



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

---

KIMIKA FAKULTATEA  
FACULTAD DE QUÍMICA

**Universidad del País Vasco/Euskal Herriko  
Unibertsitatea**

**Facultad de Química/Kimika Fakultatea**

***Kimikako Gradua***

**GRADU AMAIERAKO LANA**

**3D inprimatze bidez lortutako almidoi pastillen askatze pertsonalizatua**

**Egilea: Aroa Lejardi Mugica**

**Zuzendaria: Rizkitza Gonzalez Munduate**

**Donostia, 2022ko uztaila**

**GIPUZKOAKO CAMPUSA  
CAMPUS DE GIPUZKOA  
Pº. Manuel de Lardizabal, 3  
20018 DONOSTIA-SAN SEBASTIAN  
GIPUZKOA**



## AURKIBIDEA

<b>LABURPENA</b> .....	1
<b>1. SARRERA</b> .....	3
1.1 Almidoia .....	3
1.2 Gelatinizazioa .....	5
1.3 3D inprimaketa .....	6
1.4 Medikuntza pertsonalizatua .....	8
1.5 Ikusgai-ultramoreko espektroskopia.....	10
<b>2. HELBURUAK</b> .....	13
<b>3. ATAL ESPERIMENTALA</b> .....	15
3.1 Erreaktiboak.....	15
3.2 Prozedura esperimentalta .....	15
3.3 Karakterizazioa.....	16
3.3.1 Analisi termograbitrikoa .....	16
3.3.2 Mikroskopia optikoa .....	17
3.3.3 Ekorketa bidezko mikroskopia elektronikoa.....	18
3.3.4 Pastillen dimentsioen neurketa .....	18
3.3.5 Osagai aktiboaren askapenaren karakterizazioa .....	18
3.3.5.1 <i>In vitro</i> askapena eta ikusgai-ultramore bidezko kuantifikazioa	18
3.3.5.2 Metodoaren balidazioa.....	19
a) Linealtasuna.....	20
b) Zehaztasuna.....	20
c) Prezisioa .....	20
d) Detekzio muga.....	21
e) Kuantifikazio muga.....	21
<b>4. EMAITZAK ETA EZTABAIDA</b> .....	23
4.1 Almidoiaren karakterizazioa .....	23
4.1.1 Mikroskopia optikoa .....	23
4.1.2 Analisi termograbitrikoa .....	25
4.2 Pastillen karakterizazioa .....	27
4.2.1 Pastillen dimentsioen neurketa .....	27
4.2.2 Ekorketa bidezko mikroskopia elektronikoa.....	28
4.2.3 Osagai aktiboaren askapenaren karakterizazioa .....	30
4.2.3.1 Metodoaren balidazioa.....	30
a) Linealtasuna.....	31

b) Zehaztasuna.....	32
c) Prezisioa.....	33
d) Detekzio eta kuantifikazio mugak.....	33
4.2.3.2 <i>In vitro</i> askapena eta ikusgai-ultramore bidezko kuantifikazioa	34
<b>5. ONDORIOAK.....</b>	<b>37</b>
<b>6. ERREFERENTZIAK.....</b>	<b>39</b>

## **LABURPENA**

---

Lan honetan, 3D inprimaketa bidez almidoian oinarritutako pastillak garatu dira eta haien ezaugarriak aztertu dira. Horretarako, jatorri botaniko ezberdineko hiru almidoi erabili dira eszipiente modura eta bi osagai aktibo gehitu dira (kloranfenikola eta atenolola). Ondoren, lortutako pastillen karakterizazioa burutu da hainbat ezaugarri aztertuz: almidoiaren ezaugarriak, pastillen dimentsioak, barne morfologia, etab. Garrantzi berezia eman zaio, osagai aktiboen askapenaren karakterizazioari. Askapen zinetikak, ikusgai-ultramoreko espektroskopia bidez aztertu dira, horretarako metodo analitikoa balidatu delarik.

Almidoi mota bakoitzak berezko egitura eta propietate fisiko-kimikoak dituela berretsi da. Horrela, almidoia jatorri botanikoak osagai aktiboaren askapenean eragin handia duela frogatu da. Gainera, kloranfenikola eta atenololaren askapenen artean ezberdintasunak ikusi dira, kasu bakoitzean sortutako almidoi/osagai aktibo interakzio ezberdinen ondorioz.

Beraz, kasu bakoitzean, almidoi mota aproposa aukeratuz, osagai aktiboaren askapena pazientearen beharrei egokitu daitekeela ondorioztatu da.

## **ABSTRACT**

The aim of this work was the development and characterization of 3D printed starch-based tablets. For this purpose, three starches from different botanical origin were used as excipient and two different active ingredients were added (chloranphenicol and atenolol). The obtained tablets were characterized in terms of: properties of raw starch, dimensions of tablets, morphology, etc. Particularly, the release of the active ingredients was analyzed in detail. The release kinetics were studied by ultraviolet-visible spectroscopy, for that the analytical method was validated.

It was confirmed that each type of starch presented its own structure and physico-chemical properties. Thus, the release of the active ingredient was highly influenced by the botanical origin of starch. In addition, differences between the releases of chloramphenicol and atenolol were observed as a result of the formation of different starch/active ingredient interactions. Therefore, it was concluded that the release of the active ingredient could be personalized for each patient by choosing the appropriate type of starch.

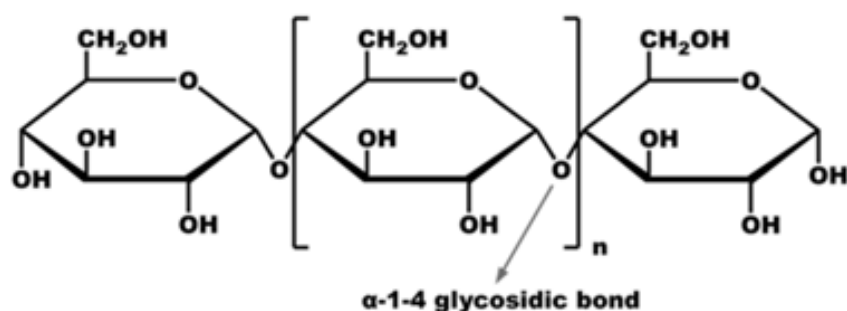


# 1. SARRERA

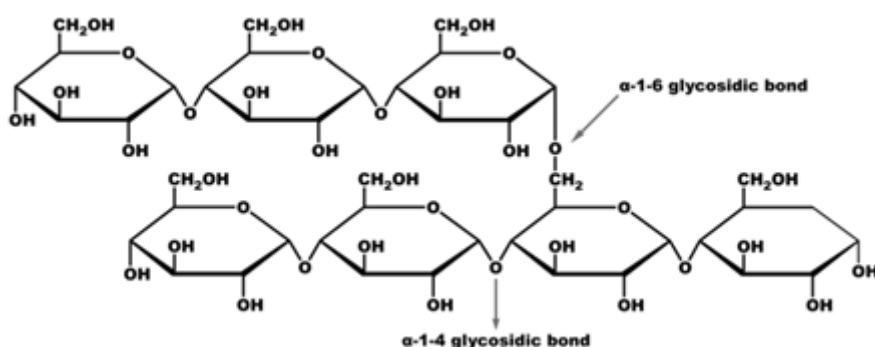
## 1.1 Almidoia

Almidoia landare gehienetan aurki daitekeen biopolimero berriztagarria da. Hain zuzen, landareek energia iturri gisa sortutako, izaera hidrofílico eta egitura semikristalinoa duen makromolekula degradagarria da<sup>1</sup>. Landareek sortzen dute, denboraldi luzeetan energia erreserba gisa erabili ahal izateko.

Biopolimero hau bi makromolekula nagusiz osatua dago: amilosa eta amilopektina. Amilosa (1-4)-d-glukopiranosita unitatez osatua dagoen polisakarido lineala da (1. Irudia). Amilopektina berriz, (1-4) eta (1-6)-d-glukopiranosil loturez eratutako polimero adarkatua da (2. Irudia). Egitura horrek, propietate biologiko eta fisikoetan garrantzi handia du<sup>1</sup>. Konposatu horiez gain, almidoia beste hainbat osagaiez osatua dago: lipidoak ( $\leq 1,5\%$ ), proteinak ( $0,1-0,7\%$  artean) eta fosforoa (ester fosfato taldeak)<sup>2</sup>.



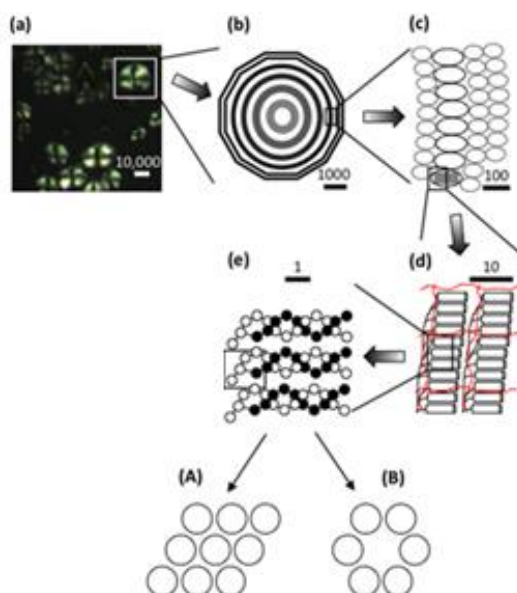
1. Irudia. Amilosaren estruktura kimikoa<sup>3</sup>.



2. Irudia. Amilopektinaren estruktura kimikoa<sup>3</sup>.

3. Irudian, almidoi granuluen egitura aurkezten da. Almidoi granuluen sintesi eta hazkuntza hilumatik hasten da. Horrela, almidoi granulak

txandakatutako hazkunde eraztun semikristalino eta amorfoz osatuak daude<sup>4</sup> (3b. Irudia). Eraztun amorfoak *blocklet* txikiez eratuta daude (grisez irudikatuta) eta eraztun erdikristalinoak aldiz, *blocklet* handiagoz (beltzez irudikatuta) (3c. Irudia). Gainera, *blocklet* egiturak lamela amorfo eta kristalinoz osatuta daude (3d. Irudia). Lamela kristalinoak amilopektina katez eratuak daude. Bi amilopektina kate elkartzean, helize-bikoitzak osatu ditzakete. Helize-bikoitz horiek bi motatako polimorfoak osatzen dituzte, A eta B motak hain zuzen. A motako kristalen helize-bikoitzak, elkar paketatuta daude zelda unitate monokliniko batean. B motako kristalen helize bikoitzak aldiz, zelda unitate hexagonal batean daude paketatuta<sup>5</sup> (3e. Irudia).



3. Irudia. (a) Arto almidoi granuluak argi polarizatu bidez ikusita. (b) Almidoi granulu hipotetikoaren inguruan hazitako eraztunekin. (c) *Blocklet* egiturak eraztun semikristalino (beltza) eta amorfoetan (grisa). (d) Helize-bikoitzez osatutako lamela egitura. (e) Hiru helize-bikoitz eta A eta B motako polimorfismoen irudikapena<sup>4</sup>.

Almidoia gizakion hornidurarako elikagai garrantzitsuenetako bat da. Hainbat landareen sustrai, hazi, errizoma eta tuberkuluetan aurki daiteke<sup>6</sup>. Almidoia lortzeko prozesatutako nekazaritza-labore nagusienak patata, artoa eta garia dira<sup>1</sup>. Horrela, jatorri botanikoaren arabera, almidoi granuluen biosintesi mekanismoa ezberdina izango da. Ondorioz, landare bakoitzaren almidoi granuluen egitura ezberdina izango da, bakoitzak bere propietate bereziak edukiz<sup>4</sup>.



Hau da, konposizioa eta amilosa/amilopektina erlazioa, granuluen morfologia eta tamaina, zein kristalinitatea almidoiaren jatorriaren menpekoak izango dira<sup>2</sup>.

Lan honetan, arto almidoi normala, waxy arto almidoia eta patata almidoia erabili dira. Almidoi mota hauen propietateak 1. Taulan azaltzen dira.

1.Taula. Almidoi mota ezberdinen ezaugarriak.

Almidoi mota	Amilosa (%)	Granuluen forma	Granuluen tamaina	Polimorfismo mota	Kristalinitatea (%)
Arto almidoi normala	%10-30 <sup>5</sup>	Esferikoa <sup>2</sup>	5-20 $\mu\text{m}$ <sup>4</sup>	A mota <sup>7</sup>	33,8 <sup>8</sup>
Waxy arto almidoia	Trazak soilik <sup>3</sup>	Esferikoa <sup>2</sup>	5-15 $\mu\text{m}$ <sup>4</sup>	A mota <sup>7</sup>	39,0 <sup>8</sup>
Patata almidoia	%20-30 <sup>5</sup>	Elipsoidala <sup>2</sup>	40-50 $\mu\text{m}$ <sup>3</sup>	B mota <sup>5</sup>	34,6 <sup>8</sup>

Arto almidoi normalak %10-30 amilosa dauka eta waxy arto granuluek ez dute ia amilosarik (aztarnak besterik ez), almidoi mota honen osagai nagusia amilopektina baita. Patata almidoia ordea, %20-30 amilosa edukia du.

Granuluen forma eta morfologia mikroskopia optiko zein ekorketa bidezko mikroskopia elektroniko bidez aztertu ohi dira. Hainbat ikertzaileek ondorioztatu duten bezala<sup>2</sup>, arto almidoi normalaren eta waxy arto almidoiaren granuluek itxura esferikoa dute eta patata granuluek ordea, forma elipsoidala. Tamainari dagokionez, arto normalaren granuluek 5-20  $\mu\text{m}$  neurtzen dute, waxy arto granuluek 5-15  $\mu\text{m}$  eta patata granuluek 40-50  $\mu\text{m}$ <sup>3,4</sup>.

Kristalinitateari dagokionez, aurretik aipatu den bezala almidoi granuluek egitura semikristalinoa dute. Kristalinitate mota eta kristalinizate-maila ezberdina izango da almidoi motaren arabera. Waxy arto almidoi motaren kasuan, kristalinitate-maila nabarmenki altuagoa da<sup>4</sup>, amilopektina edukia handiagoa delako.

## 1.2 Gelatinizazioa

Almidoia abiapuntu izanik hainbat erreakzio ezberdin burutu daitezke, hala nola: urtzea, kristalizazioa eta gelatinizazioa. Horien artean, gelatinizazioa da

almidoia prozesatzean garrantzi gehien duen prozesua. Izan ere, prozesu honen ondorioz, almidoiaren erabilgarritasuna handitu egiten baita<sup>9</sup>.

Gelatinizazio prozesua gertatu ahal izateko beharrezkoa da almidoia plastifikatzaile batekin nahastea eta beroa edota indar mekanikoa aplikatzea. Uraz gain beste hainbat osagai erabili ohi dira plastifikatzaile gisa. Ohikoena glizerola den arren, hainbat ikerketa lanetan uretan disolbagarriak diren beste konposatu batzuk ere erabili izan dira (sorbitola, etilen glikola, etab.)<sup>10</sup>.

Horrela almidoiari, ura edo beste plastifikatzaile egoki baten presentzian temperatura edo indar-mekanikoak aplikatzen zaizkionean, bere egitura aldatu egiten da. Almidoi granuluak puztu eta hautsi egiten dira. Kristalinitateari dagokionez, gelatinizazio prozesua jasan ondoren kristalinitatea suntsitzen da helize-bikoitzak eta egitura lamelar kristalinoa desagertzen baitira material amorfo bat lortuz<sup>10</sup>.

Gelatinizazio prozesuan almidoiak ura edo erabili den plastifikatzailearekin interakzioak sortzen ditu. Izan ere, amilosa eta amilopektinaren kateen arteko jatorrizko hidrogeno zubiak apurtzen dira eta plastifikatzailearen eta almidoiaren hidroxilo taldeen arteko interakzio berriak sortzen dira<sup>9</sup>.

Gelatinizazioa ematen deneko temperatura, hau da gelatinizazio temperatura ( $T_G$ ), hainbat faktoreren baitan aldatzen da. Esaterako,  $T_G$  temperatura jatorri botanikoaren, almidoi kontzentrazioaren eta granuluen heterogeneotasunaren menpekoa izango da<sup>3</sup>.

Gainera, jakina den bezala, gelatinizatutako almidoiak temperatura hozte eta biltegitratzean zehar eretrogradazio izeneko fenomenoak jasan dezake. Ondorioz, almidoian oinarritutako materialen amaierako propietateak aldakorrak izan daitezke. Prozesu honetan, almidoiaren egitura egoera amorfo batetik egoera ordenatu batera igarotzen da, amilosa eta amilopektina kateen birkristalizazioaren ondorioz<sup>11</sup>.

### 1.3 3D inprimaketa

Fabrikazio gehigarria teknologia ezberdinak biltzen dituen manufaktura prozesua da, 3D inprimaketa izenez ere ezaguna dena. Prozesu honetan, material jakin bat kapaz-kapa gainezarriz hiru dimentsiotako objektu solido bat osatzen da ordenagailu bidezko diseinu batetik abiatuz (CAD diseinua)<sup>12</sup>. 3D inprimaketan

material ezberdin ugari erabiltzen badira ere, polimeroak dira gailentzen direnak, beraien aldakortasuna, kostu baxua eta propietate fisiko-kimikoak direla eta<sup>13</sup>.

Teknika honi esker, hainbat fabrikazio sistemen oztopoak gainditu dira. Adibidez, nahi diren tamainako piezak ekoiz daitezke, fabrikazio prozesuko akatsak baztertu eta propietate mekanikoen hobekuntza lor daiteke. Gainera, kostu baxua duen teknika da. Ondorioz, prozesaketa teknologia oso erabilgarria bihurtu da sektore askorentzat.

Fabrikazio gehigarriak hainbat fabrikazio prozesu biltzen ditu. Estandarizatorako Nazioarteko Erakundeak (*International Organization for Standardization*, ISO) eta Materialen Testerako Elkarte Amerikarrak (*American Society for Testing and Materials*, ASTM) zazpi azpitaldeetan sailkatzen ditu prozesuak<sup>14</sup>.

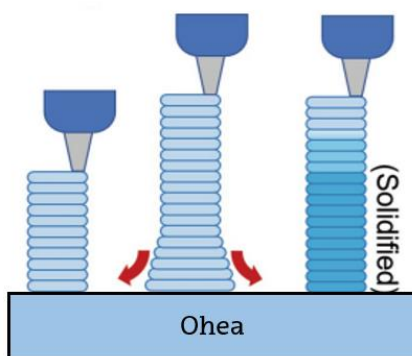
1. Materialaren Estrusioa (*Material Extrusion*, ME)
2. Fotopolimerizazioa depositoan (*Vat photopolymerization*, VP)
3. Hauts-ohearen fusioa (*Powder Bed Fusion*, PBF)
4. Materialaren proiektzioa (*Material Jetting*, MJ)
5. Aglutinatzailearen proiektzioa (*Blinder Jetting*, BJ)
6. Orrien ijezketa (*Sheet Lamination*, SL)
7. Energiaren deposizio zuzena (*Direct Energy Deposition*)

Lan honetan, materialaren estrusio izenaz ezagutzen den metodoa erabili da. Metodo honen barruan bi teknika nagusi aurki ditzakegu. Materialurtzearen bidezko modelatzea (*Fused Deposition Modelling*, FDM) eta estrusio zuzena (*Direct Ink Writing*, DIW).

FDM teknika, solidoen fusioan oinarritzen den inprimaketa teknika da. Objektua sortzeko, filamentua urtu egiten da eta bokila batetik bideratzen da. Horrela, materiala ohean ipini ondoren, hoztu eta solidotzen da, CAD diseinuaren objektua lortuz.

Bestetik, DIW teknikan, xiringa bat material likido batetikin betetzen da (material honi tinta deitzen zaio). Xiringaren enbolotik bultzatuz, materiala bokilatik pasarazten da. Horrela, materiala ohearen gainean kapaz-kapa ipintzen da objektua lortzeko<sup>15</sup>.

Lan honetan, DIW teknika jarraitu da, tinta bezela gelatinizatutako almidoia erabiliz.



4. Irudia. DIW inprimaketa mota<sup>15</sup>.

## 1.4 Medikuntza pertsonalizatua

Ohiko fabrikazio farmazeutikoan medikamentuak loteka produzitzen dira espezifikazio eta parametro zehatz batzuekin. Horrela, hautatutako dosiak ekoizten dira, normalean helduen dosian oinarrituz. Baina, pazienteen azpitalde ezberdinek, hala nola, pediatria eta geriatria pazienteek, adinaren arabeko dosiak behar dituzte. Adibidez, haurren adina, pisua eta gaitasun metabolikoa faktore erabakigarriak dira dosi zuzena zehazterakoan<sup>16</sup>.

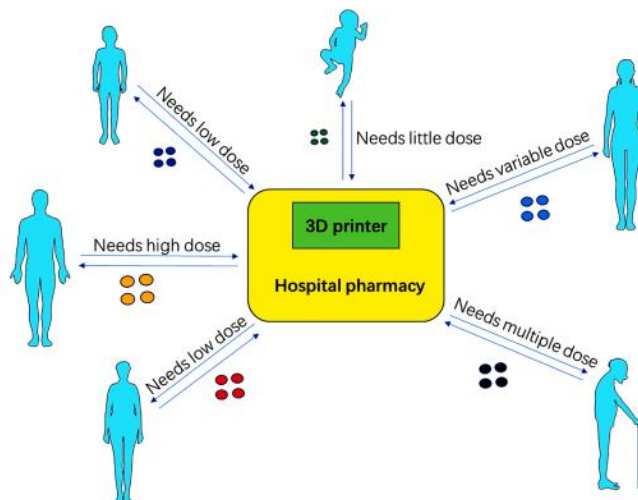
Arazo honen aurrean eta paziente bakoitzaren behar indibidualei erantzuteko, medikamentuak emateko sistema pertsonalizatuak (PDDS) garatzea beharrezkoa da.

Medikuntza pertsonalizatuaren alderdi garrantzitsuenetakoa dosia egokitzea da. Horrez gain, beharrezkoa da dosi forma eta osagai aktiboaren askapena pertsona bakoitzaren beharretara egokitzea. Hori dena, gaixotasunaren larritasunaren arabera eta gaixotasunaren fasearen arabera egin behar da<sup>16</sup>. Gainera, kontutan hartu behar da, paziente batzuk hainbat pastilla hartu behar dituztela gaixotasun ezberdinen tratamendurako edo sendagai bakar baten ekintza terapeutikoa egokitzeko.

Testuinguru honetan, gainditu beharreko hiru erronka nagusi ageri dira, farmakoen ahozko administrazioari dagokionez<sup>16</sup>:

1. Behar indibidualei erantzun eta dosien doitasuna lortu, populazio pediatriko eta geriatrikoentzat batez ere (5. Irudia).
2. Osagai aktiboaren askapena denboran zehar kontrolatzeko dosifikazio sistema berriak garatu.

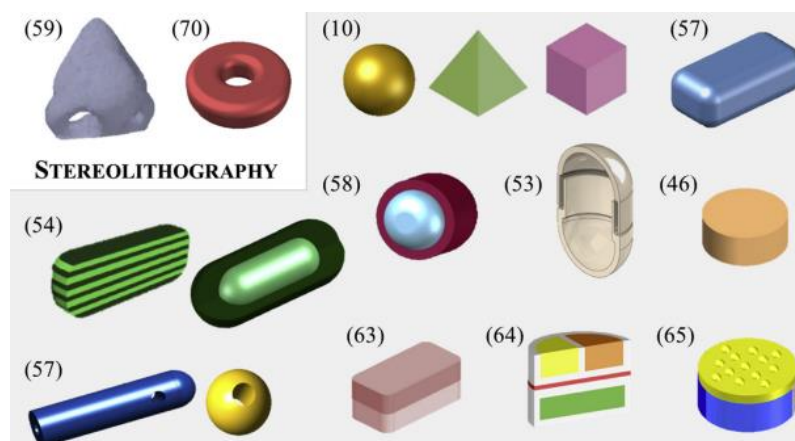
3. Sendagaien ahozko administrazioa errazteko dosi alternatiboak garatu, irensteko arazoak dituzten pazienteentzat. Zentzu honetan, azkar desagitzen diren pastillak alternatiba egokitzat kontsideratzen dira.



5. Irudia. Pazienteen adinaren arabera inprimatutako medikamentuak<sup>16</sup>.

Zentzu honetan, azken urteotan, 3D inprimaketari esker aurrera pauso handiak lortzen ari dira. 6. Irudian ikus daitezkeen bezala, manufaktura teknika aurreratu honen bidez, pazienteen beharren arabera pastillak diseina daitezke nahi den forma eta egitura aukeraturik. Ondorioz, osagai aktiboaren askapena kontrola daiteke, printzipio aktiboaren liberazio denbora pastillaren formarekin erlazionatua baitago. Horrez gain, fabrikazio tradizionalan ez bezala 3D inprimaketa bidez osagai aktibo ugariarekin kargatutako pastillak presta daitezke. Gainera, teknika honen bidez material guztia erabiltzen da eta denbora gutxiago behar da prozesua egiteko, ondorioz dirua aurreztuz<sup>17</sup>.

Horrela, material, parametro eta sortze modeloen aukeraketa egokia eginez, 3D inprimaketa bidez medikuntza pertsonalizatuan aplikatu daitezkeen neurria diseinatutako produktuak lor daitezke.

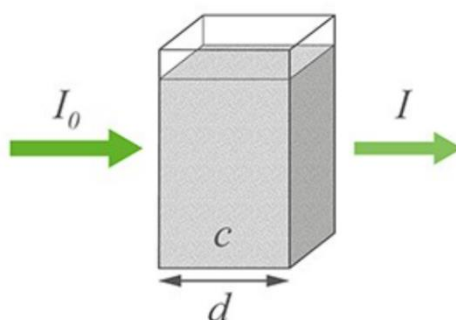


6. Irudia. Medikamentuaren geometria ezberdinak <sup>17</sup>.

## 1.5 Ikusgai-ultramoreko espektroskopia

Ikusgai-ultramoreko espektroskopia (UV-vis espektroskopia) garrantzi handiko espektroskopia teknika da konposatu ezberdinen analisirako erabiltzen dena. Oso teknika erabilia da konposatu organikoen analisi kualitatiboa eta kuantitatiboa egiteko<sup>18</sup>.

Absortziozko espektroskopia teknika honetan, lagina uhin-luzera ezberdinetako izpi elektromagnetikoekin argizatzen da, tarte ultramore (100-400 nm) eta ikusgai (400-800 nm) hain zuzen<sup>18</sup>. Konposatu bakoitzak argi izpi ultramore eta ikusgaien zati bat absorbatuko du. Absorbatu ez dena, hau da transmititzen den argia, detektagailu egoki batek erregistratzen du. Horrela, seinalea uhin-luzerarekiko irudikatuz, konposatuaren espektroa lortzen da<sup>19</sup>.



7. Irudia. Transmittantzia eta Lambert-Beer-en legearen irudikapena

Laginak argi-izpiak absortzen dituenean, oinarritzko egoeran dauden elektroiak, egoera kitzikatura igaroko dira. Horrela, absorbantzia laginak xurgatzen duen argi kantitatea izango da, ondorengo ekuazioaren arabera kalkula daiteke:

$$A = -\log(T) \quad (\text{Ek. 1})$$

Horrela, prozesuan askatzen den erradiazioa neurtzen da. Transmitantzia, honela kalkula daiteke (ikusi 7. Irudia):

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (\text{Ek. 2})$$

Non  $I$  hutsunean transmitatutako argiaren intentsitatea den eta  $I_0$  laginaren bidez transmititzen den argiaren intentsitatea.

Laginaren absorbantzia neurtzeko Lambert-Beer-en legea erabiltzen da. Lege honek, absorbatutako energia, transmititutako argiaren kontzentrazioarekiko zuzenki proportzionala izango dela definitzen du<sup>20</sup>.

$$A = \epsilon dc \quad (\text{Ek. 3})$$

Non  $A$  absorbantzia den,  $\epsilon$  absorbitate molarra,  $c$  kontzentrazioa eta  $d$  argi bidea<sup>20</sup>.





## **2. HELBURUAK**

---

Lan honen lehenengo helburua 3D inprimaketa bidez almidoi ezberdinetan oinarritutako pastillak garatzea izan da, bi osagai aktibo mota erabilia. Horrez gain, bigarren helburua, garatutako medikamentuaren osagai aktiboaren liberazioa ikusgai-ultramoreko espektroskopia bidez aztertzea izan da. Horrela, 3D inprimatze teknika bidez garatutako almidoi pastillek medikuntza pertsonalizatuan duten erabilgarritasuna frogatu nahi da.

Horretarako, hiru almidoi mota ezberdin erabili dira, hain zuzen arto almidoi normala, waxy arto almidoia eta patata almidoia. Jatorri botanikoak osagai aktiboaren askapenean duen eragina aztertu da. Horrez gain, bi osagai aktibo ezberdin erabili dira. Batetik, kloranfenikola (antibiotikoa) eta bestetik atenolola (betablokeatzailea).

Lehenik eta behin, hiru almidoi moten granuluen ezaugarriak eta egonkortasun termikoa aztertu dira. Ondoren, inprimatutako pastillen dimentsioak eta mikroegitura porotsua analizatu dira. Azkenik, proposatutako metodo analitikoa balidatu da eta pastillen askatze profilak ikertu dira.

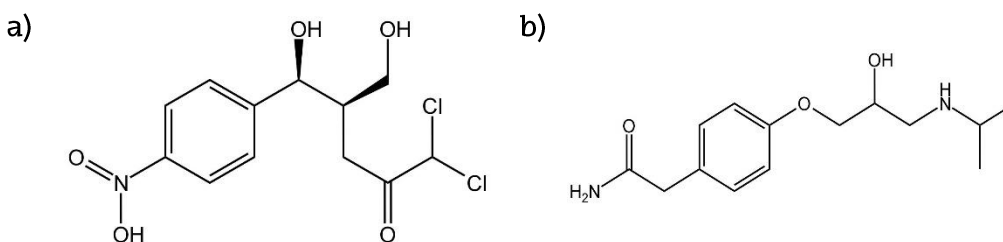


## 3. ATAL ESPERIMENTALA

### 3.1 Erreaktiboak

Ikerketa hau burutzeko hiru almidoi mota ezberdin erabili dira eszipiente modura, hain zuzen Sigma-Aldrich etxeko arto almidoi normala, waxy arto almidoia eta patata almidoia.

Horrez gain, kloranfenikola (Sigma-Aldrich) eta atenolola (Sigma-Aldrich), osagai aktibo bezala erabili dira. Kloranfenikola antibiotiko gisa erabiltzen den medikamentua da eta infekzioak tratatzea du funtzio. Kolore horixka duen hautsa da eta disolbagarria da uretan<sup>21</sup>. Atenolola aldiz, betablokeatzailea da eta hipertentsioa kontrolatzea du funtzio. Kolore zuriko hautsa da eta disolbagarritasun baxua du uretan<sup>22</sup>.



8. Irudia. (a) Kloranfenikolaren egitura kimikoa eta (b) atenololaren egitura kimikoa.

Horrez gain, medikamentuaren askapen neurketak burutzeko, fosfato gatz tanpoi disoluzioa (PBS, Panreac) erabili da.

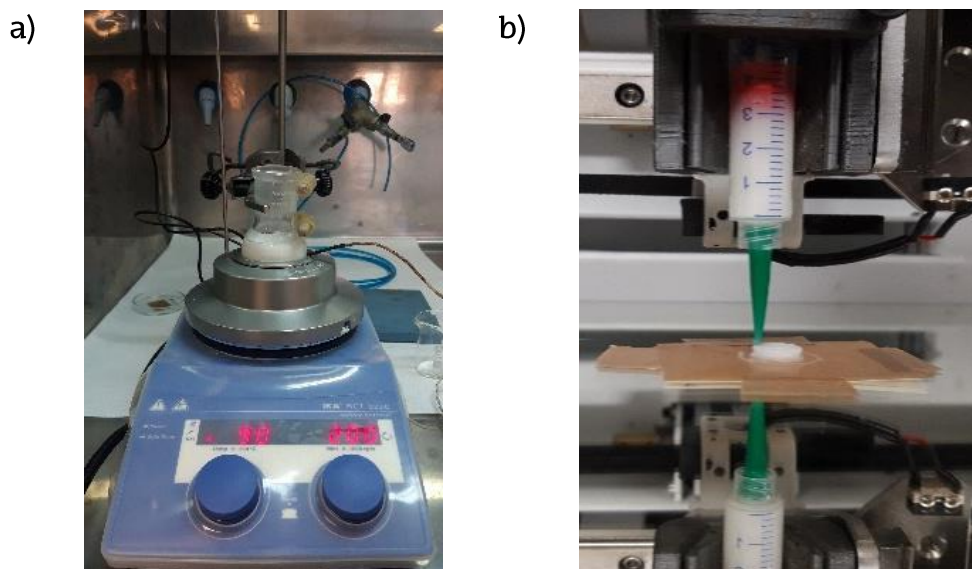
### 3.2 Prozedura esperimentalak

Almidoian oinarritutako pastillak 3 urratsetako metodologia jarraituz prestatu dira: almidoi tinten garapena gelatinizazio bidez, pastillen lorpena 3D inprimaketa bidez eta liofilizazioa. Jarraian deskribatzen den prozedura almidoi mota bakoitzarekin errepikatu da.

Lehenengo urratsean, almidoi mota bakoitza indibidualki hartu da (10,5 g) eta ur distilatua (35 mL) eta hautatutako osagai aktiboarekin nahastu da (0,0175 g).

Nahastua 20 minutuz berotzen da. Almidoi mota bakoitzaren kasuan gelatinizazioa tenperatura ezberdinean burutu da; arto almidoi normalarentzat eta waxy arto almidoiarentzat 90 °C-tan eta patata almidoiarentzat 80 °C-tan. Jarraian, lortutako gela, 3D inprimatze teknikan erabiliko den xiringan jarriko da kontu handiz burbuilak ez sortzeko.

Bigarren urratsa, 3D inprimaketa izan da Voladora 3D printer (Tumaker, SL. Spain) ekipoa erabiliz. Pastillak geometria zilindrikoarekin inprimatu dira, 0,8 mm-ko diametroa eta 10 mm-ko altuerarekin. Lagin guztiak 6 mm s<sup>-1</sup>-eko inprimaketa abiadura eta %100 betetze portzentajein inprimatu dira. Azkenik, lortutako pastillak liofilizatu dira Telstar Lyoquest ekipoa erabiliz.

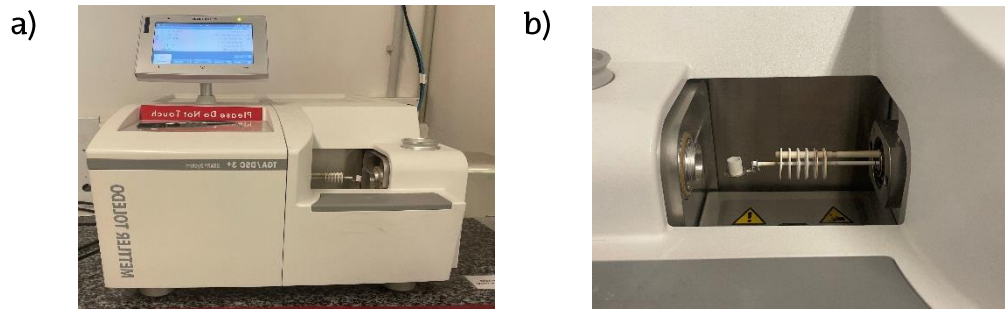


9. Irudia. (a) Gelatinizazio prozesua eta (b) inprimaketa prozesua.

### 3.3 Karakterizazioa

#### 3.3.1 Analisi termograbimetrikoa

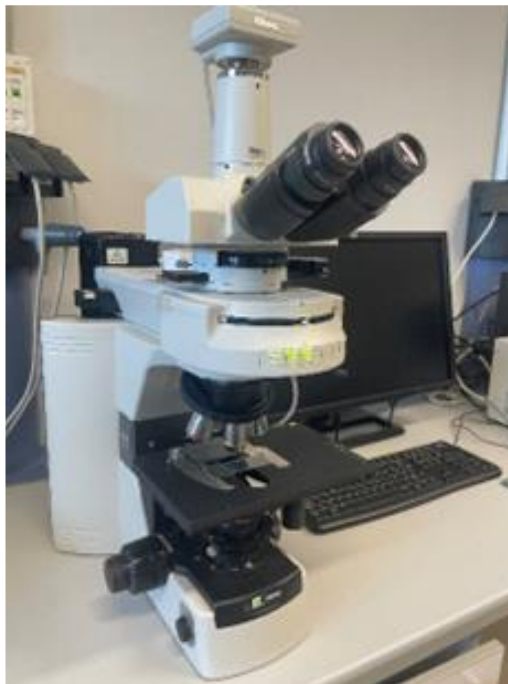
Analisi termograbimetrikoa (TGA) Mettler Toledo etxeko TGA-SDTA 851 ekipoa erabilita burutu da. Saiakuntzak 25 °C-tik 800 °C-tara egin dira, 10 °C min<sup>-1</sup>-ko berotze abiadurarekin eta nitrogeno atmosferan degradazio tenperaturak aztertu ahal izateko.



10. Irudia. (a)Mettler Toledo etxeko TGA-SDTA ekipoa eta (b) ekipoareen labea.

### 3.3.2 Mikroskopia optikoa

Almidoi ezberdinen granuluen egitura, morfologia eta dimentsioak mikroskopia optikoaren bidez aztertu dira. Horretarako, Nikon Eclipse E600 ekipoa erabili da, transmisio moduan lan eginda.



11. Irudia. Nikon Eclipse E600 ekipoa.

### 3.3.3 Ekorketa bidezko mikroskopia elektronikoa

Ekorketa bidezko mikroskopia elektronikoko (SEM) irudiak, liofilizatutako pastillen zeharkako sekzioaren egitura mikroporotsua aztertzeko helburuz jaso dira. Horretarako, Hitachi S-4800N Field Emission Gun Scanning Electron Microscope (FEG-SEM) ekipoa erabili da 5 kV-ko tentsiopean lan eginez. Laginak urrez estali dira neurketak egin aurretik.

### 3.3.4 Pastillen dimentsioen neurketa

Liofilizatutako pastillen dimentsioen neurketak burutzeko kalibrea (Fisherbrand) erabili da. Tresna honetaz baliatuz, pastilla guztien diametroa eta altuera neurtu da, (n=3).



12. Irudia. Fisherbrand kalibrea.

### 3.3.5 Osagai aktiboaren askapenaren karakterizazioa

#### 3.3.5.1 *In vitro* askapena eta ikusgai-ultramore bidezko kuantifikazioa

Askapenaren azterketa burutzeko, liofilizatutako pastillak 100 mL PBS disoluzioa duen matraxe aforatu baten barruan, jarri dira (pH = 7,4) eta 37 °C-tan irabiatuz mantendu dira inkubadora batean. Hainbat denbora tarte ezberdinetan hartu da alikuota; 2, 4, 6, 8, 10, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360 eta 1440 minutuetan. Aukeratutako denbora tarte horietan, disoluzioaren 1 mL-ko alikuota bat hartu da eta UV-vis espektroskopia bidez aztertu da. Ondoren, alikuota erreaktorean sartu

da berriro. Hala ere, lehenengo 5 alikuotak hartzerakoan, zuzenean 1 mL PBS gehitzen da eta gero ez da alikuota berriro gehitzen, denbora tarteak txikiak baitira. Askatutako osagai aktiboaren kopurua, osagai aktiboaren absorbantzia maximoaren uhin luzeran ematen duten seinalearekin erlazionatuko da aurretik egindako kalibrazio kurbaren bidez.

Kloranfenikolaren kasuan, absorbantzia maximoa 277 nm-ko uhin-luzeeran lortu da eta atenololaren kasuan berriz, 227 nm-ko uhin luzeeran (Ikusi 4.2.3.1. Atala). Azkenik, denbora tarte guztietan metatutako osagai aktiboaren askapena kalkulatu da ondorengo ekuazioa erabiliz:

$$\text{Metatutako botika askapena (\%)} = \frac{m_t}{m_0} \times 100 \quad (\text{Ek. 4})$$

non  $m_t$  t denboran askatutako osagai aktiboaren masa metatua den eta  $m_0$  kargatutako osagai aktiboaren masa totala.

UV-vis espektroskopia neurketak burutzeko Shimadzu UV-3600/3100 ekipoa erabili da 190 – 600 nm tartean lan eginez eta kuartzozko kubetak erabiliz. Lortutako espektrou eta emaitzen datu tratamendua Microsoft ® Excel ® 2019 programa erabiliz burutu da.



13. Irudia. (a) Inkubadora KS 4000 i control eta (b) Shimadzu UV-3600/3100 ekipoa.

### 3.3.5.2 Metodoaren balidazioa

Metodoaren balidazioa, erabili den metodoa proposatutako erabilerarako proposa dela frogatzen duen prozedura da. Jarraian, kloranfenikol zein atenololaren kuantifikaziorako erabilitako metodoaren balidazioa nola burutu den azalduko da. Lan honetan, hainbat parametro neurtu dira: linealtasuna, zehaztasuna, prezisioa, detekzio muga (LOD) eta kuantifikazio muga (LOQ).

## a) Linealtasuna

Lehenik eta behin, absorbantzia eta osagai aktiboaren kontzentrazioaren arteko linealtasuna aztertu da. Horretarako, 6 puntuko kalibratze kurbak lortu dira 0 - 0,05 mg mL<sup>-1</sup> kontzentrazio tartean lan eginez. Linealtasuna absorbantzia vs kontzentrazioa irudikatu ondoren lortutako zuzenaren korrelazio koefizientearen (R<sup>2</sup>) bidez aztertu da. Emaitzak onargarriak direla esango da datu hori R<sup>2</sup>>0,999 denean<sup>23</sup>.

## b) Zehaztasuna

Zehaztasunak, neurtutako balioaren eta "benetako" balioaren adostasuna adierazten du<sup>24</sup>. Erabili den prozedura zehatza dela ziurtatzeko berreskurapen testak burutu dira 15 eta 30 mg/mL kontzentrazioetan (5 errepika eginez). Lortutako berreskurapen balioa %85-115 bada, berreskurapen onargarria ondorioztatu da.

$$\text{Berreskurapena (\%)} = \frac{C_{\text{aurkitua}}}{C_{\text{jarritakoa}}} \times 100 \quad (\text{Ek. 5})$$

## c) Prezioa

Metodo baten prezioak, neurketa-multzo baten arteko hurbiltasuna adierazten du<sup>24</sup>. Metodoaren prezio edo doitasun maila desbideratze estandar erlatiboaren (RSD) bidez determinatu da. *Intra-day* prezioa kalkulatzeko, egun berdin batean, disoluzio baten 5 erreplika aztertu dira. *Inter-day* prezioa aztertzeko ordea, neurketak bi egun jarraituetan errepikatu dira<sup>25</sup>.

Kalkulatutako RSD balioak RSD < %10 badira, prezio maila ontzat jotzen da.

$$RSD(\%) = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{Ek. 6})$$

Non  $\sigma$  neurketen desbideratze estandarra den eta  $\bar{x}$  neurketen batz bestekoa.



## d) Detekzio muga

Detekzio mugak laginean detektatu daitekeen analito kontzentrazio txikiena zein den adierazten du<sup>26</sup>. LOD ondorengo ekuazioa erabiliz kalkula daiteke:

$$LOD = 3,3 \times \frac{\sigma}{S} \quad (\text{Ek. 7})$$

Non  $\sigma$  desbideratze estandarra den eta S kalibrazio lerroko malda den.

## e) Kuantifikazio muga

Kuantifikazio mugak laginean zehaztasunez kuantifikatu daitekeen analito kontzentrazio txikiena zein den adierazten du<sup>26</sup>. Honako ekuazioaren bidez determinatzen da:

$$LOQ = 3 \times LOD \quad (\text{Ek. 8})$$



## 4. EMAITZAK ETA EZTABAIDA

---

Lehen aipatu bezala, lan honen lehenengo helburua 3D inprimaketa bidez almidoi ezberdinetan oinarritutako pastillak garatzea izan da, bi osagai aktibo ezberdin erabilita. Horrez gain, bigarren helburua, garatutako pastillen karakterizazioa izan da, garrantzi berezia emanez UV-vis espektroskopia bidezko osagai aktiboaren askapenaren azterketari.

### 4.1 Almidoiaren karakterizazioa

3D pastillen karakterizazioa burutu aurretik, komenigarria da almidoi hutsaren karakterizazioa burutzea. Horretarako, hainbat froga ezberdin egin dira, hain zuzen, mikroskopia optikoa eta analisi termogravimetrikoa.

#### 4.1.1 Mikroskopia optikoa

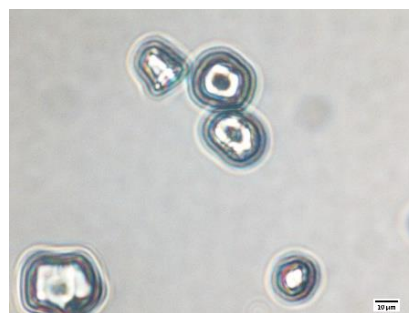
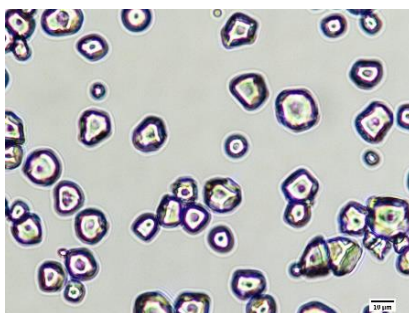
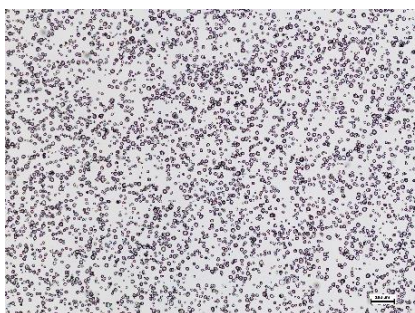
Erabilitako hiru almidoi motak mikroskopia optiko bidez aztertu dira, granulu mota bakoitzaren morfologia eta dimentsioak determinatzeko asmoz. 14. Irudian almidoi granulak aztertzeko lortutako irudiak aurkezten dira. Bertan, hainbat irudi ezberdin erakusten dira almidoi mota bakoitzarentzat, handitze ezberdinak erabiliz.

Zehazki, aipatutako handitze ezberdinak ezkerretik eskuinera areagotzen dira, hau da, ezkerreko irudiek edukiko dute handitze tamaina txikiena eta eskuinekoek handiena. Ezkerreko irudien kasuan, handitzea x50-koa da. Erdikoen kasuan berriz, handitze tamaina x500-koa da eta azkenik, eskuinera ageri diren irudien handitze tamaina x1000 -koa da.

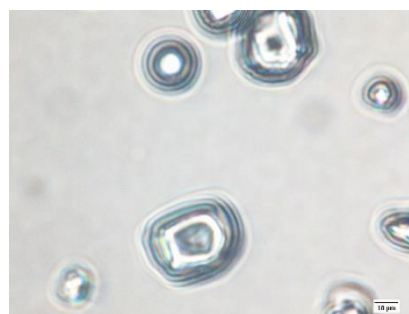
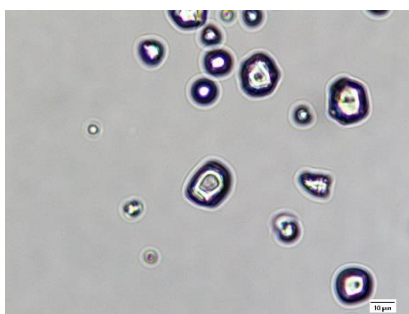
14. Irudian, almidoi granuluen arteko ezberdintasunak ikus daitezke, jatorri botanikoak granuluen tamaina eta morfologian duen eragina berretsiz. Lortutako irudiak erabiliz, almidoi granulu mota ezberdinen partikulen diametroa kalkulatu da. Almidoi granulu mota bakoitzarentzat neurri ezberdinak lortu dira. Batetik, arto almidoi normalaren eta waxy arto almidoiaren artean ez dira ezberdintasun nabariak antzeman. Biek morfologia esferikoa aurkezten dute eta 10-19  $\mu\text{m}$  arteko tamaina.

Bestetik, arto almidoi granulak patata granuluen forma eta tamainarekin alderatuz, ezberdintasunak antzeman dira. Patata granulak obalo forma dute eta beraien diametroa handiagoa da besteekin alderatuz, hain zuzen 29-49  $\mu\text{m}$ .

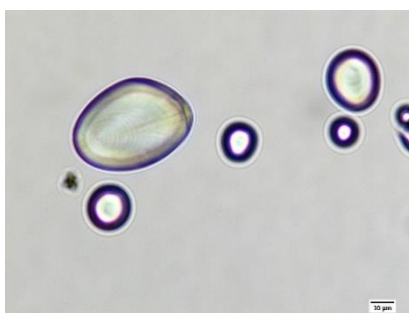
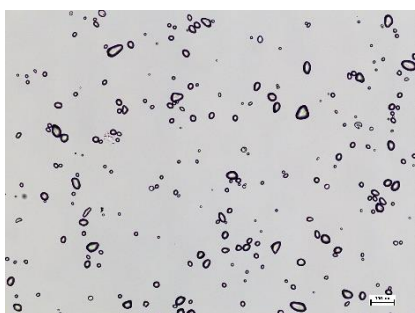
### Arto normal almidoia



### Waxy arto almidoia

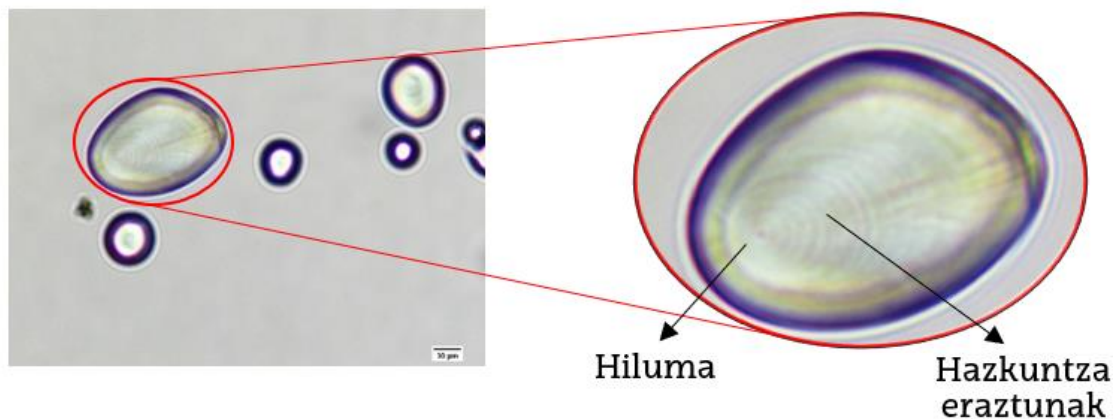


### Patata almidoia



14. Irudia. Almidoi mota ezberdinen granuluen irudiak handitze ezberdinak erabiliz.

Gainera, irudi hauek almidoi granuluen barne egitura aztertzeko erabili dira. Adibide modura, 15. Irudian patata almidoi granuluen barne egitura orokorra aurkezten da. Granuluen erdialdean hiluma ikus daiteke, hau da almidoi granuluen hazkuntza hasten den puntua. Gainera, bere inguruan, hazkuntza eraztun amorfo eta semikristalinoak ikus daitezke.



15. Irudia. Patata granuluen hiluma eta hazkuntza eraztunak.

#### 4.1.2 Analisi termograbimetricoa

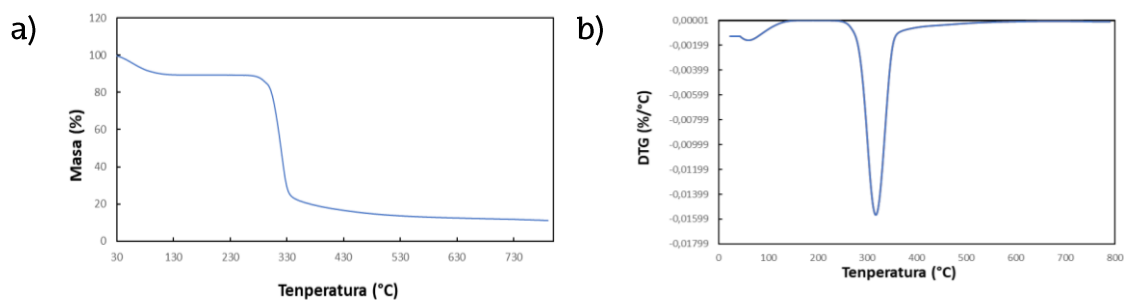
Almidoi mota bakoitzaren degradazio termikoa, TGA neurketen bidez aztertu da. Lortutako datuekin bi grafiko ezberdin irudikatu dira. Batetik, laginaren masa portzentajea tenperaturarekiko irudikatuz (TG kurba) eta bestetik, honen deribatua (DTG kurba). 16-18. Irudietan almidoi mota bakoitzaren TG eta DTG kurbak azaltzen dira, aldiz 6. Taulan hondakin portzentajeak.

Lortutako emaitzak aztertuz gero, hiru almidoi moten degradazio prozesua nahiko antzekoa dela esan daiteke. Kasu guztietan, degradazioa bi etapatan gertatzen da. Lehenengo etapa, 100 °C azpitik ematen da eta hezetasunaren galerarekin erlazionatzen da. Bigarren etapa, almidoiaren degradazioari dagokio. DTG kurbaren puntu minimoak almidoiaren degradazio tenperatura adierazten du.

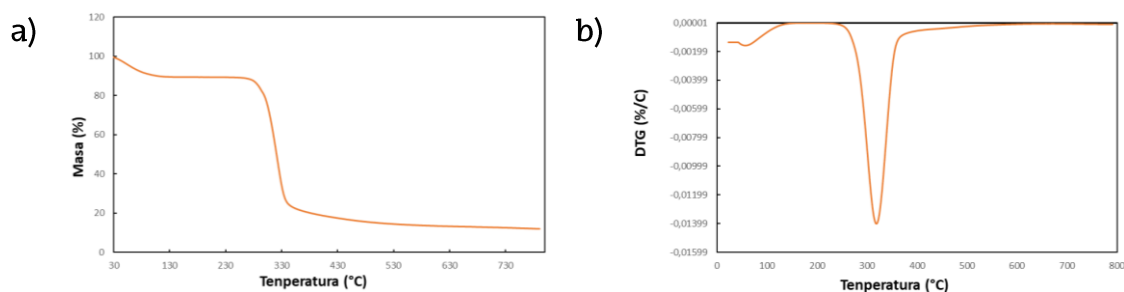
Arto almidoiaren kasuan, almidoiaren degradazio tenperatura 317 °C-koa da. Eta amaieran lortu den hondakina %11,2-koa izan da. Waxy arto almidoiaren kasuan, emaitza oso antzekoak lortu dira, hain zuzen degradazio tenperatura 318 °C-tan ematen da eta %12,0-ko hondakina lortu da. Azkenik, patata almidoiaren kasuan, degradazioa lehenago agertzen da, hain zuzen 305 °C -tan, beste almidoi motekin alderatuz tenperatura baxuagotan. Horrez gain, %14,8-ko hondakina lortu da, beste laginekin alderatuz handiagoa.

Amaierako hondakin portzentajeari erreparatuz, patata almidoiak hondakin balio handiena aurkezten duela ikusi da. Hondakin portzentajea almidoi mota bakoitzaren konposizioarekin erlaziona daiteke. Schirmer et kideek<sup>27</sup> definitu zuten bezala, patata almidoiak degradazio prozesuaren amaieran

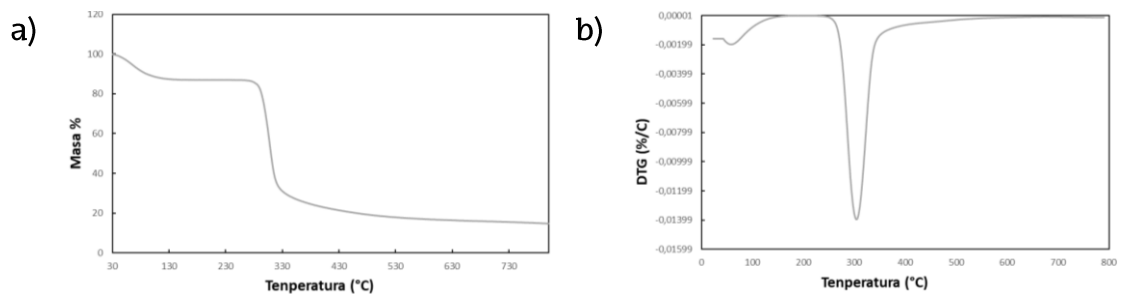
aurkezten duen hondakin portzentaje handia, patata almidoiak bere egituran duen fosforo eduki handiarekin erlazionatuta dago.



16. Irudia. Arto normalaren (a) TG eta (b) DTG kurbak.



17. Irudia. Waxy arto almidoiaren (a) TG eta (b) DTG kurbak.



18. Irudia. Patata almidoiaren (a) TG eta (b) DTG kurbak.

2.Taula. Almidoi laginen hondakin portzentajeak.

Lagina	Hondakina (%)
Arto Normala	11,2
Waxy	12,0
Patata	14,8

## 4.2 Pastillen karakterizazioa

Almidoiaren karakterizazioaz gain, kargatutako pastillen karakterizazioa burutu da. Almidoi mota ezberdinekin bezala hainbat froga ezberdin burutu dira.

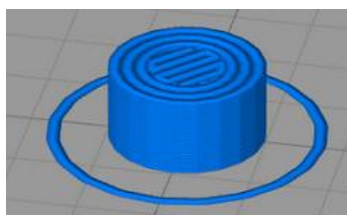
### 4.2.1 Pastillen dimentsioen neurketa

19. Irudian pastillen lorpenerako erabilitako CAD diseinua eta bere dimentsioak ikus daitezke. Neurri horietan oinarrituz, eta hiru almidoi motak erabiliz 3D pastillak inprimatu dira kloranfenikola edo atenolola gehituz. Lortutako pastilla guztiak eta bere dimentsioak 19. Irudian aurkezten dira ere.

Lehenik eta behin, osagai aktibo ezberdinak erabiltzeak ezberdintasun adierazgarriak ez dakarrela ikus daitezke. Aldiz, almidoi mota ezberdinak alderatuz gero, almidoiaren jatorri botanikoaren eragina nabariagoa dela ondorioztatu daitezke. Esaterako, arto almidoi normalean oinarritutako pastillek geometria zilindriko egokia dute eta CAD diseinuaren dimentsioetara gehien hurbiltzen direnak dira. Waxy arto almidoiaren kasuan ere, forma zilindrikoa lortu da. Patata almidoiarentzat ordea, ez da diseinuaren geometria mantendu. Azken kasu honetan, dimentsioak neurtu diren arren, ezin dira fidagarri bezala onartu.

Emaitza horiek gelatinizazio prozesuaren ondoren lortzen den gelaren propietate erreologikoekin erlazioa daitezke. Batetik, *shear thinning* izenez ezagutzen den portaerarekin erlazioa daitezke<sup>8</sup>. Materiala inprimatu ahal izateko *shear thinning* portaera eduki behar du, hau da bere likatasuna txikitu behar da zizailadura abiadura handitzean. Portaera hau txikiagoa da patata almidoiaren kasuan. Gainera, arto almidoi normala eta waxy arto almidoiaren kasuan, lortzen den likatasuna txikiagoa da eta beraz, gel horrekin lan egitea errazagoa izango da eta 3D objektua modu egokian osatuko da. Patata almidoiaren kasuan, lehen aipatutako zizaila eragina handiagoa da eta gainera, gelaren likatasuna handiak eta portaera itsaskorrak gelaren inprimaketa zailtzen du eta ondorioz, pastilla sortzerako prozesuan akatsak sor daitezke. Beraz, CAD diseinuari gehien aldentzen diren pastillak, patata almidoian oinarritutakoak izan dira.

**Erreferentzia**



**d= 10,0 mm**

**h= 5,0 mm**

	Arto Normala	Waxy	Patata
<b>Kloranfenikola</b>	 d= $9,4 \pm 0,3$ mm h= $4,8 \pm 0,1$ mm	 d= $9,0 \pm 0,3$ mm h= $4,3 \pm 0,2$ mm	 d= $10,4 \pm 0,3$ mm h= $5,8 \pm 0,2$ mm
<b>Atenolola</b>	 d= $9,1 \pm 0,2$ mm h= $4,7 \pm 0,1$ mm	 d= $9,2 \pm 0,5$ mm h= $4,6 \pm 0,1$ mm	 d= $10,2 \pm 0,2$ mm h= $5,2 \pm 0,3$ mm

19. irudia. CAD diseiuna eta almidoi mota ezberdinez osatutako pastillak.

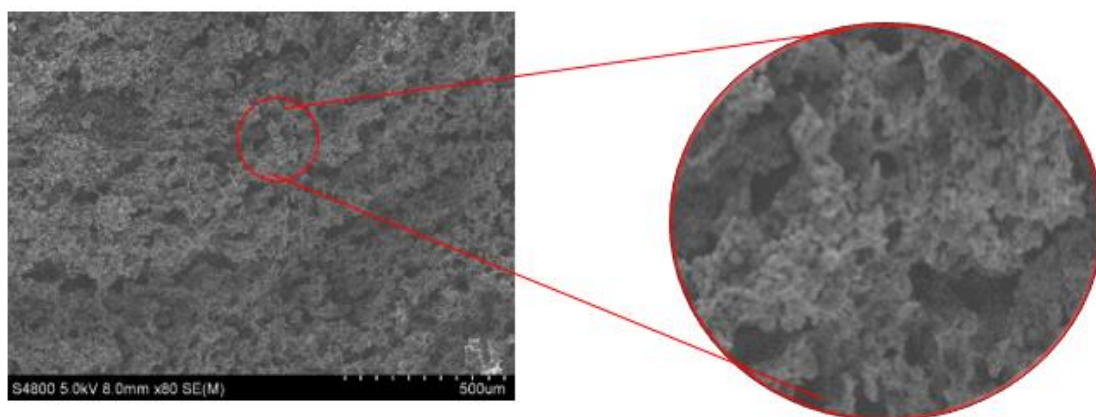
#### 4.2.2 Ekorketa bidezko mikroskopia elektronikoa

Ekorketa bidezko mikroskopia elektronikoko (SEM) irudiak, pastillen barne morfologia eta egitura porotsua aztertzeko jaso dira (ikus 20-22. Irudiak). Mikroegitura porotsu eta interkonektatu bat lortzea desiragarria da botikaren garraio eta askapena ziurtatzeko<sup>28</sup>. Horregatik, osagai aktiboaren askapen aplikazioetan oso garrantzitsua da morfologia, barne egitura porotsua eta poro tamaina aztertzea<sup>28</sup>. Arto almidoi normalaren kasuan (20. Irudia), ez da egitura porotsurik lortu. Waxy arto eta patata almidoiaren kasuan aldiz (21 eta 22. irudiak), morfologia ezberdina ikus daiteke. Izan ere, azken bi kasu hauetan, mikroegitura porotsu homogeneo eta interkonektatua lortu da.

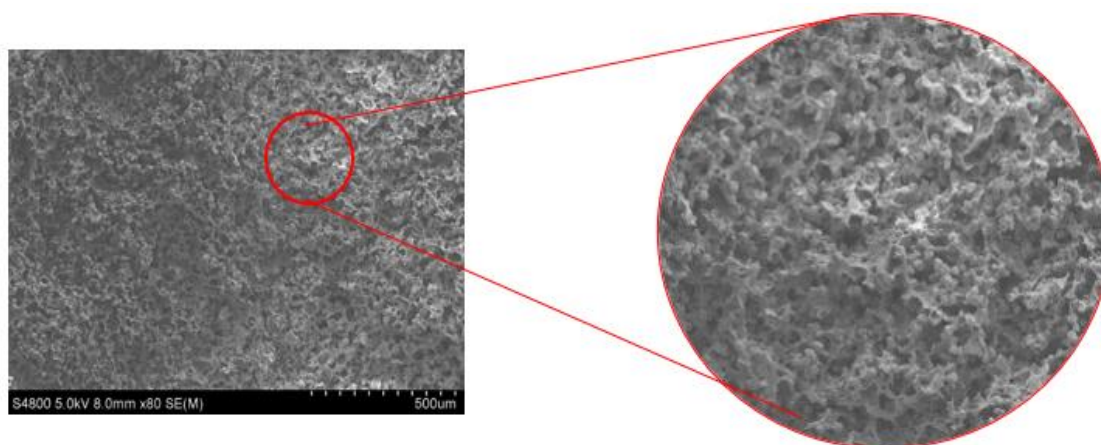
Hala ere, waxy eta patata almidoi pastillak alderatuz, ezberdintasunak antzematen dira. Poro tamainari dagokionez, patata almidoiarena poro tamaina



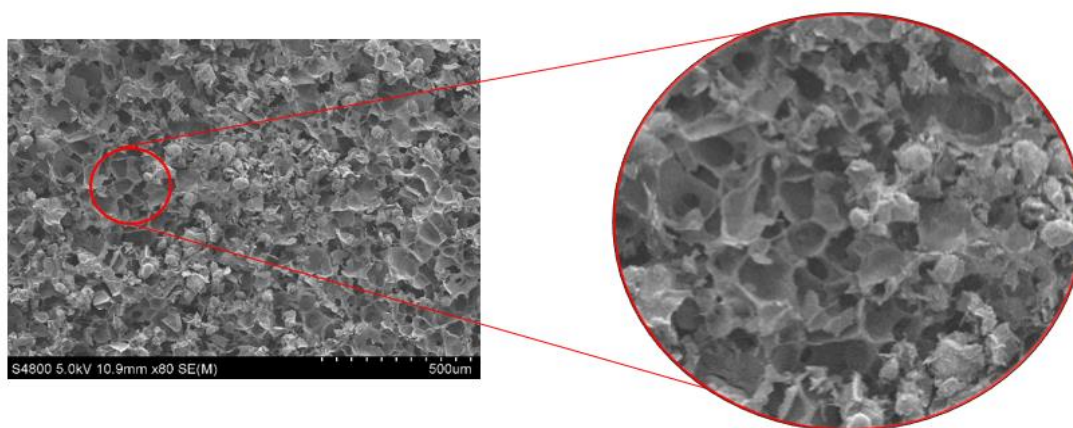
handiagoa dela ikus daiteke, zehazki 60-95  $\mu\text{m}$ . Waxy arto almidoiaren kasuan, poro tamaina txikiagoa da, hain zuzen 30-40  $\mu\text{m}$ .



20. Irudia. Arto almidoi normalaren pastillaren SEM irudia.



21. Irudia. Waxy arto almidoiaren pastillen SEM irudia.



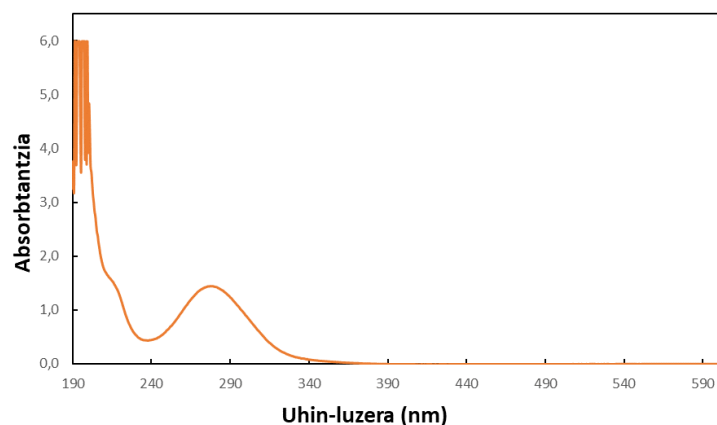
22. Irudia. Patata almidoi pastillaren SEM irudia.

## 4.2.3 Osagai aktiboaren askapenaren karakterizazioa

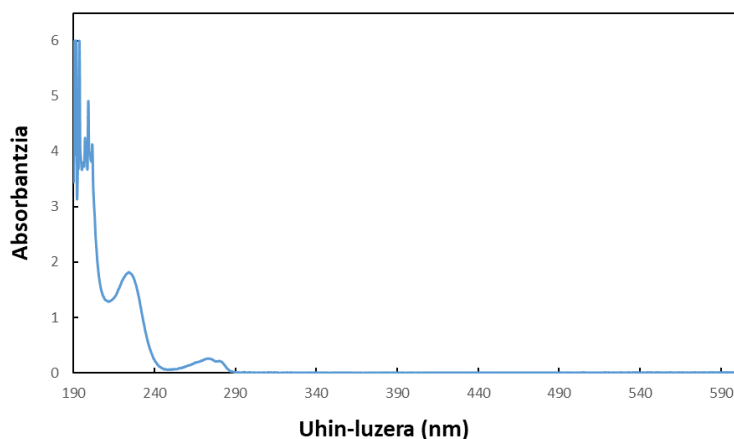
### 4.2.3.1 Metodoaren balidazioa

Osagai aktiboaren askapena aztertzeko proposatutako UV-vis espektroskopia metodoa egokia den ziurtatzeko, metodo analitikoaren balidazioa burutu da. Horretarako, linealtasuna, prezisioa, zehaztasuna, detekzio muga eta kuantifikazio muga determinatu dira.

Lehenik eta behin, osagai aktibo bakoitzaren absorbantzia maximoaren uhin-luzera zein den jakiteko kloranfenikol eta atenololaren espektroak neurtu dira (23 eta 24. Irudiak). Lortutako emaitzetan ikus daitekeen bezala, bi osagai aktiboentzat aukeratu den uhin-luzera ez da berbera izan. Osagai aktibo bakoitzak absorbantzia maximoa uhin-luzera jakin batean aurkezten du. Kloranfenikolaren kasuan, 277 nm-tan ageri da absorbantzia maximoa eta atenololaren kasuan, 227 nm-tan.



23. Irudia. Kloranfenikolaren espektroa.

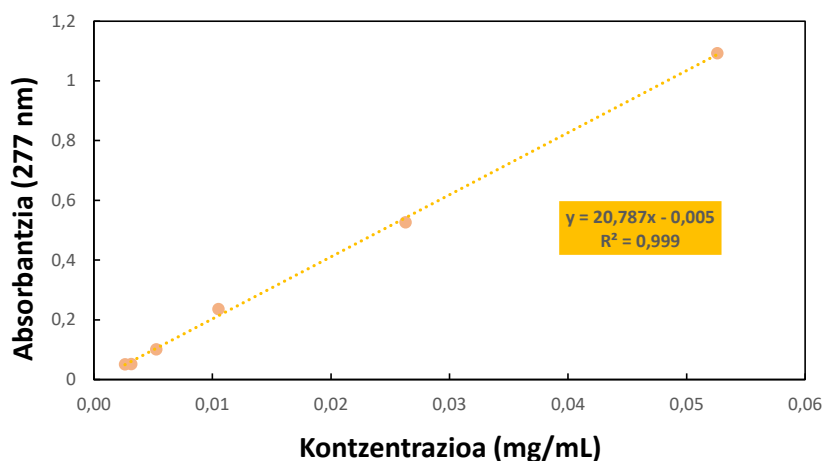


24. Irudia. Atenololaren espektroa.

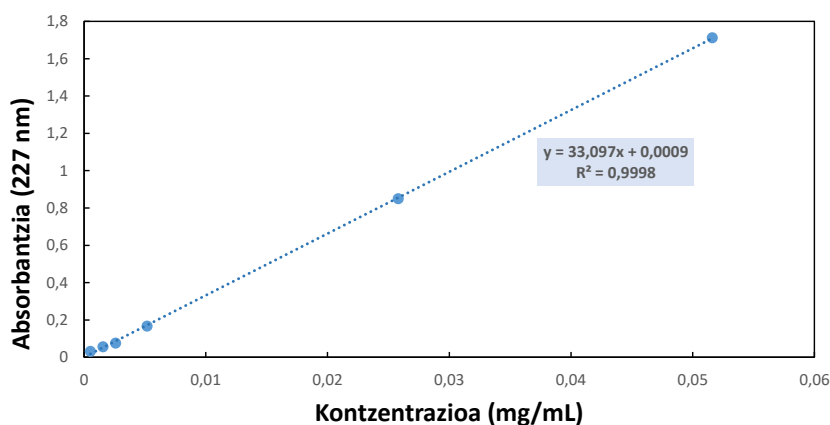
## a) Linealtasuna

Osagai aktibo bakoitzarekin hainbat disoluzio prestatu dira kontzentrazio ezberdinak erabiliz eta datu hauekin kalibrazio zuzen bat egin da, absorbantzia maximoa vs osagai aktiboaren kontzentrazioa irudikatuz. 25 eta 26. Irudietan kloranfenikol eta atenoloaren kalibrazio kurbak erakusten dira, hurrenez hurren.

Bi osagai aktiboen kalibrazio kurbei erreparaturaz gero,  $R^2 = 0,999$  eta  $R^2 = 0,9998$ -ko korrelazio koefizienteak lortu direla ikus daiteke. Ondorioz, erregresio balio aproposak lortu direla esan daiteke, bi baloreak  $R^2 > 0,999$  baitira. Beraz, aztertutako kontzentrazio tartean linealtasuna mantentzen dela ondoriozta daiteke.



25. Irudia. Kloranfenikolaren kalibrazio zuzena, 277 nm-tan.



26. Irudia. Atenololaren kalibrazio zuzena, 227 nm-tan.

## b) Zehaztasuna

Metodoaren zehaztasuna bi osagai aktiboen berreskurapena aztertuz frogatu da. Bi osagai aktiboen berreskurapenak bi kontzentrazio ezberdinetan kalkulatu dira eta honako emaitzak lortu dira (5. Taula). Kloranfenikolaren kasuan, %129 eta %120 balioak lortu dira. Emaitzak mugatik kanpo gelditzen dira, %115 baino handiagoak baitira.

Atenololaren kasuan berriz, emaitzak %100-115 artean daudenez ontzat hartuko dira.

3.Taula. Berreskurapen portzentajeak.

	Kloranfenikola	Atenolola
0,015 mg/mL	% 129 ± 2	%99 ± 2
0,030 mg/mL	% 120 ± 6	%99 ± 1

### c) Prezioia

Metodoaren prezioia RSD aztertuz frogatu da, 4. Taulan ikus daitekeen bezala, *intra-day* eta *inter-day* RSD emaitza guztientzat RSD < %10 betetzen da. %1,9 eta %1,1 *intra-day* prezio balioak lortu dira kloranfenikol eta atenololaren kasuan, hurrenez hurren. *Inter-day* prezioaren kasuan, %2,4 balioa lortu da kloranfenikolarentzat eta %3,5 atenololarentzat. Beraz, datuei erreparaturaz, erabilitako metodoa prezioa dela esan daiteke.

4.Taula. RSD portzentajeak.

	Kloranfenikola	Atenolola
<i>Intra-day</i>	% 1,9	% 1,1
<i>Inter-day</i>	% 2,4	% 3,5

### d) Detekzio eta kuantifikazio mugak

Kloranfenikola zein atenololaren LOD eta LOQ emaitzak 5. Taulan laburbiltzen dira.

Kloranfenikolari dagokionez, 0,002 eta 0,006 mg/mL-ko LOD eta LOQ balioak lortu dira, hurrenez hurren. Atenololaren kasuan aldiz, LOD=0,001 mg/mL-koa izan da eta LOQ=0,004 mg/mL.

Metodoaren balidazioaren ondorio bezala, lortutako emaitzen arabera, proposatutako metodoa kloranfenikol eta atenolol kontzentrazioak PBS ingurunean kuantifikatzeko aproposak direla ondoriozta daiteke.

5.Taula. LOD eta LOQ balioak.

	Kloranfenikola	Atenolola
LOD (mg/mL)	0,002	0,001
LOQ (mg/mL)	0,006	0,004

#### 4.2.3.2 *In vitro* askapena eta ikusgai-ultramore bidezko kuantifikazioa

Kloranfenikola eta atenoloaren askapena ebaluatzeko denbora jakin batzuetan hartutako laginen absorbantzia neurtu da. Askapena PBS disoluzioan egin da eta 37 °C-tan. Lehenengo 10 minututan, 2 minututik behin hartu dira alikuotak, hortik aurrera aldiz denbora tarteak luzatu egin dira (30 eta 60 minututara). Nertutako absorbantzia maximoak, laginaren kontzentrazioarekin erlazionatzeko kalibrazio kurbak erabili dira. 27 eta 28. Irudietan, bi osagai aktiboaren askapen profilak aurkezten dira.

Askapenean osagai aktiboak eta almidoiaren jatorri botanikoak duten eragina aztertu da. Gainera, emaitzak aztertzeko zenbait faktore kontutan hartu dira, esaterako morfologia, egitura kimikoa edo sortutako almidoi/osagai aktibo elkarrekintzak.

Kloranfenikolaren kasuan, liberazio edo askapen osoa eman da almidoi mota guztien kasuan. Nahiz eta pastilla bakoitzaren askapen denbora ezberdina izan, amaieran liberazio osoa ematea lortu da.

27. Irudian ikus daitekeen bezala, arto almidoi normalaren pastillek erakutsi dute liberazio azkarrena. Arto almidoi pastilla PBS ingurunean sartu eta denbora oso laburrean hautsi eta desegiten da eta ondorioz bat-bateko askapena lortzen da, osagai aktiboak azalera handiagoa izango baitu askapenerako. Askapen mota hau *burst* edo *flash release* izenaz ezagutzen da<sup>29</sup>. Bat-bateko askapena fenomeno desiragarria da medikuntza pertsonalizatuan, osagai aktiboaren efektu azkarra behar denenean edota pazienteek irensteko arazoak dituztenean<sup>29</sup>.

Waxy arto eta patata almidoi pastillei erreparatuz gero, pastillak PBS ingurunean bere egitura mantentzen dutela eta hausten ez direla ikusi da. Beraz, osagai aktiboaren askapena ez da bat-batekoa. 27. Irudian ikus daitekeen bezala, bi almidoi mota hauen kasuan osagai aktiboaren askapena modu kontrolatu eta jarraituan ematen da.

Hala ere, azken bi kasuetan liberazioa ez da modu berdinean ematen. Waxy arto eta patata almidoiak konparatuz, patata almidoiaren kasuan, askapena polikiago ematen dela ikusi da. TGA analisisian ondorioztatu den bezala, patata almidoiak fosforo talde eduki handiagoa du. Ondorioz, lotura indartsuagoak sortuko ditu osagai aktiboarekin eta askapena motelago ematen da<sup>30</sup>. Waxy almidoiak aldiz, ez ditu lotura sendoak sortuko, bere fosforo edukia txikiagoa delako eta beraz, bere askapena azkarragoa izango da<sup>31</sup>.

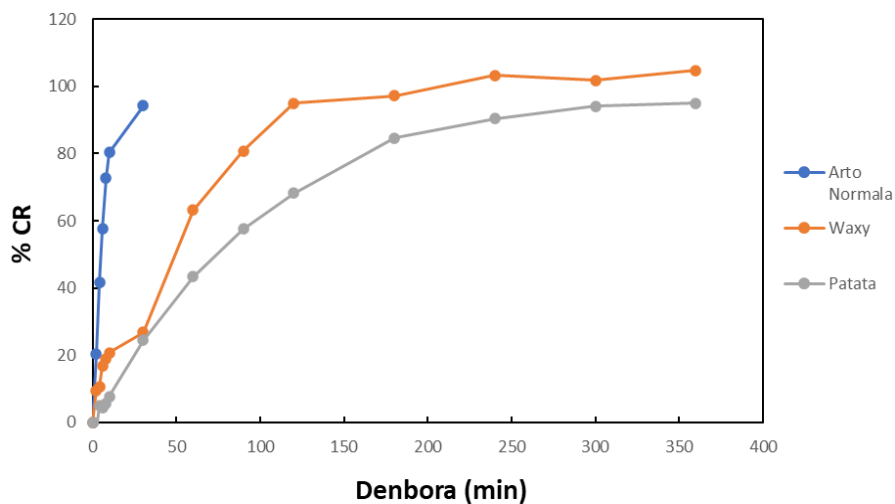
Atenololari dagokionez, 28. Irudian azaltzen den bezala, ez da askapen osoa lortu. Izan ere, osagai aktibo honen disolbagarritasuna txikiagoa da eta faktore honek askapena zaildu dezake. Horretaz gain, osagai aktiboak dituen talde funtzionalei esker, almidoi/atenolol hidrogeno zubi elkarrekintza sendoak sor daitezke askapena gehiago zailduz.

Kloranfenikolaren kasuan bezala, arto almidoi normalaren pastillek izan dute askapen azkarrena. Lehen aipatu bezala, pastilla apurtu egiten da eta beraz, osagai aktiboaren liberazio azkarra ahalbidetzen du. Era berean, waxy arto eta patata almidoiek askapen jarraitua erakusten dute. Bi almidoi mota hauek konparatuz, denbora tarte txikietan waxy arto almidoiak aurkezten du askapen azkarragoa (kloranfenikolean bezala). Hala ere, 40 minututik aurrera, patata almidoiak erakusten du askapen azkarragoa. Askapenaren hasieran, patata almidoiaren askapena motelagoa izango da, lehen aipatu bezala almidoi mota honek dituen fosforo taldeek lotura sendoak sortzen baitituzte. Hala ere, denbora jakin hori igaro ondoren beste faktore batek du garrantzia: pastillen mikroegitura porotsua. SEM irudietan ondorioztatu den bezala, patata almidoi pastillek poro tamaina handiena aurkezten dute. Poro tamaina handiagoa bada, osagai aktiboaren askapena azkarrago emango da.

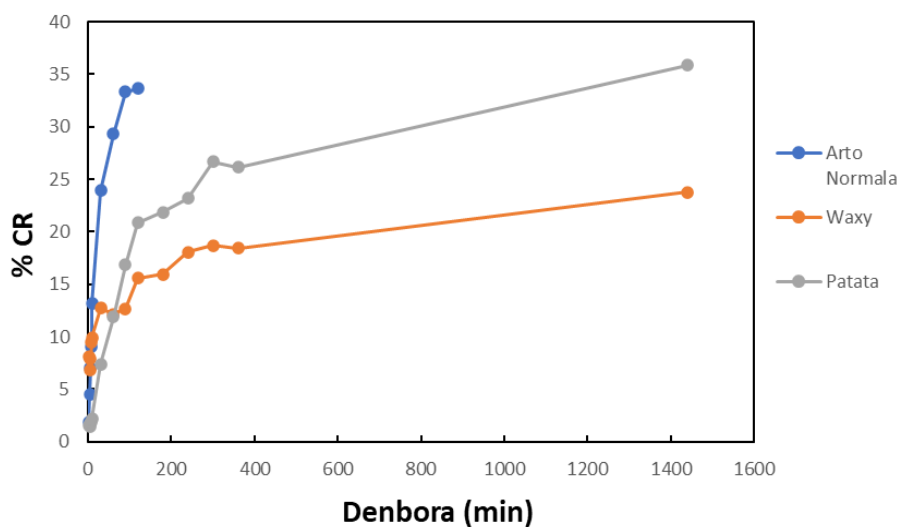
Azkenik, bi osagai aktibo eta almidoi mota bakoitzarentzat lortutako askapen profilak aztertuz, almidoian oinarritutako 3D pastillak medikuntza pertsonalizatuan eduki ditzaketen erabilgarritasuna konfirma daiteke. Almidoi mota ezberdinak erabiliz, osagai aktiboaren askapen zinetika kontrola daitekeela ikusi da. Horrela, paziente bakoitzaren beharren arabera eta kasu bakoitzean almidoi mota egokia aukeratuz, osagai aktiboaren askapen denbora pertsonaliza daiteke.

Gainera, emaitza hauek guztiek beste lan ildo berri batzuk ireki ditzakete. Adibidez, pastilla bakar batean osagai aktibo ezberdinak gehitzea, bakoitzaren askapena tokian-tokiko beharren arabera egokituz. Proposamen hau, oso

baliagarria litzateke egunean zehar pastilla ugari hartu behar dituzten pazienteentzat, pastilla bakar batean gaixotasun ezberdinen tratamenduen dosia hartzeko aukera edukiko baitzuten.



27. Irudia. Kloranfenikol osagai aktiboaren askapen profilak.



28. Irudia. Atenolol osagai aktiboaren askapen profilak.



## **5. ONDORIOAK**

---

3D inprimaketa teknikaren bidez almidoi mota ezberdinetan oinarritutako pastillak garatu dira kloranfenikola edo atenolola osagai aktibo bezala erabiliz. Karakterizazioaren ardatz nagusia, osagai aktiboaren askapenaren azterketa izan da. Askapena aztertzeko erabili den metodoa balidatu da eta lortutako emaitzen arabera, metodoa egokia dela frogatu da.

Askapen emaitzei dagokionez, alde batetik, almidoiaren jatorri botanikoaren arabera osagai aktiboaren askapen profila aldatzen dela ikusi da. Arto almidoiaren kasuan, bat-bateko askapena lortu da, baina gainerako bi almidoi moten kasuan askapena modu jarraituan eman da.

Beste aldetik, erabilitako bi printzipio aktiboen arteko ezberdintasunak antzeman dira. Kloranfenikolaren kasuan, guztizko askapena lortu da. Atenololaren kasuan berriz, bere egituraren ageri diren talde funtzionalek almidoiarekin sor ditzaketen interakzioek askapena guztizkoa ez izatea baldintzatzen dute.

Horrela, almidoian oinarritutako 3D pastillek medikuntza pertsonalizatuan eduki ditzaketen erabilgarritasuna frogatu da. Jatorri botaniko ezberdineko almidoiak erabiliz, osagai aktiboaren askapena, paziente eta beharrezko dosi ezaugarrietara egokitu daiteke.

## **CONCLUSIONS**

Tablets based on different types of starch were successfully developed by 3D printing technique using chloramphenicol or atenolol as active ingredients. The characterization was focus on the evaluation of the release of the active ingredient. The method used for this purpose was validated. The results showed that the method was reliable.

Regarding the release analysis, on the one hand, it was observed that the release profile of the active ingredient was influenced by the botanical origin of the starch. In the case of normal maize starch, a burst release was achieved, but in the case of both waxy and potato starch the release occurred in a continuous manner.

On the other hand, differences between both active ingredients were noticed. In the case of chloramphenicol, the total release was achieved. In contrast,

in the case of atenolol, the total release was hindered since the functional groups on the structure of atenolol resulted in strong starch/atenolol interactions.

Thus, it was demonstrated the applicability of starch-based 3D tablets in personalized medicine. The release of the active ingredient could be tailored for the requirements of each patient and dose using starches from different botanical origin.

## 6. ERREFERENTZIAK

---

- (1) Shivaraju, V. K., Vallayil Appukuttan, S., & Sunny Kumar, S. K. (2019). The Influence of Bound Water on the FTIR Characteristics of Starch and Starch Nanocrystals Obtained from Selected Natural Sources. *Starch/Staerke*, 71, /5–6/. doi.org/10.1002/star.201700026
- (2) Pérez, S., & Bertoft, E. (2010). The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. *Starch/Staerke* (62, (8) 389–420). doi.org/10.1002/star.201000013
- (3) Dupuis, J. H., & Liu, Q. (2019). Potato Starch: a Review of Physicochemical, Functional and Nutritional Properties. *American Journal of Potato Research* 96, (2), 127–138. doi.org/10.1007/s12230-018-09696-2
- (4) Bertoft, E. (2017). Understanding starch structure: Recent progress. *Agronomy* 7, 56-67. doi.org/10.3390/agronomy7030056
- (5) Dome, K., Podgorbunskikh, E., Bychkov, A., & Lomovsky, O. (2020). Changes in the crystallinity degree of starch having different types of crystal structure after mechanical pretreatment. *Polymers*, 12(3), 641-653. doi.org/10.3390/polym12030641
- (6) Warren, F. J., Fukuma, N. M., Mikkelsen, D., Flanagan, B. M., Williams, B. A., Lisle, A. T., Ó Cuív, P., Morrison, M., & Gidley, M. J. (2018). Food Starch Structure Impacts Gut Microbiome Composition. *MSphere*, 3(3), 1-13. doi.org/10.1128/msphere.00086-18
- (7) Zhang, X., Feng, J., Wang, H., Zhu, J., Zhong, Y., Liu, L., Xu, S., Zhang, R., Zhang, X., Xue, J., & Guo, D. (2018). Bivariate flow cytometric analysis and sorting of different types of maize starch grains. *Cytometry Part A*, 93(2), 213–221. https://doi.org/10.1002/cyto.a.23261
- (8) González, K., Larraza, I., Berra, G., Eceiza, A., & Gabilondo, N. (2022). 3D printing of customized all-starch tablets with combined release kinetics. *International Journal of Pharmaceutics*, 622, 121872-121883. doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121872
- (9) Romano, N., & Kumar, V. (2019). Starch gelatinization on the physical characteristics of aquafeeds and subsequent implications to the productivity in farmed aquatic animals. *Reviews in Aquaculture* 11, 1271–1284. Wiley-Blackwell. doi.org/10.1111/raq.12291
- (10) González, K., Retegi, A., González, A., Eceiza, A., & Gabilondo, N. (2015). Starch and cellulose nanocrystals together into thermoplastic starch bionanocomposites. *Carbohydrate Polymers*, 117, 83–90. doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.09.055
- (11) González, K., Iturriaga, L., González, A., Eceiza, A., & Gabilondo, N. (2020). Improving mechanical and barrier properties of thermoplastic starch and polysaccharide nanocrystals nanocomposites. *European Polymer Journal*, 123. doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.109415

- (12) Bikas, H., Stavropoulos, P., & Chryssolouris, G. (2016). Additive manufacturing methods and modeling approaches: A critical review. *International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 83(1-4), 389-405. doi.org/10.1007/s00170-015-7576-2
- (13) Gao, W., Zhang, Y., Ramanujan, D., Ramani, K., Chen, Y., Williams, C. B., Wang, C. C. L., Shin, Y. C., Zhang, S., & Zavattieri, P. D. (2015). The status, challenges, and future of additive manufacturing in engineering. *CAD Computer Aided Design*, 69, 65-89. doi.org/10.1016/j.cad.2015.04.001
- (14) ASTM International. (2015). Additive manufacturing-General principles-Terminology ISO/ASTM 52900:2015(E) www.iso.org/standard/69669.html
- (15) Wilt, J. K., Gilmer, D., Kim, S., Compton, B. G., & Saito, T. (2021). Direct ink writing techniques for in situ gelation and solidification. *Polymers for Additive Manufacturing Prospective*, 11, 106-121. doi.org/10.1557/s43579-020-00006-8
- (16) Raijada, D., Wac, K., Greisen, E., Rantanen, J., & Genina, N. (2021). Integration of personalized drug delivery systems into digital health. In *Advanced Drug Delivery Reviews*, 176, 113857-113876. doi.org/10.1016/j.addr.2021.113857
- (17) Zema, L., Melocchi, A., Maroni, A., & Gazzaniga, A. (2017). Three-Dimensional Printing of Medicinal Products and the Challenge of Personalized Therapy. In *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106 (7), 1697-1705. doi.org/10.1016/j.xphs.2017.03.021
- (18) Roberts, J., Power, A., Chapman, J., Chandra, S., & Cozzolino, D. (2018). The use of UV-Vis spectroscopy in bioprocess and fermentation monitoring. In *Fermentation* 4, (1) 2-8. doi.org/10.3390/fermentation4010018
- (19) Schmid, F.-X. (n.d.). *Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry*. www.els.net
- (20) Akash, M. S. H., & Rehman, K. (2019). *Ultraviolet-visible (UV-vis) spectroscopy. In Essentials of Pharmaceutical Analysis*. Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1547-7
- (21) Produktu komertzialaren fitxa teknikoa, Sigma-C0378. (n.d.).
- (22) Produktu komertzialaren fitxa teknikoa, Sigma-A7655. (n.d.).
- (23) Harris, D. C, Lucy C-A. *Análisis químico cuantitativo*. W.H. Freeman and company, 2016.
- (24) Hechhu, R., Karnakar, N., Ramana, H., Amani, P., Tharun, S., Nagaraju, M., & Sharma, S. B. (2020). Analytical method development and validation of diclofenac sodium by UV-visible spectroscopy using AUC method. *Journal of Rehabilitation Research and Development*, 7(1), 20-24.
- (25) Moosavi, S. M., & Ghassabian, S. (2018). Linearity of Calibration Curves for Analytical Methods: A Review of Criteria for Assessment of Method Reliability. In *Calibration and Validation of Analytical Methods - A Sampling of Current Approaches*. InTech. doi.org/10.5772/intechopen.72932

- (26) Ershadi, S., & Shayanfar, A. (2018). Are LOD and LOQ reliable parameters for sensitivity evaluation of spectroscopic methods? *Journal of AOAC International*, 101(4), 1212–1213. doi.org/10.5740/jaoacint.17-0363
- (27) Schirmer, M., Höchstötter, A., Jekle, M., Arendt, E., & Becker, T. (2013). Physicochemical and morphological characterization of different starches with variable amylose/amylopectin ratio. *Food Hydrocolloids*, 32(1), 52–63. doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.032
- (28) González, K., García-Astrain, C., Santamaria-Echart, A., Ugarte, L., Avérous, L., Eceiza, A., & Gabilondo, N. (2018). Starch/graphene hydrogels via click chemistry with relevant electrical and antibacterial properties. *Carbohydrate Polymers*, 202, 372–381. doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.09.007
- (29) Huang, X., & Brazel, C. S. (2001). On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. In *Journal of Controlled Release* 73, 121-136. www.elsevier.com/locate/jconrel
- (30) El-Naggar, M. E., El-Rafie, M. H., El-sheikh, M. A., El-Feky, G. S., & Hebeish, A. (2015). Synthesis, characterization, release kinetics and toxicity profile of drug-loaded starch nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81, 718–729. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.09.005
- (31) Elgaied-Lamouchi, D., Descamps, N., Lefevre, P., Rambur, I., Pierquin, J. Y., Siepmann, F., Siepmann, J., & Muschert, S. (2021). Starch-based controlled release matrix tablets: Impact of the type of starch. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 61, 102152-102164. doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102152