^{17,18,21}. Twelve healthy volunteers (8 female and 4 male); mean age, 32 years (range 26-42 years) provided written informed consent to participate in the three-way, randomised crossover, single dose study. None of them had a history of gastrointestinal disease or surgery, or was taking any medication.

To evaluate the gastric residence time of our swellable hydrogel we have used a non-swellable reference system composed by microcrystalline cellulose beads with [¹³C]octanoic acid. These beads presented a diameter of 2 mm, and the reference formulation was dosed into 2 zero number capsules.

Each subject was studied under three different randomly applied test conditions: (i) without medication (under basal conditions); (ii) after peroral administration of 20 mg o.d. (once daily) of omeprazol during the 6 days preceding the test and 20 mg 30 min before the test on the day of the examination; (iii) after peroral administration of 1.5 g b.d. (twice daily) of aluminium-magnesium antacid (almagate) during the 6 days preceding the test and 1.5 g

30 min before the test on the day of the examination. Subjects underwent a 10-day washout period between each test in order to exclude any interaction. This study was approved by local Institutional Review Boards. All tests were carried out after an overnight fast.

The PAA:CS polyionic complex (1:2.5) (2 mm³) was loaded with 91 mg of [¹³C]octanoic acid. 100 mg of formulation were dosed into 2 zero number capsules that were taken with 150 ml of water, together with a standard meal, which consisted of one egg, two slices of white bread, and 5 g of margarine. Total caloric value of the meal was 250 kcal.¹⁷ All meals and drug were consumed in less than 10 minutes. Breath samples were taken before the meal as a blank and after the formulation administration at predetermined times up to six hours. The [¹³C]-enrichment was measured using an isotope ratio mass spectrometer ABCA (Automated Breath ¹³Carbon Analyser, Europe Scientific, Lowe, England). The curves with the measured ¹³CO₂ recovery in breath, are expressed as percentage excretion per hour of the given ¹³C dose. The CO₂ production was assumed to be 300 mmol/m² body surface area per hour. Body surface area was calculated by the weight-height formula of Haycock et al ²¹.

The time at which half of the formulation had emptied from the stomach ($t_{1/2}$) and the time of maximal ¹³CO₂ excretion of the fitted curve (t_{lag}) were calculated by fitting the excretion data using the equations and fitting procedures published previously by others.^{17,18,21}

Stability in simulated gastric fluid

Amoxicillin solution was prepared in 450 ml of 0.1M HCl (SGF) preheated to 37°C. Amoxicillin powder was dosed into a zero capsule. The capsule and the PAA:CS:A polyionic complex were immersed in 450 ml of 0.1 M HCl at 37°C. Masses of formulations used were calculated such that sample to be assayed contained 45 mg of amoxicillin, and the concentration of the solution was 100 µg/mL. The stability studies of formulations were performed using testing apparatus 1 of the USP 24 (Vankel[®] dissolution apparatus), 100 r.p.m. At predetermined time points, 5 ml of medium was removed and filtered using a 0.45 µm filter and assayed for amoxicillin at 230 nm, using HPLC. The cumulative amounts of

amoxicillin released from these different formulations were determined from the appropriate calibration curves. The data represents mean \pm S.D. from three independent experiments.

Chromatography was carried out using a Hypersyl ODS 5 μ m (Symta, Madrid, Spain) 150 x 4.6 mm reverse-phase column. The stability studies of amoxicillin were performed employing the following mobile phase (USP 24, 2000): 0.049 M monobasic potassium phosphate solution adjusted with a 45% (w/w) solution of potassium hydroxide to pH 5.0 \pm 0.1 - acetonitrile (96:4 v/v). The flow rate was 0.4 ml/min and the temperature was ambient.

Statistics

Gastric emptying parameters of the three series of studies were analysed by descriptive statistical methods using the SAS/STAT package. Because of a skew distribution, median and interquartile ranges are given. The half-emptying times and the lag phases of the three groups were compared using the non-parametric Mann-Whitney (Wilcoxon test).

RESULTS

In vitro amoxicillin release studies

Figure 1.a shows amoxicillin release from the polyionic complex in enzyme-free simulated gastric fluid (SGF, pH 1.2) and in a solution of pH 4.0. At pH 1.2 the polyionic complex exhibited a initial burst effect (37.61%) and a sustained release, 59.83 \pm 0.15% and 74.30 \pm 1.71% of amoxicillin was released in 1h and 2h respectively. Faster amoxicillin profiles were obtained in medium of higher pH (4.0), a similar pH value was founded in *H. pylori* positive patients (Ortiz et al., 2002). The hydrogel showed a sustained release in both media, at least for 2 h.

Stability amoxicillin studies in simulated gastric fluid

We have carried out antibiotic stability *in vitro* studies by HPLC at pH 1.2 (SGF) for 5 hours (see figure 1b). This method was found to be selective in the determination of the

retention time of amoxicillin (8.24 min) and retention times of different degradation products (5.887 min and 5.977 min). In this study we have observed that degradation products followed different decomposition kinetics, and their further characterisation was difficult to perform. In addition, the compounds of our hydrogel did not interfere with amoxicillin in the HPLC stability studies. Amoxicillin decomposition profile from capsule was similar to that in solution, in both formulations the antibiotic followed a two-phase degradation profile. Our polyionic formulation showed a first stage where the sustained release was predominant over the degradation profile, and after the first 3 hours the degradation was the major process. Our hydrogel maintains the concentration of amoxicillin in SGF (pH 1.2) at least for 3 h, which could be of outmost importance for gastroretentive formulations.

In vitro octanoic acid release studies

[¹³C]octanoic acid was used as a marker to measure gastric emptying of our hydrogels. For *in vitro* studies at pH 1.2, testing apparatus 1 of the USP 24 (Van Kel) with a rotation speed of 100 rpm, was used. In these conditions, the [¹³C]octanoic acid was retained within the hydrogel showing a low burst effect (8.45% at 5 min), and its release from the hydrogel was remarkably retarded in SGF with a 27.62% of [¹³C]octanoic acid released at 3 hours. These results let us consider that [¹³C]octanoic acid is a good marker for evaluating the gastric emptying of our hydrogels. After the biodegradation of the polymer network, the [¹³C]octanoic acid will be absorbed extensively in the duodenum.

Breath test studies

The mean cumulative [¹³CO₂] excretion curves of a conventional formulation and of our hydrogel obtained in the three tests situations are represented in figure 2. The course of the [¹³CO₂] excretion rate is clearly slower in our hydrogel compared to the conventional formulation of beads. For both hydrogel groups after pre-treatment with omeprazole and almagate the peak of the curves is flattened and the ascending and descending slopes are steeper. The gastric emptying is faster after omeprazole pre-treatment as compared to the hydrogel without treatment, on the other hand the excretion profile after pre-treatment with

almagate is delayed and flattened compared to the hydrogel group without pre-treatment. In figure 3 the gastric emptying parameters of our hydrogel calculated from the individual [$^{13}\text{CO}_2$] excretion curves are summarised for the three groups of subjects. For the group without pre-treatment the hydrogel showed a mean gastric emptying ($t_{\frac{1}{2}b}$) of 137.72 min (130.79-144.07 median \pm interquartile range) and the lag phase ($t_{lag\ b}$) was 132.01 min (118.08-137.67). In subjects after pre-treatment with omeprazole the gastric emptying of solids was faster: the half-emptying time was 112.34 min (109.98-122.94; $P=0.0042$) and the lag phase was 104.97 min (96.76-110.81; $P=0.0024$). However, after pre-treatment with almagate, gastric emptying of our hydrogel was unexpectedly increased compared with the control group, with a half-emptying time of 170.11 min (142.21-173.93; $P=0.0062$) and the lag phase was 158.31 min (130.81-164.38; $P=0.0034$). After almagate treatment one subject had values that were technically unsatisfactory. Following pre-treatment with omeprazole the gastric emptying of our polyionic complex was significantly faster than in the group that followed pre-treatment with almagate ($t_{\frac{1}{2}b}$: $P=0,00005$ and $t_{lag\ b}$: $P=0,00009$).

DISCUSSION

In a previous studies we have observed that chitosan-poly(acrylic) acid polyionic hydrogels show a high swelling degree followed by an extensive erosion in SGF which would be useful to obtain a longer gastric residence time of the formulation.^{10,11}

This hydrogel exhibits an amoxicillin suitable controlled release profile for 3.0-4.0 h at pH 1.2 and for 2.0-2.5 h at pH 4.0, these results will ensure maximum availability of the drug in the stomach. Possibly, once the drug diffusion will be finished, a large amount of amoxicillin will remain dissolved within the gastric fluid, the drug concentration will decrease as the liquid gastric emptying take place. Similar *in vitro* results in both simulated gastric and intestinal fluids were obtained by Patel et al²² from CS-based hydrogels for the treatment of *H. pylori* infection.

Previous works have shown that only in acidic environment (HCl 0.1N) there is an important amoxicillin degradation²³. At this acidic medium, in the stability studies the

degradation kinetics of amoxicillin from both the capsule and the solution were found to be pseudo first order and similar results have been reported previously by other authors²³. For our polyionic complex, at 140 min. amoxicillin degradation profile was significantly lower than in both the capsule and solution. This could be attributed to that amoxicillin was entrapped within the polymeric network and it was protected from the external environment.

The *in vitro* [¹³C]octanoic acid release study showed a low cession of this compound from our hydrogel. This marker is easily entrapped within the polymeric network due to its high lipophilicity. The release percentage of [¹³C]octanoic acid from the solid phase of a test meal was found to be lower (5.5 % at 3 h¹⁷). When compared to these previous results this discrepancy may be explained by differences in the study design, e.g. the stirring conditions of the testing apparatus 1 of the USP 24 (Van Kel) with a rotation speed of 100 rpm, versus the dialysis membrane method, mixed at regular intervals used by Ghooos et al.,¹⁷ and the analytical methodology used.

In order to evaluate the role of omeprazole and almagate on this new local treatment we studied healthy volunteers by means of a [¹³C] octanoic acid breath test in three different applied test situations: (i) hydrogel under basal conditions (without pre-treatment); (ii) after pre-treatment with omeprazole for 7 days, omeprazole increases its bio-availability over the first week of treatment, this is due to a progressive reduction in their hepatic clearance with repeat dosing 24 and (iii) following pre-treatment with almagate for 7 days. Recent studies²⁵ have demonstrated that oral administration of a single dose of magnesium chloride slows gastric emptying but does not influence lipid digestion. Therefore, the administration of some antacid medication, such as almagate, might produce a delay in gastric emptying time.

In this study, we found that the half-emptying time and the lag phase of our hydrogel without pre-treatment were remarkably delayed compared with results obtained from a conventional formulation. This delay could be attributed to the remarkable increase of the hydrogel particle size in gastric fluid, which has been considered by others as an important cause of a delayed gastric emptying^{26,19}

After following a pre-treatment with omeprazole over 1 week the subjects showed a faster gastric emptying compared with the results obtained from the group without pre-

treatment. However, Evenepoel et al.²⁷ have reported that after peroral administration of 40 mg of omeprazole during 2 days the gastric emptying was delayed in healthy subjects. In spite of the small number of subjects included in our study, these data let us consider that the lower values of $t_{1/2b}$ and t_{lagb} are due to an interaction with cytochrome P-450 system. This multi-enzymatic system transform lipophilic drugs, e.g. octanoico acid, to polar compounds.

Omeprazole has demonstrated a great potential for interacting with enzymes in the P-450 system and inducing the synthesis of CYP1A1 and CYP1A2 enzymes, which are involved in the metabolism of several drugs²⁸.

Following pre-treatment with non-systemic antacids, as almagate, our hydrogel emptied more slowly than in normal intragastric pH conditions. Previous studies have confirmed that magnesium-containing compounds can exert an effect on gastric motor functions, causing a delay in gastric emptying^{25,29}. Therefore the availability of certain drugs in the stomach may be influenced by the administration of some antacids medications improving the treatment against *H. pylori*.

Further studies will be conducted in *H. pylori* positive patients in order to demonstrate the suitability of these hydrogels as candidates for amoxicillin sustained delivery in the gastric cavity. A possible strategy to improve the pursuit of *H. pylori* elimination would be a combination of this amoxicillin local treatment system with the conventional systemic route.

In conclusion, the *in vitro* studies of our hidrogel showed an amoxicillin sustained release, together with good stability results in SGF. The *in vivo* studies have found that our hydrogel presents a delayed gastric emptying under different conditions (without pre-treatment, with omeprazol pre-treatment or aluminium-magnesium non-systemic antacid pre-treatment). The properties of this hidrogel are adequate to maintain for longer time a local amoxicillin delivery in the stomach, alone or in association with omeprazole in conventional treatments in the eradication therapy of *H. pylori*.

Acknowledgements

This study was sponsored by the FIS project nº PI020418 and the Complutense project nº PR78/02-11056.

REFERENCES

1. Ortiz A.M., Calafatti S.A., Corazzi A., Souza J.M., Deguer M., De Souza C.A.F., Marchioretto M.A.M. et al. Amoxicillin and ampicillin are not transferred to gastric juice irrespective of *Helicobacter pylori* status or acid blockade by omeprazole. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 1163-1170.
2. Endo H., Yoshida H., Ohmi N. Higuchi S. Effects of lansoprazole, clarithromycin and pH gradient on uptake of [¹⁴C] amoxicillin into gastric tissue. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2001; 47, 405-410.
3. Endo H., Yoshida H., Ohmi N., Ohta K. And Higuchi S. Localization of [¹⁴C] amoxicillin in rat gastric tissue when administered with lansoprazole and clarithromycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2001; 48, 923-926.
4. Endo H., Yoshida H., Ohmi N., Ohta K., Higuchi S., Suga T. Localisation of [¹⁴C] clarithromycin in rat gastric tissue when administered with lansoprazole and amoxicillin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2002; 50, 285-288.
5. Endo H., Yoshida H., Ohmi N. Higuchi S. Effects of lansoprazole and amoxicillin on uptake of [¹⁴C] clarithromycin into gastric tissue in rats. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001; 45, 3451-3455.

6. Goddard A.F., Erah P.O., Barret D.A., Shawn P.N., Spiller R.C. The effect of protein binding and lipophilicity of penicillins on their in-vitro flux across gastric mucosa. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1998: 41, 231-236.
7. Vcev A., Vceva A., Stimac D., Takac B., Dmitrovic B., Kovac D. Omeprazole, azithromycin and either amoxicillin or metronidazole in eradication of *Helicobacter pylori* in duodenal ulcer patients. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 1998: 12, 453-456.
8. Kees F., Holstege A., Ittner K.P.; Zimmermann M., Lock G., Scholmerich J., Grobecker H., Pharmacokinetic interaction between proton pump inhibitors and roxithromycin in volunteers. *Aliment-Pharmacol-Ther.* 2000 14(4): 407-12.
9. Kobayashi Y., Doi M., Nagata H., Kume M. Murakami K. The 7 α -methoxy substituent in cephem or oxacephem antibiotics enhances *in vivo* anti *Helicobacter felis* activity in mice after oral administration. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2000: 45, 807-811.
10. De la Torre P.M., Enobakhare Y., Torrado G., Torrado S. Release of amoxicillin from polyionic complexes of chitosan and poly(acrylic) acid. Study of polymer/ polymer and polymer/ drug interactions within the network structure. *Biomaterials*, 2003: 24, 1499-1506.
11. De la Torre P.M., Torrado Susana, Torrado Santiago. Interpolymer complexes of poly(acrylic) acid and chitosan: influence of the ionic hydrogel-forming medium. *Biomaterials*, 2003: 24, 1459-1468.
12. Barkun,A.N.; Cockeram,A.W.; Plourde V., Fedorak R.N. Review article: acid suppression in non-variceal acute upper gastrointestinal bleeding *Aliment-Pharmacol-Ther.* 1999: 13(12): 1565-84.
13. Tutuian R., Katz P.O., Ahmed F., Korn S., Castell D.O. Over-the-counter H(2)-receptor antagonists do not compromise intragastric pH control with proton pump inhibitors. *Aliment-Pharmacol-Ther.* 2002: 16(3): 473-7

14. Saitoh T., Fukushima Y., Otsuka H., Hirakawa J., Mori H., Asano T., Ishikawa T., Katsube T, Ogawa K, Ohkawa S. Effects of rabeprazole, lansoprazole and omeprazole on intragastric pH in CYP2C 19 extensive metabolizers. *Aliment-Pharmacol-Ther.* 2002; 16(10): 1811-7
15. Whitehead L., Fell J.T., Collett J.H., Sharma H.L., A. M. Smith A.M. Floating dosage forms: an *in vivo* study demonstrating prolonged gastric retention. *Journal of Controlled Release*, 1998; 55, 3-12.
16. Billa N., Yuen K.H., Khader M.A., Omar A. Gamma-sintigraphic study of the gastrointestinal transit and *in vivo* dissolution of a controlled release diclofenac sodium formulation in xanthan gum matrices. *International Journal of Pharmaceutics*, 2000: 201, 109-120.
17. Ghos Y.F., Maes B.D., Geypens B.J., Mys G., Hiele M.I., Rutgeerts P.J., Vantrappen G. Measurement of gastric emptying rate of solid by means of a carbon-labeled octanoic acid breath test. *Gastroenterology*, 1993; 104, 1640-1647.
18. Maes B.D., Jiele M.I., Geypens B.J., Rutgeerts P.J., Ghos Y.F., Vantrappen G. Pharmacological modulation of gastric emptying rate of solid as measured by the carbon labelled octanoic acid breath test: Influence of erythromycin and propantheline. *Gut*, 1994; 35, 333-337.
19. Bruno M.J., Borm J.J., Hoek F.J., Delzenne B., Hofmann A.F., De Goeij J.J., Van Royen E.A., Van Leeuwen D.J., Tytgat G.N.J., Gastric Transit and Pharmacodynamics of a two-millimeter enteric-coated pancreatin microspheres preparation in patients with chronic pancreatitis, *Dig. Dis. Sci.* 1998; 43 (1) 203-213.
20. Meyer J.H., Elashoff J., Porter Fink V., Dressman J., Amidon G.L., Human postprandial gastric emptying of 1-3-millimeter spheres, *Gastroenterology* 1988; 94 (6) 1315-1325.

21. Maes B.D., Spitz B., Ghoo Y.F., Hiele M.I., Evenepoel P., Rutgeerts P.. Gastric emptying in hyperemesis gravidarum and non-dyspeptic pregnancy. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1999; 13: 237-243.
22. Patel V. R., and Amiji M. M. Preparation and characterization of freeze-dried chitosan-poly (ethylene oxide) hydrogels for site-specific antibiotic delivery in the stomach. *Pharmaceutical Research* 1996; 13: 588-593.
23. Erah P.O., Goddard A.F., Barret D.A., Shaw P.N. y Spiller R.C. The stability of amoxicillin, clarithromycin and metronidazole in gastric juice: relevance to the treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1997; 39: 5-12.
24. McColl K.E., Kennerley P. Proton pump inhibitors-differences emerge in hepatic metabolism. *Dig. Liver Dis* 2002; 34 (7): 461-7.
25. Geboes K.P., Maes B., Luybaerts A., Evenepoel P., Rutgeerts P., Ghoo Y. y Geypens B. Magnesium chloride slows gastric emptying, but does not affect digestive functions. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2002; 16: 1571-1577.
26. Wilding I.R., Kenyon C.J. y Hooper G.. Gastrointestinal spread of oral prolonged-release mesalazine microgranules (Pentasa) dosed as either tablets or sachet. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2000; 14: 163-169.
27. Evenepoel P., Claus D., Geypens B., Maes B., Hiele M., Rutgeerts P. e Ghoo Y. Evidence for impaired assimilation and increased colonic fermentation of protein, related to gastric acid suppression therapy. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1998; 12: 1011-1019.
28. Lew E.A. Review article: pharmacokinetic concerns in the selection of anti-ulcer therapy, *Aliment Pharmacol Ther* 13 (Suppl. 5) 1999: 11-16 (1999).
29. Mones J., Carrio I., Roca M., Estorch M., Calabuig R., Sainz S., Martinez-Duncker C. y Vilardell F.. Gastric emptying of two radiolabelled antacids. *Gut* 1991; 32(2): 147-50.

LEGENDS AND FIGURES

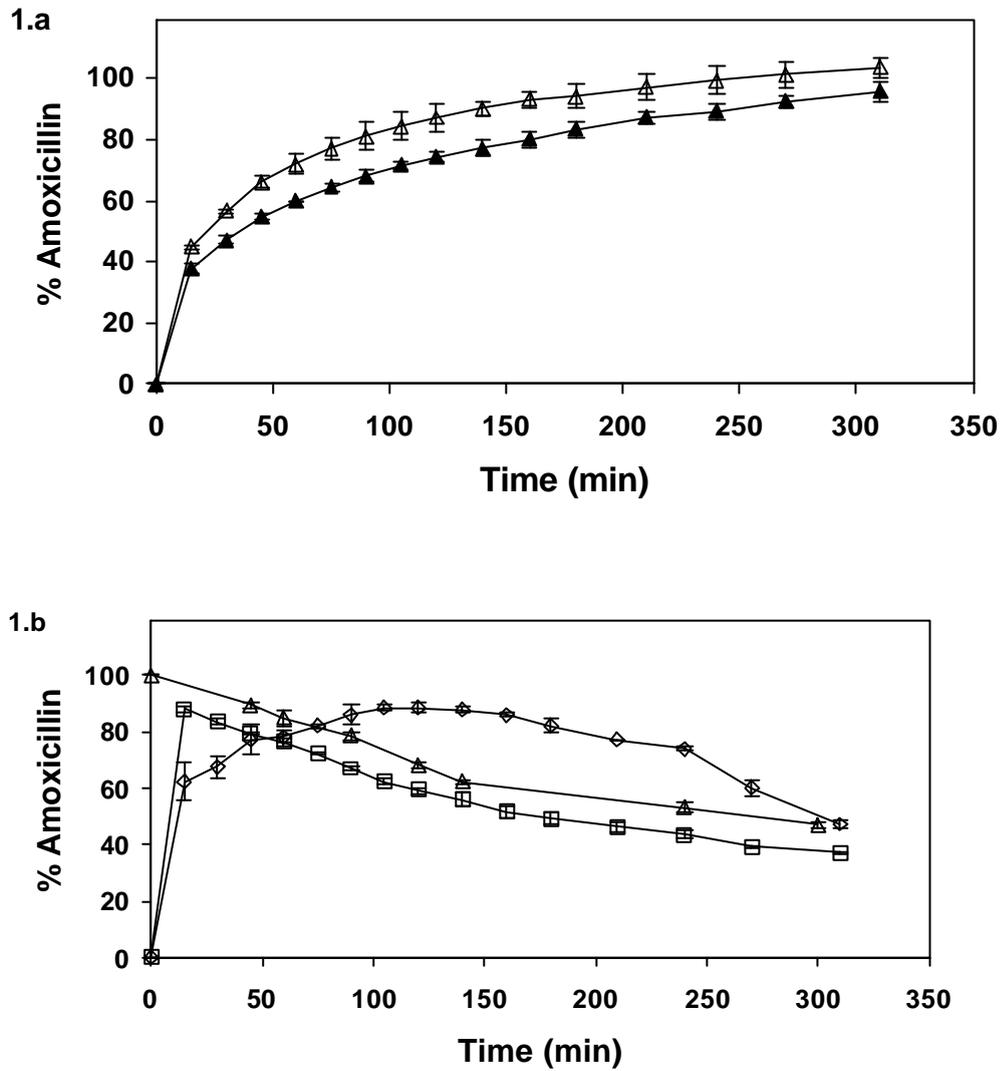


Figure 1. Amoxicillin release profiles from the freeze-dried PAA:CS:A polyionic complex (1:2.5:2) at 37°C in SGF (- -) and at pH 4.0 (- -) (1.a). Degradation kinetics of amoxicillin from: solution (- -), conventional capsules (- -) and the polyionic complex PAA:CS:A (2,5:5:2)-1,75M (- -) (1.b).

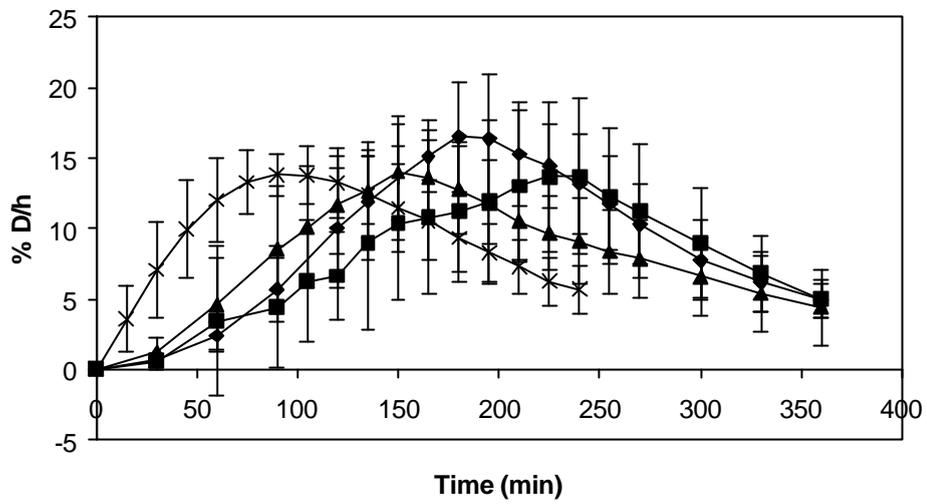


Figure 2. *In vivo* [$^{13}\text{CO}_2$] breath excretion pattern from the reference formulation (-X-) and from the PAA:CS:A polyionic complex (2.5:5:2) without treatment (-♦-) after pre-treatment with omeprazole (- -) and after pre-treatment with almagate (-■-).

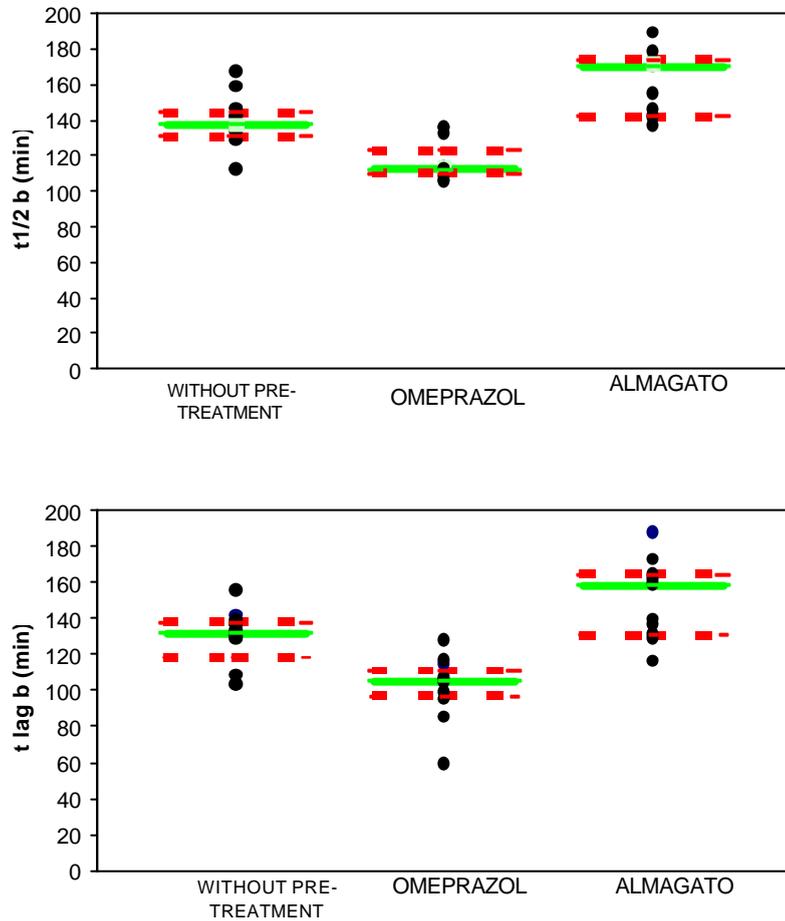


Figura 3. Individual gastric emptying results obtained in the three situations (without treatment, after pre-treatment with omeprazole, and after pretreatment with almagate): half-emptying coefficient and lag phase (bold line median; normal lines: interquartile range).