UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

"Propuesta de una matriz polimérica con *Echinacea purpurea* y *Propóleo* con aplicación a una formulación de parche bucal"

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

OLVERA GUILLÉN ELENA

ASESORA DE TESIS: DRA. LETICIA CRUZ ANTONIO

México DF. 2007

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

In memoriam

QFB. María de los Ángeles Vidal Millán (†)

Agradezco su tesón, dedicación y esfuerzo para la realización de este trabajo. Gracias por brindarme su amistad y confianza pero sobretodo por la dicha de haberla conocido y disfrutar de su presencia. ¡Maestra, siempre te recordaré!

A mi Asesora

Dra. Leticia Cruz Antonio

Agradezco infinitamente su disposición, confianza y entereza para continuar con este proyecto, por su capacidad para concluirlo y por los conocimientos proporcionados en los momentos decisivos. Gracias ante todo por su amistad.

A mis SINODALES

Por sus valiosas observaciones y el tiempo que dedicaron para enriquecer este trabajo.

QFB. Francisca Robles López

Dra. Leticia Cruz Antonio

QFB. Ma. de Lourdes Cevantes Martínez

QFB. Lidia Sánchez Ortiz

QFB. José Luis Balderas López

A mi madre

Lic. Hortensia Guillén, te agradezco por la vida que me has ofrecido, las enseñanzas y por no permitirme desistir.

A mi hermano

Jorge Alberto Guillén te agradezco el apoyo incondicional y por brindarme tus enseñanzas.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN 1

I. FUNDAMENTO TEÓRICO 4

A. Anatomía y Fisiología de la Mucosa Bucal 4

1. Estructura 5

a. Mucus 7

b. Encía 8

1) Constitución 8

2) Clasificación 8

3) Características 8

4) Sitio de acción 8

c. Saliva 8

2. Absorción bucal 9

3. Permeabilidad 10

B. Mucoadhesión 11

1. Definición 11

2. Ventajas y desventajas 12

3. Polímeros mucoadhesivos 14

a. Estructura química y tipos de grupos funcional 15

b. Flexibilidad 16

c. Concentración del mucoadhesivo 16

d. Tiempo de contacto inicial 17

C. Parche Bucal 17

1. Definición 17

a. Sistema unidireccional 18

b. Sistema bidireccional 18

2. Ventajas y desventajas....18
3. Métodos de fabricación....19
a. Método del disolvente....20
b. Método de difusión....20

D. Formulación....20
a. Material polimérico....20
b. Plastificantes....21
c. Principios activos....22
d. Saborizante....23
e. Edulcorante....23
f. Mejorador de absorción....23
g. Disolvente....24

E. Propiedades fisicoquímicas de los excipientes y principios activos....24
1. Carboximetilcelulosa de sodio....24
2. Eudragit NE30D....25
3. Polivinilpirrolidona....25
4. Polietilenglicol....26
5. Propóleo....27
a. Descripción....28
b. Propiedades farmacológicas....28
1) Actividad antibacteriana....29
2) Actividad antifúngica....29
3) Actividad antiviral....29
c. Composición....30
1) Composición promedio....30
a) Resinas....30
b) Ceras....30
c) Ácidos esenciales....30

d) Ácidos grasos....30
e) Polen....30
f) Compuestos orgánicos y minerales....30
d. Efectos secundarios y toxicológicos....30
e. Extracto etanólico de propóleo....31
1) Dosis....31
6. Equinácea....31
a. Descripción....32
b. Propiedades farmacológicas....32
1) Antibacteriana....32
2) Antifúngica....33
3) Antiviral....33
c. Composición....33
1) Principios activos....33
a) Aceite esencial....33
b) Equinacósido....34
c) Polisacáridos....34
d) Ácidos orgánicos....34
e) Resina....34
d. Efectos secundarios y toxicológicos....34
e. Tintura de equinácea....34
1) Dosis....35
f. Método cromatográfico....35
7. Anís....35
8. Menta....36

F. Disolución....37
1. Definición....37
2. Factores que influyen en la velocidad de disolución....38

3. Equipo de disolución....39
a. Celda de Franz....40

G. Metodología experimental para los estudios de permeación bucal....41
1. Estudios *in vitro*....41
2. Estudios *in vivo*....42
3. Especies de animales experimentales....43

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA....45

III. OBJETIVOS
A. General....47
B. Particulares....47

IV. HIPÓTESIS....48

V. METODOLOGÍA....48

VI. RESULTADOS....72

VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS....85

VIII. CONCLUSIONES....104

IX. PROPUESTAS O RECOMENDACIONES....106

X. ANEXOS....107

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS....126

INTRODUCCIÓN

Los productos farmacéuticos que se encuentran en el mercado dirigidos a la cavidad bucal generalmente se dirigen a la higiene o la estética bucal (blanqueamiento dental) pero pocos se enfocan en reducir la presencia de microorganismos causantes de diversas enfermedades bucales.

La composición de los productos bucales en el mercado no cubren los requisitos necesarios para prevenir y reducir los problemas bucales. Por lo cual, se pretende obtener un producto con acción antibacteriana, antifúngica y antiviral que satisfaga las necesidades de los pacientes, el producto debe cumplir su efecto farmacológico reduciendo la placa dentobacteriana, gingivitis, candidiasis u otras enfermedades relacionadas.

Algunos factores hacen a la mucosa de la cavidad oral un sitio muy atractivo y posible para la liberación del fármaco, por ejemplo que la mucosa bucal es relativamente permeable con un suministro rico en sangre, muestra tiempos cortos de recuperación después del estrés o daño y la falta virtual de células Langerhans hace a la mucosa oral tolerante al potencial alérgeno. Además, las rutas para la administración sobre la mucosa oral ofrecen distintas ventajas que incluye el desvío del efecto del primer paso.

La tecnología de los parches bucales es relativamente reciente y su diseño está muy vinculado a la utilización de polímeros. Esta área se ha desarrollado debido al conocimiento de nuevas sustancias poliméricas que son la base en la formación de sistemas matriciales. El sistema está diseñado de tal modo que el fármaco que se va liberando sea simultáneamente absorbido a través de la mucosa bucal para que el tiempo de contacto sea breve. Así, el parche bucal ofrece una fácil aplicación comparado con otros sistemas bucales (barnices, tabletas o gomas

bucales), tal que, esta forma farmacéutica resulta ser más cómoda y se obtiene un producto más conveniente y atractivo para el paciente.

La industria farmacéutica continuamente genera la presencia de formas innovadoras de dosificación que cumplan con los requisitos y necesidades de los consumidores para que éstos obtengan mayores ventajas.

La búsqueda de novedosas formas de administración que sugieran un claro beneficio para el paciente pero que al mismo tiempo la vía de administración sea más agradable, se optimice la actividad terapéutica y se logren reducir el número de tomas por día.

En consecuencia, al formular el parche bucal, se establece implícitamente un intento por obtener una dosis única o que los intervalos de tiempo de administración sean cada vez más amplios.

El parche bucal mucoadhesivo favorece al paciente debido a que su aplicación es sencilla y la ruta oral es quizás la preferida por el paciente y ofrece ventajas respecto a la dosificación. Las ventajas más importantes son que la dosis administrada se absorbe rápidamente y el parche se adhiere adecuadamente a la mucosa y la presencia de un coadyuvante natural: la saliva, que no destruye ni elimina los principios activos, al contrario permite la liberación óptima del mismo. Así, la mucosa oral es considerada como un sitio potencial para la administración del fármaco.

El tratamiento más común para eliminar la placa bacteriana es mediante el uso de cremas dentales, geles o enjuagues. El uso de parches bucales no promueve la eliminación de las formas farmacéuticas mencionadas, sólo que el parche probablemente es más efectivo y específico que los productos convencionales.

Actualmente se reconsideran las propiedades farmacológicas de plantas medicinales milenarias con la finalidad de obtener mayores beneficios y se considera que la composición de productos bucales comerciales no cubren los requisitos necesarios para cuidar apropiadamente la cavidad bucal.

Existen estudios que revelan la eficacia de los extractos de propóleo en cremas dentales probando su actividad antibiótica, antiinflamatoria, cicatrizante y la inhibición de bacterias aerobias Gram (+) y Gram (–) e incluso de anaerobias. Respecto a equinácea se ha demostrado su actividad como inmunoestimulante y cicatrizante.

El propóleo se destaca por su acción antimicrobiana, comportándose como agente bacteriostático y bactericida, además de su acción analgésica, cicatrizante y antiviral. En el tejido dental es regenerativo, anestésico y cicatrizante por estas propiedades se recomienda para la aplicación bucal.

Por otra parte, la equinácea tiene una acción inmunoestimulante, presenta actividad antiviral, cicatrizante, genera la epitelización sobre la mucosa o tejidos dañados, previene infecciones y es útil en el tratamiento de heridas, llagas, quemaduras o en trastornos inflamatorios.

En el presente trabajo se prepararon doce matrices poliméricas conteniendo equinácea y propóleo como ingredientes activos y se evaluaron sus características organolépticas. Después de seleccionar a las películas poliméricas con las mejores características se procedió con la evaluación de la liberación *in vitro* de ambos ingredientes activos a través de la prueba de disolución.

Para realizar dicha prueba se empleó una celda de Franz modificada y se estimó la eficiencia de disolución. Con la finalidad de analizar y diferenciar entre las matrices poliméricas se contrastaron los perfiles obtenidos.

I. FUNDAMENTO TEÓRICO

A. Anatomía y Fisiología de la mucosa bucal

La cavidad oral se reviste con membranas mucosas con un área de superficie total de 100 a 200 cm^2, por lo cual se ha aprovechado como sitio para la liberación del fármaco.[1, 2, 3]

Es posible observar algunas áreas distintas, las membranas mucosas de la cavidad oral se pueden dividir en cinco regiones: el fondo de boca (sublingual), mucosa bucal (mejillas), gomas (gingiva), mucosa palatal y el revestimiento interior de los labios.[1, 3] Estas regiones de mucosa oral son diferentes en términos de la anatomía, permeabilidad del fármaco y su habilidad de retener un sistema o dispositivo durante un plazo de tiempo deseado.[3]

La mucosa oral se puede clasificar en sublingual, gingival y bucal. Los tejidos de la mucosa oral se componen de un epitelio multiestratificado cubierto con mucosa.[4] Morfológicamente la mucosa bucal está constituida por un epitelio de recubrimiento y por un tejido conectivo laxo que lo sostiene y nutre, llamado lámina propia o corium.[4, 5] La lámina propia o basal conecta el epitelio al estrato del tejido conectivo. La mucosa oral protege al cuerpo de influencias externas, tales como la entrada de sustancias potencialmente peligrosas.[1]

El epitelio queratinizado se encuentra en al menos la mucosa masticatoria flexible de la gingiva y la parte del paladar duro. Este epitelio se caracteriza por ser resistente químicamente. El epitelio no queratinizado (flexible) forma el revestimiento distensible del paladar suave, el fondo de la boca, labios y mejilla. El espesor puede ser variable a causa de la presencia de hendiduras del tejido conectivo (papilas), cuyo rango va de 10 a aproximadamente 50 capas celulares

para el epitelio bucal y simultáneamente separan la superficie del tejido conectivo.[1] Los epitelios bucales son planos por la apariencia de sus capas más superficiales.[4, 6]

El tejido conectivo está formado por abundantes fibras colágenas, fibroblastos, vasos sanguíneos y anexos como pudieran ser las glándulas salivales menores y las glándulas sebáceas (Gránulos de Fordyce). La unión entre tejido conectivo y epitelio es a través de medios físicos y químicos, a través de sustancias proteícas cementantes con una gran capacidad de intercambios iónicos como laminina, epiligrina y moléculas de adhesión extracelular que ofrecen unión a integrinas de las células de la capa basal epitelial.[4]

La mucosa tiene un suministro rico en sangre y es relativamente permeable.[8, 9] Al evaluar la liberación del fármaco, se deben considerar la estructura y el ambiente de la mucosa oral. En el desarrollo de los métodos experimentales se debe establecer un análisis cuantitativo para evaluar la permeabilidad, la absorción o valorar al fármaco bucal. [9] La cavidad oral se ha preferido ampliamente como un sitio potencial local y de liberación sistémica para agentes terapéuticos.[11] Desde entonces, el esfuerzo substancial se ha enfocado en la absorción del fármaco en cierta región de la cavidad oral, esencialmente la mucosa.[3]

1. ESTRUCTURA

La mucosa oral se compone de una capa exterior de epitelio estratificado escamoso, debajo se encuentra la lámina propia seguida por la submucosa como la capa profunda, como se muestra en la Fig. 1. El epitelio escamoso estratificado que se encuentra en la mucosa bucal, tiene una capa basal celular que es activa mitóticamente; desarrollado por numerosas y diferenciadas capas intermedias a las capas superficiales, donde las células se desplazan hacia la superficie del

epitelio. El epitelio celular de la mucosa bucal es aproximadamente de 40-50 capas de células gruesas, mientras que el epitelio sublingual contiene menos.[9]

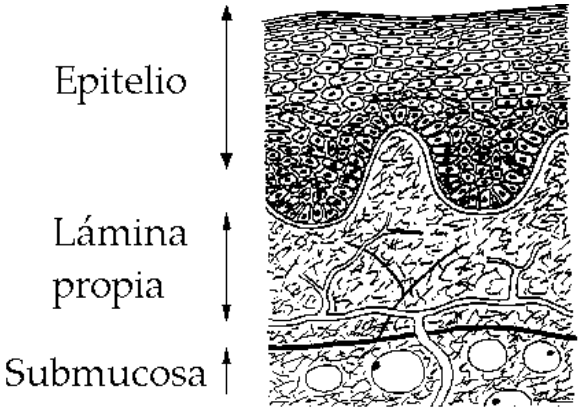


Figura 1. Estructura de la mucosa oral.[9]

El tiempo en el que se renueva el epitelio bucal se ha estimado en 5-6 días,[9] lo que le confiere el término: descamativo, ya que describe el alto índice de renovación celular, las células "viejas" que se descaman son constantemente y aceleradamente reemplazadas. De tal forma que el epitelio de la mucosa bucal es estratificado, plano y descamativo, pudiendo ser también queratinizado.[4]

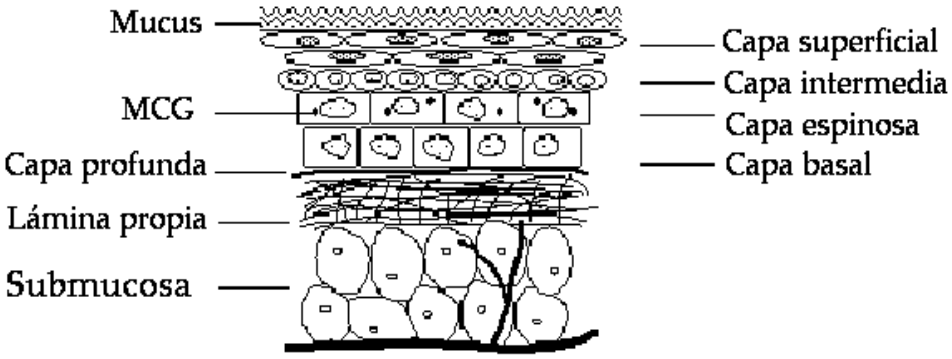


Figura 2. Representación esquemática de la estructura fisiológica de las capas bucales.[26]

El espesor de la mucosa oral varía dependiendo del sitio, la mucosa bucal posee un espesor de 500-800 μm, mientras el espesor de la lámina propia, el fondo de la boca y el surco gingival aproximadamente 100-200 μm,[9] las diferentes capas se muestran en la Fig. 2.

a. Mucus

El mucus es una secreción viscosa, translúcida que forma una capa continua, delgada y adherente en la superficie de la mucosa epitelial, cuyo espesor varía desde 50 a 450 μm en humanos.[12] El mucus es un polímero natural polidisperso constituye entre 0.5 y 5% de la secreción de mucus hidratada completamente. El tamaño de la molécula intacta es aproximadamente 1.8×10^6 unidades.[13] Los principales componentes del mucus son las mucinas,[12] las glicoproteínas de alto peso molecular [13] y algunos carbohidratos.[9, 12] El mucus es sintetizado por células especializadas de secreción mucosa como las células esféricas.[9]

El mucus es constante o intermitentemente secretado y la cantidad de secreción.[13] Constantemente se renueva y se establece un equilibrio dinámico entre la cantidad continuamente secretada por las células y la pérdida por acción mecánica, proteólisis o por la solubilización de las moléculas de mucina que, con carácter temporal, forma capas externas a las de gel adherente al mucus. [12] Porque la mucina es el componente de mayor implicación en los fenómenos de adhesión.[12] A pH fisiológico, el mucus puede formar una estructura fuertemente cohesiva en gel que se ligará a la superficie celular epitelial como una capa gelatinosa.[9]

Las funciones fundamentales del mucus son la lubrificación y la protección de las células epiteliales subyacentes de agresiones de tipo mecánico o químico[7, 12, 13] y de la degradación bacteriana.[12]

La composición exacta del mucus así como el espesor de la capa mucosa varían considerablemente dependiendo de la especie, la ubicación anatómica y del estado fisiopatológico; factores a considerarse en el diseño de la forma mucoadhesiva.[12, 13]

b. Encía

La encía o gingiva es una zona de la mucosa masticatoria. La encía es la parte de la mucosa bucal que cubre las coronas de los dientes no erupcionados y rodea los cuellos de los dientes no erupcionados y erupcionados sirviendo como estructura soporte para los tejidos subyacentes. Participa en la protección de las estructuras dentarias debido a la gran variedad y cantidad de microorganismos presentes en la cavidad oral.[8]

1) Constitución. La encía es de color rosado claro y se une a la mucosa alveolar. Su parte menos adherida, que es la encía libre se une a la encía sujeta al surco gingival. La encía libre tiene un aspecto liso que puede ser brillante u opaco cuando disminuye su queratinización. La banda marginal sinuosa es la encía marginal y el área interproximal es la encía interdentaria.[8]

2) Clasificación. Existen 3 tipos de encía: libre, insertada e interdentaria.

3) Características. La encía presenta color (rosa ó coral), tamaño, contorno, consistencia, textura y queratinización. [8]

4) Sitio de acción. Dentro de la mucosa de la cavidad oral, la liberación del fármaco se clasifica en tres categorías: sublingual, bucal y local.[9]

c. Saliva

Otra característica del ambiente de la cavidad oral es la presencia de la saliva producida por las glándulas salivales.[9] La saliva es el fluido protector para todos los tejidos de la cavidad oral, ya que protege a los tejidos suaves de la abrasión[9, 87] causada por materias ásperas y por sustancias químicas. Es un fluido acuoso con 1% de materias orgánicas e inorgánicas, produce la mineralización continua del

esmalte dental después de la erupción y ayuda en la remineralización del esmalte en las etapas tempranas de caries dental.

La composición salival depende de la velocidad de flujo, el cual se modifica dependiendo de tres factores: la hora del día, el tipo de estímulo y del grado de estímulo. El rango del pH salival es de 5.5 a 7, éste depende de la velocidad de flujo, porque la alta velocidad de flujo y el aumento de concentración principalmente de bicarbonato de sodio incrementan el pH. El volumen salival diario es de 0.5 a 2 L y causa la hidratación de la mucosa oral.[9]

En consecuencia, la selección de matrices poliméricas hidrofílicas como vehículos para sistemas de liberación del fármaco transmucoso reside en la abundante humedad del ambiente de la cavidad oral.[9] Por lo cual, la presencia del medio acuoso favorece que la polivinil alcohol (PVA) forme una solución viscosa y facilite el hinchamiento para la liberación del fármaco.[82]

2. ABSORCIÓN BUCAL

La mucosa bucal presenta una barrera para la permeación del fármaco, la eficacia de esta barrera y la absorción bucal se puede evaluar *in vivo*.[1]

Sin embargo, varios factores limitan la absorción de fármacos a través de la mucosa oral, incluyendo la exposición de la mucosa al flujo salival y la producción de la fuerza cortante debido al movimiento de la lengua y al tragar, además del desplazamiento y adherencia del vehículo.[15] También, en algunos estudios previos han demostrado que la absorción bucal a través de la mucosa oral se modifica con un pH cambiante.[16]

La eliminación del fármaco del sistema de liberación no debe evaluarse debido al transporte a través de la mucosa bucal, ya que algunos factores como la merma

al tragar, la absorción a través de otras partes de la cavidad oral, la acumulación y redistribución lateral dentro del epitelio, o aún la biotransformación intramucosa, puede contribuir a la eliminación del fármaco.[1]

3. PERMEABILIDAD

Las capas superficiales del epitelio bucal representan la barrera primaria a la entrada de sustancias del exterior. La barrera primaria epitelial debe ser cruzada por las moléculas del fármaco para atravesar el sitio de acción.[6] Se estima que la permeabilidad de la mucosa bucal es de 4 a 4000 veces mayor que la de la piel, [7, 9] el valor reportado depende de la región de la cavidad oral.

La barrera de permeabilidad bucal se compone de la capa de mucus,[14] la acumulación de lípidos y glicolípidos neutrales en los espacios intercelulares de las capas celulares "superficiales".[6] Actualmente se considera que la barrera de permeabilidad en la mucosa oral es el resultado del material intercelular derivado de los gránulos de revestimiento de la membrana (MCG).[3, 9, 18]

A pesar de esta barrera, se consideró la existencia del flujo sanguíneo, el cual generó la certeza de que es un excelente sitio para la liberación del fármaco. [27]

Por otra parte, la disminución de la permeabilidad se basa en el espesor y el grado relativos de queratinización de estos tejidos.[9] Además, se vencen efectivamente las propiedades de la barrera, si la ruta no polar implica la división de las moléculas lipofílicas dentro de la doble capa lipídica de la membrana plasmática o dentro de los lípidos de la matriz intercelular y la ruta polar implica el pasaje de las pequeñas moléculas hidrofílicas a través de poros acuosos dentro de la membrana plasmática de células individuales o de los canales iónicos en los espacios intercelulares. Aunque la ruta polar puede ser comparada con la ruta

paracelular y la ruta no polar a la ruta transcelular, esta representación alternativa no limita el transporte del fármaco a un sólo proceso intercelular o intracelular. [10]

En consecuencia**,** la baja permeabilidad produce una gran limitación para el desarrollo de la forma farmacéutica bucal, pero puede ser modificada por el uso de mejoradores de absorción.[1] También se ha reportado que el pH tiene efecto sobre la permeación del fármaco a través de la mucosa oral, por lo que se sugiere un pH neutro. [16]

B. Mucoadhesión

1. DEFINICIÓN

Generalmente en el lenguaje especializado los términos de bioadhesión y mucoadhesión parecen ser utilizados indistintamente, sin embargo los términos pertenecen a fenómenos distintos.[21]

La **bioadhesión** es la capacidad de un material biológico o sintético para pegarse o adherirse sobre la epidermis.[20, 18] Es el fenómeno en el que dos materiales, por lo menos uno de naturaleza biológica, se mantienen unidos por períodos prolongados de tiempo por fuerzas intersuperficiales.[21] Las propiedades del sistema bioadhesivo se basan en que las fuerzas interatómicas o intermoleculares establecen un enlace adhesivo a la superficie de la piel, pero depende de una buena humectación.[20]

La **mucoadhesión** se ha definido como la habilidad de una macromolécula sintética o natural para adherirse a un tejido biológico, que puede ser una superficie epitelial, al revestimiento de la capa de mucus o sobre el tejido. En la mucoadhesión se consideran las interacciones adhesivas con alguna sustancia biológica o biológicamente derivada y el uso del mucus implicado en el enlace o la unión a la superficie mucosa.[21]

Es un fenómeno muy complejo que depende de las propiedades del polímero, del tejido biológico y del ambiente circundante.[85] Se ha demostrado que las propiedades de superficie del substrato[36] llegan a influir significativamente en la interacción polímero-substrato, tales como la fuerza de adhesión, la prolongación del tiempo de adhesión y la dureza adhesiva.[20] Las propiedades mucoadhesivas del polímero incluyen los enlaces de hidrógeno, la energía de superficie, el ángulo de intercontacto, la cadena polimérica de interpenetración y la velocidad de hinchamiento del polímero que actúa recíprocamente con piel o mucina. [21]

A las formas de administración que se sujetan a las mucosas se les denominan mucoadhesivas, siendo su objetivo mantenerse adheridas en el lugar donde se realiza la liberación y /o la absorción del fármaco prolongando el tiempo de permanencia, a pesar de que las condiciones naturales se oponen.[12]

La adhesión del material polimérico a la mucosa es resultado de los siguientes pasos: hidratación del polímero, humedad de la mucosa, la difusión ligada al mucus y/o a la sustancia química unida a las glicoproteínas.[2, 12]

Un polímero se hidrata al estar en contacto con el mucus cuando las fuerzas interatómicas e intermoleculares ocurren a nivel intersuperficie. La formación de la película se manifiesta por el contacto líquido–sólido y una buena humectación.[2]

2. VENTAJAS Y DESVENTAJAS

Recientemente, la liberación del fármaco a través de la mucosa bucal se ha preferido sobre la ruta oral tradicional.[10] Las formas mucoadhesivas cuentan con ventajas que apoyan su creciente interés:

- Los lugares potencialmente aptos para la aplicación de mucoadhesivos incluyen la cavidad bucal, que ofrecen una capa externa mucosa.[12]

- La vía de administración produce efectos terapéuticos sistémicos o localizados.[12]

- Comodidad de la vía de administración y una colocación especifica.[24]

- En relación con las características fisicoquímicas del fármaco es posible presentarlo en diferentes formas farmacéuticas mucoadhesivas adaptadas a la vía de administración óptima (oral) para dar respuesta a las necesidades terapéuticas del paciente.[12]

- Para el paciente es una vía de administración agradable, no es agresiva[16] y se acepta fácilmente[3] porque la aplicación es para ambos sexos.[25]

- La región bucal es muy adecuada para un sistema mucoadhesivo a causa de su superficie relativamente inmóvil y lisa, así como su accesibilidad.[26]

- La posibilidad de modificar la barrera de permeabilidad con aditivos, es fundamental la selección del mejorador de absorción apropiado.[16]

- Esta ruta está bien vascularizada con venas drenando la sangre de la mucosa bucal directamente al corazón a través de la vena yugular interna. [14, 24]

- En la mucosa bucal no se produce irritación [1, 16] y se recupera rápidamente después del daño local, si éste llegara a suceder.[3]

- Se evitan el efecto del primer paso, el metabolismo hepático, la degradación gastrointestinal, [1, 14, 17, 25, 27] y/o la degradación enzimática. [2, 3, 5, 16, 24,28, 35]

- La mucoadhesión se sugiere especialmente para los fármacos que tienen baja solubilidad, bajo peso molecular y baja biodisponibilidad.[2]

- Robustez de la mucosa. [2, 3, 24, 26]

- La mucoadhesión es excelente propuesta para una terapia de corta duración.[5]

- Las formulaciones mucoadhesivas se puede proponer como una herramienta terapéutica innovadora contra las enfermedades y molestias bucales. [29]

El proceso mucoadhesivo presenta algunas restricciones o limitaciones, las cuales son algunas desventajas:

- La mucosa bucal al igual que la piel actúan como una barrera fisiológica para prevenir la absorción de sustancias químicas exógenas.[10]

- Existe un rápido movimiento de la capa de mucus. [10] y existe una secreción salival constante. [26, 30, 29]

- No se puede efectuar la ingestión alimenticia durante la aplicación.[26]

- Depende del pH local. [26]

- La fuerza cortante producida por la lengua no cesa.[31]

- Las propiedades físicas de las formulaciones poliméricas como la velocidad de hidratación y propiedades reológicas tienen un alto impacto sobre la mucoadhesión y consiguientemente sobre el tiempo de retención.[26]

- Se puede ocasionar la pérdida de la adhesión por hidratación excesiva o por la dilución de grupos funcionales disponibles entre el mucoadhesivo – mucus. [26]

3. POLÍMEROS MUCOADHESIVOS

La forma farmacéutica mucoadhesiva depende de las propiedades que le confiere la matriz polimérica, la mayor ventaja que le otorga es que el fármaco se encuentra inalterado, por lo tanto, su absorción, distribución, metabolismo y excreción no presenta alguna modificación respecto al fármaco original.

Una matriz polimérica es un sistema en el cual el fármaco se encuentra disperso en un polímero que actúa como un dispositivo que controla la liberación del fármaco dado que, el polímero únicamente actúa como vehículo.[33] Las características que la matriz polimérica proporciona son: adhesión, hinchamiento y eficiencia para la liberación del fármaco; del mismo modo estas características dependen de los componentes que la integran.[30, 18]

El sistema mucoadhesivo debe sus propiedades a la inclusión de uno o varios tipos de moléculas poliméricas que, en condiciones apropiadas, son capaces de establecer interacciones con la superficie biológica.[26] Este sistema se puede aplicar sobre la mucosa en forma seca, debido a que inmediatamente se produce el proceso de hinchamiento, el cual garantiza la adhesión.[34]

Los polímeros mucoadhesivos se han probado exitosamente en membranas mucosas con una variedad de agentes terapéuticos.[30] El polímero mucoadhesivo ideal debe ser seguro (baja toxicidad), buena solubilización, compatible con el fármaco y si es posible barato. [2, 99] Además, debe favorecer la flexibilidad de la cadena polimérica para la obtención del enlace mucoadhesivo.[15, 18]

a. Estructura química y tipo de grupos funcionales

La difusión sobre el mucus de algunos grupos funcionales y la presencia de enlaces químicos secundarios (iónico y puentes de hidrógeno) producen el enlace

mucoadhesivo.[30, 18] Los grupos funcionales disponibles sobre la superficie mucoadhesiva que favorecen la adhesión incluyen a los hidroxilos, carboxilos, aminas y amidas.[15] Los polímeros aniónicos se prefieren debido a que la mucina está cargada negativamente a pH fisiológico.[15, 26]

El polímero mucoadhesivo debe tener un peso molecular crítico, la longitud adecuada para permitir interpenetración de la cadena, [26] densidad de cargas, composición para que las cadenas moleculares sean capaces de arreglarse a sí mismas en forma de red para desarrollar un mejor sinergismo con el mucus.[15]

b. Flexibilidad

La flexibilidad de las cadenas poliméricas es importante para la interpenetración y el entramado. Cuando los polímeros hidrófilos se entrecruzan, la movilidad de las cadenas disminuye. A mayor densidad de enlaces cruzados la longitud efectiva de la cadena que consigue penetrar en el mucus disminuye, reduciéndose la fuerza mucoadhesiva. [12, 18]

Las características moleculares requeridas para la mucoadhesión son: moléculas lineales o poco ramificadas, de alto peso molecular, con grupos funcionales hidrófilos capaces de formar puentes de hidrógeno, con cargas aniónicas intensas que se prefieren sobre policatiónicos o neutros, flexibilidad suficiente para penetrar la red mucosa y con características adecuadas de tensión superficial para la humectación del mucus.[12]

Las cargas de la red molecular del polímero facilitan la entrada de cantidad suficiente de agua que es prerrequisito para que la hidratación, el hinchamiento y expansión del gel se efectúen; facilitando movilización de las cadenas poliméricas aportando la interdifusión o interpenetración con el mucus. [12, 18]

c. Concentración del mucoadhesivo

La concentración del polímero mucoadhesivo es importante en el desarrollo de una unión intensa. Cuando el polímero se encuentra humedecido, altas concentraciones del polímero controlan la liberación de la dosis del fármaco en la formulación, pero presenta una pequeña adhesión con el mucus porque el polímero adquiere una conformación replegada no disponiendo de grupos suficientes para el establecimiento de interacciones adhesivas. Si la concentración decrece las uniones se intensifican.[12] Sin embargo, una concentración muy baja favorece la interpenetración pero la unión es inestable debido al escaso número de moléculas que penetra por unidad de volumen. [12, 21, 18]

d. Tiempo de contacto inicial

El tiempo de contacto inicial entre los mucoadhesivos y la capa mucosa afecta decisivamente la funcionalidad del sistema ya que determina la extensión de la hidratación y del hinchamiento de los polímeros de alto peso molecular con estiramiento de las cadenas poliméricas y la interpenetración con el entramado (formado por las cadenas glicoproteícas).[1, 12, 21] Fácilmente controlable cuando los mucoadhesivos se administran en las zonas bucales.[12]

C. Parche Bucal

1. DEFINICIÓN

Los parches mucoadhesivos (formas de liberación bucal), se presentan como sencillos discos adhesivos[87] o bien sistemas compuestos por láminas superpuestas, que serán convenientemente fijados a la membrana mucosa durante el tiempo deseado. [18]

Los parches bucales aseguran una dosificación más exacta del fármaco que comparada con geles y ungüentos. Las clases de fármaco empleadas en la aplicación bucal incluyen antimicrobianos, corticosteroides, anestésicos locales, antibióticos, y fármacos dentales anticaries. Las infecciones orales causadas por candidiasis requieren la terapia prolongada con agentes antifúngicos y puede ser ventajoso para liberar fármacos en forma sostenida.[37]

La tecnología de los parches bucales es relativamente reciente y su diseño está muy vinculado a la tecnología de los polímeros.[12] Los polímeros de alta viscosidad pudieran aumentar la adhesión de los parches pero tienden a causar una distribución no homogénea del polímero y/o del fármaco y se obtienen como resultado velocidades no previsibles de la liberación del fármaco.[35]

a. Sistemas unidireccionales

Este sistema está diseñado de tal modo que el fármaco que se va liberando sea simultáneamente absorbido a través de la mucosa bucal, libera el producto activo solo hacia la zona de mucosa bucal a la que está adherida consiguiendo así una actividad sistémica. Disminuyen la pérdida de fármaco en saliva mediante capas protectoras adhesivas o impermeables.[12]

b. Sistemas bidireccionales

Permiten la liberación del fármaco en dos sentidos, es decir hacia la zona mucosa ocupada por el mucoadhesivo y en dirección opuesta, hacia la cavidad oral o la saliva, permitiendo una acción localizada. Con la incorporación del fármaco a la saliva se pueden producir pérdidas sustanciales debido a la involuntaria deglución de la saliva, aunque así toda la superficie de la cavidad oral esta disponible para la absorción.[12]

2. VENTAJAS Y DESVENTAJAS

La administración de fármacos a través de la mucosa bucal como ruta alterna tiene varias ventajas que se enlistan a continuación. [27]

- La absorción de agentes terapéuticos de la cavidad oral proporciona una liberación directa de los agentes en la circulación sistémica, evitando el efecto del primer paso, el metabolismo hepático y la degradación gastrointestinal. [1, 17, 27, 14, 25]

- Comienzo rápido de la acción terapéutica, fácil administración y no es dolorosa. [1]

- Fácilmente accesible para la aplicación y/o para la eliminación del parche.[1, 24]

- Comodidad en la aplicación, atractivo de usar y aceptado por los pacientes. [31]

- Eficacia mejorada y baja toxicidad.[39]

- Fácil de fabricar. [31]

- Conformidad o conveniencia para el paciente, su presentación favorece el uso convencional. [39]

- Excelente selectividad del sitio de acción y diseño novedoso para la liberación del fármaco. [39]

- No produce irritación o posee muy baja irritación.[31]

Las posibles desventajas asociadas a esta forma farmacéutica:

- La adhesión ocurre en breve después de comenzar la hidratación y el hinchamiento, pero los enlaces formados no son muy fuertes. [26]

- La hidratación excesiva puede tener como resultado la formación resbaladiza, se forma una goma no adhesiva, una disminución en la fuerza adhesiva. Pérdida de la adhesión.[26]

- No es posible administrar al paciente inconsciente o intolerante a la dosificación oral.[35]

- Es necesario mantener la higiene bucal previa a la aplicación.

3. MÉTODOS DE FABRICACIÓN

En términos generales se puede hablar de dos métodos de fabricación:

a. Método del disolvente

Todos los materiales sólidos y el principio activo, se disuelven (empleando el disolvente adecuado), se mezclan los materiales, se moldea y se deja evaporar con o sin temperatura hasta obtenerse el parche. Las películas poliméricas se pueden formar ya sea de solución polimérica (disolvente orgánico o base acuosa) o dispersión acuoso polimérica.[40]

b. Método de difusión

Se tienen dos opciones una es que el material de temperatura de fusión más baja se funda y los componentes se disuelven en este fundido, o que todos los materiales junto con el principio activo se fundan, se mezclen, se moldeen y se dejan enfriar hasta que se obtenga el parche; considerando que este método no es aplicable a principios activos o materiales termolábiles. [33]

D. Formulación

Las variables que pueden afectar la eficacia de la película polimérica son la adhesión del substrato, la interacción entre polímero – substrato, la fuerza de la unión adhesiva y los tipos de enlaces (película – substrato). Para obtener una película polimérica de calidad, durante su elaboración se deben considerar la utilización de un solo equipo, velocidad de la evaporación del disolvente, efecto de la humedad, secado, uniformidad del espesor y la calidad de los componentes que la constituyen. [40]

1. MATERIAL POLIMÉRICO

Polímeros hidrofílicos se han empleado para mejorar principalmente las propiedades mucoadhesivas de las preparaciones bucales. Polímeros tales como: quitosano, hidroxipropilcelulosa (HPC), carbopol, hidropropilmetilcelulosa (HPMC), carboximetilcelulosa de alto peso molecular, polivinilpirrolidona (PVP), polivinil-alcohol (PVA), pectina, goma xantana, policarbofil, polímeros y copolímeros del ácido acrílico y metacrílico y poliisobutileno (PIB). [1, 38, 26,]

Existen algunos que forman hidrocoloides: goma de tragacanto, alginato sódico, gelatina, derivados de la celulosa como metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica e hidroxietilcelulosa (HEC) y se sugieren combinaciones entre ellos para obtener una mayor fuerza mucoadhesiva.[12, 24, 15, 41] Algunos polímeros sintéticos o semisintéticos son: ácido poliacrílico, derivados de polimetacrilatos[7] y de celulosa; poseen las mismas propiedades mucoadhesivas. [15]

Se ha reportado que los ácidos poliacrílicos poseen una excelente característica mucoadhesiva, la cual probablemente se debe a la formación de puentes de hidrógeno con los grupos funcionales del mucus, pero estos polímeros forman

una solución altamente viscosa que podría reducir la eficacia del tratamiento terapéutico bucal.[2]

2. PLASTIFICANTES

Como se pretende aplicar la película polimérica sobre la membrana de la mucosa bucal, se requiere obtener la flexibilidad adecuada. Para mejorar la flexibilidad de la película, se emplean diferentes plastificantes que se incorporan al material polimérico. [27] Si la película carece de la flexibilidad adecuada, será incómoda para su aplicación.

El principal aditivo empleado para mejorar las propiedades mecánicas de las matrices poliméricas son los plastificantes ya que convierte a las películas duras y quebradizas a una más flexible, incluso la forma más dura. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que el plastificante también puede modificar la permeabilidad del fármaco a través de la membrana porque el agente plastificante puede debilitar las fuerzas intermoleculares entre las cadenas poliméricas, aumentado los espacios libres. Así, la permeabilidad del fármaco se modifica por la adición de plastificante. [42]

Desde una perspectiva molecular, el plastificante penetra en el polímero y aumenta el espacio libre entre las cadenas del polímero disminuyendo las fuerzas intermoleculares acumulativas por las cadenas del polímero. Para ser compatible, el plastificante debe ser miscible con el polímero y debe tener las fuerzas intermoleculares semejantes en el componente. En general, el plastificante más efectivo posee fuerzas intermoleculares similares a las que contiene el polímero.[43]

3. PRINCIPIOS ACTIVOS

Los fármacos sintéticos exhiben algunas diferencias significativas respecto a los productos herbales. Los productos herbales se elaboran con plantas

medicinales. En las plantas medicinales, frecuentemente los principios activos son desconocidos, la estandarización, el control de calidad y la estabilidad se controlan con ensayos de doble ciego. Los principios activos de los productos herbales son analizados por su acción farmacológica y pueden ser sustancias simples (alcaloides) o bien mezclas complejas (resinas o aceites esenciales).[23, 64]

Los compuestos más comunes son los azúcares y heterósidos que pueden ser glucósidos y galactósidos. Otros componentes activos de las plantas son alcaloides, lípidos, gomas, mucílagos, principios amargos, taninos, aceites esenciales, resinas, bálsamos, oleorresinas, ácidos orgánicos, enzimas y vitaminas.

Los principios activos de medicamentos herbales poseen fácil disponibilidad, tienen gran variedad de uso terapéutico y son adecuados para tratamientos crónicos. Los estudios toxicológicos demuestran su seguridad, la frecuencia de efectos indeseables parece menos usual y generalmente cuestan menos que los fármacos sintéticos o semisintéticos.[44]

4. SABORIZANTE

Aditivo de origen natural o artificial que generalmente contiene sustancias volátiles, las cuales aportan una etapa cálida, favorecen la humedad bucal y le confiere un olor agradable. Los saborizantes se emplean en la industria farmacéutica para enmascarar algún sabor desagradable o para conferirle un sabor agradable a sustancias insípidas. [51]

5. EDULCORANTE

Edulcorante artificial es cualquier sustancia sintética desarrollada que se utiliza en alimentos y productos farmacéuticos para proporcionar un sabor dulce. Los alcoholes de azúcares se usan como edulcorantes, son derivados de azúcares

naturalmente presentes en algunas frutas y se fabrican por reducción química de éstas. Una ventaja que poseen los alcoholes de azúcares es que no favorecen el crecimiento de las bacterias causantes de la caries dental.[45] Entre ellos están el sorbitol (procedente de la glucosa), el dulcitol (galactitol y galactosa), el manitol (procedente de manosa o manitosa) y el xilitol (xilosa).[51]

6. MEJORADOR DE ABSORCIÓN

La mucosa bucal es un área atractiva para la liberación de agentes terapéuticos. Sin embargo está expuesta a muchos agentes extraños, obligándola a actuar como una barrera protectora simultáneamente disminuye la permeabilidad. La característica "protectora" es atribuida a la presencia de saliva, mucina, queratina, uniones celulares y lípidos intercelulares.[25, 48, 49]

La membrana bucal es capaz de obstaculizar el transporte de los compuestos terapéuticamente activos, el cual se modifica incrementando la velocidad de flujo con medios físicos o con la adición de sustancias químicas.[1, 46, 47]

Es necesario vencer a la barrera protectora con la adición de mejoradores de absorción. [46, 47] Los mejoradores de absorción se han probado en la permeabilidad bucal y se logra mejorar la absorción del fármaco.[6, 49]

7. DISOLVENTE

Sustancia líquida (orgánica o inorgánica) que disuelve o disocia a otra sustancia en una forma más elemental y que normalmente está presente en mayor cantidad que esa otra sustancia. Este líquido es utilizado como vehículo en la preparación de soluciones. El agua, es el disolvente más común.[45]

Los disolventes son un componente importante en los productos farmacéuticos y pueden poseer una composición compleja.[51] Por ejemplo, el

alcohol que se utiliza en la fabricación de las tinturas contiene siempre un 5% o más de agua.[44]

E. Propiedades fisicoquímicas de los excipientes y los principios activos

1. CARBOXIMETILCELULOSA (DE SODIO)

NaCMC. Granulados blancos o polvo blanco a amarillento, inodoro y estable. Su pka es 4, 30. Su densidad específica: 0.6-0.9 y es soluble en agua dependiendo del grado de substitución. Soluble en agua la CMC está disponible en diferentes viscosidades (5 -2000 centipoises al 1% de solución), y es igualmente soluble en agua fría o caliente. Debajo de pH 2 ocurre la precipitación del sólido, cerca de pH 10 la viscosidad disminuye rápidamente. Los estudios de laboratorio indican que la CMC de sodio no es mutágena, ni teratógena, ni cancerígena y que no causa efectos en la reproducción. Usos farmacéuticos: como agente suspensor, excipiente (tabletas) y adhesivo.[52]

Para la elaboración de parches que contienen carboximetilcelulosa de sodio (NaCMC), debe tener una viscosidad media para obtener un excelente desempeño mucoadhesivo.[33] Los mejores parches, contienen NaCMC y el pH de la película polimérica es 6.9 constituida por PVP y NaCMC. [29]

2. EUDRAGIT NE 30 D

Poli (acrilato de etilo–co–metacrilato de metilo) 2:1, el peso molecular promedio es aproximadamente de 800, 000. Eudragit NE 30D es una dispersión acuosa con 30 % de sustancia seca, es un copolímero neutral a base de acrilato de etilo y metacrilato de metilo. Líquido blanco-turbio de baja viscosidad

ligeramente oloroso. Las dispersiones acuosas son miscibles en agua en cualquier proporción, la apariencia blanco-turbio se conserva.[52]

Una parte de Eudragit NE 30 D se disuelve en 5 partes de acetona, etanol y alcohol isopropílico para obtener soluciones claras a ligeramente turbias-claras y se forman soluciones viscosas. Se forma una película transparente después de la evaporación del disolvente.[29] Se observó que el Eudragit NE30D es compatible con celulosa, HPMC y NaCMC. Se formó un sistema polimérico y se obtuvieron parches bucales flexibles.[35]

3. POLIVINILPIRROLIDONA

Povidona, Kollidon, Plasdone, PVP. Preparado por polimerización de los radicales libres de los monómeros y producido comercialmente como series de productos poseen mediano peso molecular en un rango de 2, 500 a 1, 000, 000.

PVP es un polvo blanco e higroscópico, soluble en agua, alcohol, cloroformo, ácido fórmico, ácido acético, N-metilpirrolidona, diclorometano, etilendiamina, glicerol, dietilenglicol, PEG 400 (polietilenglicol 400). Insoluble en xileno, tolueno, dietil éter, acetato de etilo, acetona, ciclohexanona, clorobenceno y dioxano.[52]

PVP es un polímero hidrofílico adecuado para sistemas de liberación oral gingival. A la polivinilpirrolidona se le considera como polímero formador de la película.[29] La adición de PVP a un plastificante produjo un parche adhesivo que poseía un espesor altamente satisfactorio, buena adhesión al mucus y no causó ninguna irritación primaria a la piel.[53]

PVP se ha seleccionado por sus características, presenta una fuerza mucoadhesiva aceptable y se ha aprobado farmacéuticamente. [31] La combinación

PVP – PEG mejora el transporte del fármaco a través de la mucosa bucal, causada por el polietilenglicol hidrofobizado con polivinilpirrolidona.[14]

En general, se demostró que los parches bucales que contienen PVP, aumentaron la velocidad de liberación del fármaco. El comportamiento óptimo de la liberación se mostró con parche que contienen 5% p/v PVP. Así que resulta una alternativa viable para la administración en la cavidad bucal.[37]

4. POLIETILENGLICOL

Es un polímero líquido ó sólido de fórmula general H $(OCH_2CH_2)_n$ OH, donde n es mayor que o igual a 4. El líquido viscoso es claro o un sólido blanco que se disuelve en agua formando soluciones transparentes. Soluble en muchos disolventes orgánicos. Rápidamente soluble en hidrocarburos aromáticos. Ligeramente soluble en hidrocarburos alifáticos. No se hidroliza o deteriora en almacenamiento, no soportaría crecimiento fúngico. Acción disolvente sobre plásticos. Los polietilenglicoles son compuestos de baja toxicidad. Valor promedio de n entre 12.5 y 13.9, peso molecular en un rango 380-420. Líquido ligeramente higroscópico. [52]

Se ha demostrado que posee una alta velocidad de liberación, seguida del trietilcitrato y aceite de castor. PEG es soluble en agua, mientras que el trietilcitrato y aceite de castor son parcialmente soluble e insoluble en el agua, respectivamente. Se sugiere como plastificante ideal al polietilenglicol porque es soluble en agua y tiende aumentar la liberación del fármaco más que otros plastificantes con baja solubilidad acuosa.[27]

Se reporta muy poco acerca de la interacción de polietilenglicol con carbopol y polivinilpirrolidona.[38] PEG es un polímero muy usado debido a que no es tóxico,

no es inmunogénico y es biocompatible.[39] Además tiene importancia magnífica para el proceso de mucoahesivo. El polímero debe tener la flexibilidad suficiente al penetrar la red del mucus. Además, a pH neutro se hincha adecuadamente, [22] el polietilenglicol acuoso aumentó el flujo a través de la mucosa bucal *in vitro*.[5] La adición de PEG 400 al polímero aumentó la formación del enlaces de hidrógeno intra e intermolecularmente.[22]

5. PROPÓLEO

El término '*propolis*' fue usado en la Grecia Antigua: en *pro* de (para, enfrente de, en la entrada a) y *polis* (la ciudad o la comunidad). Sustancia que es para o en la defensa de la ciudad o la colmena y como medio de conservación de carácter antimicrobiano. [54, 55]

Las abejas (*Apis mellifera*), recogen con sus mandíbulas, partículas resinosas de las yemas, brotes y pecíolos de las hojas de diferentes vegetales (olmo, álamo, sauce, abedul y algunas herbáceas), una vez en la colmena, mezclan con cera y secreciones salivales para obtener el propóleo, cuya producción difiere en función de la variedad de abejas, el clima, la flora y el dispositivo de recolección. Las abejas utilizan el propóleo en la construcción, reparación, aislamiento y recubrimiento de las paredes de la colmena para protegerla y mantenerla libre de bacterias y lo aplican en una capa delgada en las paredes internas de su colmena o en la cavidad que habitan.[56]

Debido a su contenido en aceites esenciales, el propóleo suele ser aromático y en función de su origen botánico y de la época de recolección, difiere en color (de amarillo claro a castaño oscuro), sabor (amargo, ligeramente picante o insípido) y consistencia. [56, 59] El propóleo se recoge de las colmenas por medio de trampas o raspado, garantiza la total asepsia de un ambiente como la colmena, siendo el entrampado el método que ofrece mejor calidad y menor

contaminación, la recolección se hace antes de la llegada del invierno, cuando la propolización parece más activa. Tanto en la recolección como en el procesado deben aplicarse rigurosas normas de higiene para evitar la contaminación y la subsiguiente pérdida del valor comercial del producto.[55, 56]

a. Descripción

El propóleo (*própolis*) es una sustancia resinosa, es una materia pegajosa de color obscuro y la combinación con cera, que las abejas obtienen de los árboles y de algunas plantas y que luego en la colmena terminan de procesar ellas mismas. Las abejas colectan una sustancia resinosa y la convierten en propóleo.[54, 56, 59] Propóleo es una mezcla compleja de varios compuestos con cera y algunas enzimas de las glándulas salivales de las abejas, de consistencia viscosa.[56, 57] La acción contra los microorganismos es una característica esencial de propóleo.[54, 55]

b. Propiedades farmacológicas

Las propiedades farmacológicas más importantes del propóleo se destacan la acción antimicrobiana, comportándose como agente bacteriostático y bactericida, así como acción analgésica, antiinflamatoria (a través de la inhibición de la angiogénesis), antioxidante (su comportamiento sobre la estabilización de la peroxidación lipídica), cicatrizante y hepatoprotector, antiviral, que ayudan a la formación de anticuerpos que estimulan el sistema inmunológico, aumentando la resistencia del organismo, protegiéndolo contra las infecciones en general y de agentes no específicos.[54, 55, 56, 60] En el tejido dental es regenerativo, anestésico y cicatrizante.[57, 61] En contraste a los usos benéficos, el propóleo posee también algunas desventajas, es alergénico y presenta un efecto ligeramente tóxico.[55]

1) Actividad antibacteriana. El propóleo es activo frente a numerosos microorganismos *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Streptomyces sobrinus,*

Streptococcus mutans, Saccharomyces cerevisiae, Escherichia coli, Salmonella sp, Shigella sp, Giardia lamblia, Bacteroides gingivalis, Klebsiella pneumoniae, incluso *Streptococcus pyogenes* que es resistente a los antibióticos.[19] La actividad antibacterial de propóleos se determinó sobre bacterias orales *in vivo* e *in vitro*.[56]

2) Actividad antifúngica. El propóleo muestra, en distintos grados, efectos fungicidas frente a numerosas especies como *Aspergillus niger, Aspergillus flavus, Penicillium sp* y *Plasmopara viticola*. La mayor inhibición sobre hongos patógenos se observa en *Trichophyton mentagrophytes, Malassezia furfur* y en el género *Candida sp*.[62] Los extractos etanólicos de propóleo reducen la masa micelar seca, la germinación de conidios, el crecimiento y la producción de aflatoxina B_1, a mayor concentración.[56, 55] El diluyente del propóleo, aceite, etanol, polietilenglicol o glicerina también influye en su actividad antifúngica.[56]

3) Actividad antiviral. El propóleo ejerce efectos inhibidores frente a los virus de la viruela, influenza, del herpes simple, reovirus y paramixovirus, por lo que podría ser útil en su prevención. Esta actividad se atribuye al contenido en compuestos fenólicos, principalmente ácido caféico, ésteres de los ácidos caseico y ferúlico (3-metilbut-2-enil cafeato, 3-metilbutil ferulato) y agliconas flavonas (luteolina y quercetina), muy activas frente al virus del herpes.[56]

c. Composición

Del propóleo se han aislado más de 180 compuestos y es una mezcla de polifenoles, incluyendo flavonoides agliconas, ácidos fenólicos y sus ésteres, aldehídos fenólicos y cetonas en cantidades distintas e incluye compuestos flavonoides y fenólicos que son las sustancias más importantes.[54]

1) Composición promedio. Su composición química es bastante compleja que incluye fenoles, taninos, polisacáridos, terpenos, ácidos y aldehídos

aromáticos, entre otros compuestos.[54, 59] Además contiene pequeñas cantidades de secreción de las glándulas salivales de las abejas y posibles contaminantes. [54]

a) Resinas. (45 – 55 %) Los compuestos que la integran son: flavonoides, ácidos fenólicos y ésteres.

b) Ceras. (7.55 – 35 %) La mayoría es cera de abeja pero también contiene de origen vegetal.

c) Ácidos esenciales. (5 – 10 %) Volátiles.

d) Ácidos grasos. (5 %) La mayoría proceden de la cera y el resto son de origen botánico.

e) Polen. (5 %) Son proteínas del polen y aminoácidos libres. Predomina la arginina y prolina.

f) Compuestos orgánicos y minerales. (5 %) Son 14 oligoelementos, los más abundantes son Fe y Zn, en menor proporción Ag, Cs, Hg, K, Sb. Los compuestos orgánicos son cetonas, lactonas, quinonas, esteroides, ésteres, vitaminas (B_1, B_2, B_3, B_6) y azúcares. [56]

d. Efectos secundarios y toxicológicos

El propóleo es relativamente atóxico, dosis diarias de 1400 mg/ kg no causan ningún efecto negativo en ratones, aunque masticar grandes cantidades de propóleo en bruto puede producir náuseas, trastornos digestivos y reacciones alérgicas, en particular al cafeato de isoprenilo. Antes de iniciar un tratamiento con propóleo conviene realizar una prueba de alergia, bien por aplicación tópica del producto en el antebrazo o por vía oral adoptando las debidas precauciones.[56]

La evaluación de la toxicidad aguda del extracto oral (DL_{50}) experimental es superior a 2 g/ kg. Las observaciones clínicas realizadas durante el período del estudio no mostraron signos tóxicos, ni se detectaron reacciones alérgicas o toxicidad por sobredosis.[60]

e. Extracto etanólico de propóleo

Es un fitofármaco que tiene diversos efectos farmacológicos que son atribuibles al contenido de pinocembrina, ésteres de cafeato, ácido caféico y fenílico.[61]

A través del análisis efectuado con cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)[93] se mostraron cromatogramas de patrones similares caracterizados por diez compuestos fenólicos y no existe diferencia significativa entre los perfiles.[55]

Los ensayos antibacteriales efectuados por el método de dilución al extracto etanólico de propóleo (EEP) mostró que 5 cepas de *Actinomycetaceae* fueron inhibidas por concentraciones del 0.1 al 0.25% y no produjo crecimiento al 0.5%. La inhibición del crecimiento de seis *Fusobacterium sp* se observaron a concentraciones de 0.05 al 0.1% y no se observó crecimiento a 0.25%.[55]

1) Dosis. Se administra la cantidad requerida para el tratamiento de la enfermedad durante 8 a 14 días.[55]

6. EQUINÁCEA

Echinacea purpurea es una flor silvestre nativa de Norteamérica. La raíz o las flores se aprovechan medicinalmente.[65, 58] Se utiliza en suplementos herbales.

a. Descripción

Las partes medicinales son: flores, hojas, raíces o el tallo de la planta o la planta en su totalidad pero depende de la especie. Se utiliza sobre todo la raíz en estado fresco para obtener una mayor eficacia.[66, 67] Esta planta es uno de los mejores remedios naturales para fortalecer el sistema inmunológico porque refuerza la capacidad de resistencia del organismo ante las infecciones.[67, 88]

La raíz de equinácea se recomienda como una vía eficaz para todo tipo de infecciones, desde procesos gripales hasta herpes. Posee un efecto preventivo y es muy útil en el restablecimiento de organismos con bajas defensas.[66] En la cavidad oral actúa específicamente sobre infecciones como candidiasis, [70] gingivitis, herpes labial, neuralgia bucal y piorrea. [71, 69, 88]

b. Propiedades farmacológicas

Se considera que la equinácea posee propiedades farmacológicas muy importantes. Se reconoce como estimulante inmunológico [68, 69] porque aumenta las defensas inespecíficas y activa la formación de leucocitos (glóbulos blancos) en la sangre, bacteriostático porque bloquea la hialuronidasa (enzima que facilita una invasión patógena) e impide que se extiendan las infecciones y favorece la curación de las heridas. Se considera como antiviral, desintoxicante, antialérgico, antiinflamatorio, cicatrizante, analgésico y antiséptico.[69] Se le denomina antibiótico natural porque ayuda en la eliminación de bacterias, virus, hongos y otros microorganismos patógenos.[70]

1) Antibacteriana. Las preparaciones de equinácea se recomiendan para combatir infecciones bacterianas causadas por *Streptococcus* y *Staphylococcus*.
Por lo menos tres ensayos clínicos que utilizan *E. purpurea* como antibiótico en la cavidad oral y mostraron resultados positivos demostrando que posee actividad antimicrobial ya que reduce infecciones bucales, herpes labial, úlceras y heridas bucales. La equinácea recibe el subnombre de antibiótico vegetal y su actividad se explica por la estimulación del sistema inmunitario.[70]

2) Antifúngica. Se ha demostrado que los extractos de *E. purpurea* contienen acetilenico, isobutilamidas y poliacetilenos. Posee actividad antifúngica, incluyendo hongos patógenos clínicamente. Los resultados muestran que los

extractos de equinácea inhiben el crecimiento de levaduras como: *Candida albicans* y *Candida tropicalis* con una actividad antifúngica aceptada.[70]

3) Antiviral. Varios componentes de la equinácea funcionan conjuntamente para aumentar la producción y la actividad de los leucocitos.[71, 65] Se ha demostrado que la equinácea activa específicamente una clase importante de leucocitos conocidos como células T citolíticas (asesinas naturales).[71] Equinácea produce una elevación del nivel y secreción de interferona, los efectos no específicos incluyen los aumentos en la proliferación de macrófagos y fagocitosis,[65, 72] además es un elemento importante de la respuesta del organismo a las infecciones virales.[72, 71]

c. Composición

La actividad inmunoestimulante se adjudica a diversos compuestos, principalmente a las alcamidas, derivados de ácido caféico (ácido cichórico y equinacósido), [67, 74] polisacáridos y algunas clases de flavonoides (flavonoles e isoflavonoides). Los flavonoides son metabolitos secundarios de la planta y actúan como agente antimicrobial y antioxidante.[69]

1) Principios activos. Con un análisis en HPLC (fase reversa), se reveló que *E. purpurea* contiene derivados del ácido cafeíco.[65, 68]

a) Aceite esencial. Se encuentra del 0.2% al 1.5 % y su principal componente es el humuleno, borneol, bornilacetato, D-germacraneno y □-cariofileno.[65]

b) Equinacósido. Se encuentra del 0.6 a 2.1 %,[65] molécula compuesta por glucosa, ramnosa y ácido caféico,[75] cinarina, ácido cichórico, antocianósidos, equinolona y betaína.

c) Polisacáridos. Moléculas de peso molecular de 45.000 [compuesto de fructosa, arabinosa (64-84%), xilosa, galactosa (1.9-5.3%) y glucosalinas (6%)] y de 25.000 (compuesto de ramnosa, arabinosa, xilosa y galactosa).[65]

d) Ácidos orgánicos. Derivados del ácido cichórico, ácido caféico (0.01-0.04%); derivados del cafeoil-etílico, verbascósido, ácido clorogénico, ácido isoclorogénico. [65, 68]

e) Resina. Generalmente se encuentra al 1.9%, contiene ácidos grasos por ácido oleico, linoléico, cerótico y palmítico, así como fitosteroles.[92]

d. Efectos secundarios y toxicológicos

Es una planta de acción suave que puede administrarse sin problemas a niños y personas de edad avanzada.[66] En dosis recomendadas, equinácea no presenta reacciones adversas ni efectos secundarios.

Los efectos adversos evaluados en ensayos clínicos han reportado mínimas reacciones alérgicas de la equinácea: sibilancias, urticaria o diarrea. Para pacientes que son alérgicos a flores de la familia de margarita deben tomar equinácea con precaución y cuidado. Para los estudios toxicológicos, se etiquetó a equinácea como no tóxica y completamente segura cuando se usa en dosis recomendadas. Se reporta una toxicidad mayor a 3,000 mg/kg peso corporal.[65, 66]

e. Tintura de Equinácea

La tintura de equinácea,[65] posee del 15-90% de contenido etanólico se emplea como enjuague bucal para abscesos dentarios, heridas purulentas, inflamaciones y ulceraciones.[72] Los productos de extractos hidroalcohólicos de *E. purpurea*, la administración oral de la tintura se ha demostrado *in vitro* e *in vivo*, su aplicabilidad como terapia bucal a dosis bajas aplicados en forma de líquidos.[73, 77] La tintura se recomienda en tratamientos orales y para infecciones de la cavidad bucal.[69, 71]

1) Dosis. Extracto líquido o tintura en dosis usual se pueden tomar 3 a 4 mL de tintura de equinácea durante los siguientes 10 a 14 días. Presentaciones: extracto líquido, cápsulas, pomadas o ungüentos para la piel.[66] Se considera mejor ingerirla

como extracto líquido concentrado o tintura porque se absorbe más y fácilmente en la sangre. Un extracto alcohólico es reportado más benéfico que cápsulas o tabletas. La dosis recomendada por un máximo de ocho semanas consecutivas.

f. Método cromatográfico

Para la separación de los ácidos fenólicos de *E. purpurea* y las lecturas obtenidas en UV a 300 nm, se validó aplicando la determinación del ácido cichórico y compuestos relacionados. Los ácidos fenólicos son metabolitos secundarios de la planta, constituyen una parte importante de los componentes hidrofílicos de los extractos.[91] Mediante HPLC en fase reversa, se aplica en la determinación de ácidos fenólicos de la planta y extractos. En las muestras obtenidas de *E. purpurea*, 4 ácidos fenólicos, se encontraron: caféico, caftárico y cichórico a las siguientes concentraciones: 0.073 y 1.75 mg/g. [76]

7. ANÍS

Fruto de *Pimpinella anisum*. Líquido incoloro o amarillo claro, se separa libremente del agua y cristaliza al enfriarlo [78] y se considera una sustancia volátil.[52] Es soluble en éter dietílico y cloroformo, ligeramente soluble en agua. Una parte de aceite esencial de anís se disuelve en tres partes de etanol al 90 %. Su densidad es 0.978 ± 0.01, su rotación óptica es de - 2° y el rango del índice de refracción es 1.553 a 1.570 que se determina a 20 °C.[78] Manufacturado como sabor para productos farmacéuticos, alimentos y bebidas.[52, 58]

8. MENTA

Mentha piperita. Líquido incoloro o amarillo claro,[78] los principios activos son aceite esencial con mentol, mentona, cineol y limoneno, flavonoides, mentósido, alcanfor, ácidos fenólicos y taninos.[66] Produce no menos del 5% de ésteres, calculados como acetato de mentilo ($C_{12}H_{22}O_2$) y no menos del 50 % de mentol

total ($C_{10}H_{20}O$) libre de ésteres. La densidad es 0.896 ± 0.1, el aceite destilado posee una rotación óptica de + 34°. Es soluble un volumen en tres de etanol al 70% y no muestra más que una ligera opalescencia.[78]

La menta es un ingrediente insustituible en numerosas fórmulas a las que aporta su sabor característico, además posee propiedades como analgésico a nivel local puede reducir el dolor provocado por inflamaciones y neuralgia dental. Las presentaciones son infusión, tintura, extracto, aceite esencial, polvo húmedo y seco. [66, 58]

F. Disolución

Existen varios métodos para determinar la velocidad de disolución, los más utilizados son los establecidos por la United States Pharmacopeia (USP, 27ª ed) y Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM, 8ª ed).

1. DEFINICIÓN

La prueba de disolución mide la capacidad que tiene un fármaco puro o el contenido en la forma farmacéutica sólida, para disolverse en un medio determinado bajo condiciones experimentales controladas. La velocidad de disolución es el tiempo en el que el soluto se dispersa molecularmente en el disolvente para formar una solución. La prueba de disolución se ha convertido en una prueba esencial como control de calidad y como un parámetro importante durante el desarrollo de formas farmacéuticas sólidas. Se ha investigado que la disponibilidad del fármaco y la absorción a través de la mucosa bucal se refleja por la velocidad de disolución *in vitro*.[79] Este método se ha investigado en Food and Drug Administration (FDA) y el objetivo primordial es el desarrollo del método *in vitro*, reproducible y confiable para asegurar la liberación del fármaco.[79]

2. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN

Se sugiere que los factores que afectan la velocidad de disolución del fármaco[80] *in vitro* e *in vivo* a partir de la forma farmacéutica sólida son:

a. Factores relacionados a las propiedades fisicoquímicas de los fármacos.

- Polimorfismo
- Estado amorfo y solvatación
- Estado químico (ácido, base o sal)

b. Factores relacionados a la formulación del producto.

- Tipo y cantidad de excipientes (lubricantes, desintegrantes o aglutinantes)
- Tamaño de partícula
- Condiciones durante la manufactura (humedad) y almacenamiento.

c. Factores relacionados a la forma farmacéutica.

- Cantidad de los excipientes
- Proceso y/o reproceso de manufactura
- Empaque y edad del producto [80]

d. Factores relacionados al aparato de disolución.

- Excentricidad de agitador
- Vibración
- Tipo de aparato
- Velocidad de agitación
- Gradiente de concentración

- Composición del medio de disolución: pH, fuerza iónica, viscosidad, los cuales son determinados por la composición del medio [80]
- Temperatura del medio de disolución

e. Factores relacionados a los parámetros de la prueba de disolución.

- Gases disueltos en el medio
- Adsorción
- Uso de equipo de disolución estándar.
- Se conocen las variables del sistema, es fácil de automatizar y no requiere un entrenamiento especializado
- Se pueden efectuar estudios de absorción con membranas sintéticas y biológicas, pero no es fácil colocar la membrana.
- Se pueden estudiar parches (USP/FDA) y semisólidos (geles y ungüentos). [80]

f. Otros factores.

- Factores ambientales (condiciones de manufactura)
- Factores que afectan el área de superficie disponible para la disolución[80]

4. EQUIPO DE DISOLUCIÓN

Usando el principio de paleta sobre disco el cual es propuesto para parches se han realizado estudios de la liberación del fármaco *in vitro* empleando el aparato de disolución 5 de USP con una leve modificación, [35] donde se reporta el uso de una celda mejorada para la prueba de liberación de parches. Las modificaciones al método para parches de la USP, sugiere el método de celda modificada, utilizado para los estudios de liberación en diversas formulaciones.[79]

a. Celda de Franz

La celda se compone de dos cámaras (del donador y del receptor), la formulación se coloca en la cámara del donador y las muestras se retiran de la cámara del receptor a diferentes tiempos para medir la cantidad del fármaco que cruza la membrana.[81]

Las muestras son colectadas y analizadas por espectrofotómetro UV para determinar la cantidad liberada de fármaco, el flujo a través del sistema con baño recirculante de agua, la temperatura se mantiene a 37° C y la barra magnética gira a 150 rpm.[27]

La prueba puede incluir 6 celdas y de 8 a 25 intervalos de muestreo que se verifica por triplicado.[81] El parche se fija al eje central (Fig. 3) y se estima la cantidad del fármaco en el medio receptor.[82, 83]

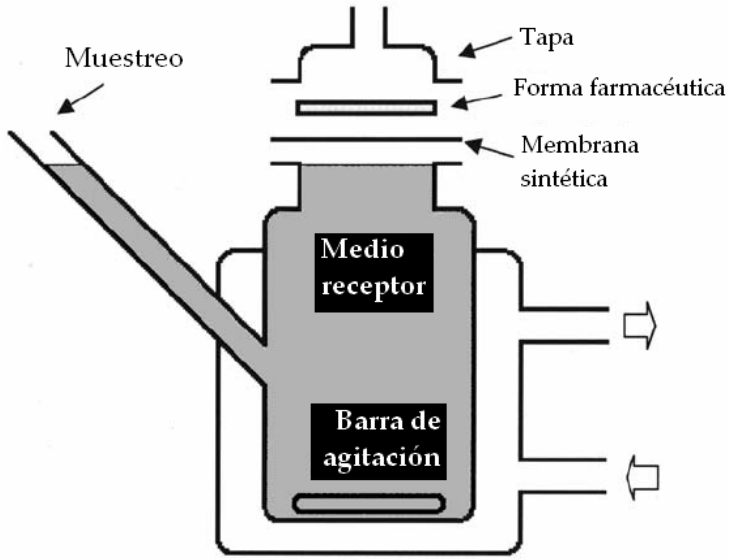


Figura 3. Celda de difusión de Franz.[83]

La cantidad del fármaco presente en el compartimiento donador se determina y se traza en función del tiempo. El coeficiente de permeabilidad (P) se calcula con la ecuación (**1**):

$$P = \frac{dQ/dt}{A \times C_d} \qquad (\mathbf{1})$$

donde: A= área de superficie de difusión,

dQ/dt = cantidad de fármaco absorbido por unidad de tiempo

C_d = concentración del fármaco donante.[16]

G. Metodología experimental para los estudios de permeación bucal

Se ha sido investigado la absorción del sistema de liberación del fármaco bucal,[9, 1] los estudios de absorción-permeación se dirigen en la determinación de la eficacia de la ruta de administración. Estos estudios implican métodos que examinarían *in vitro* o *in vivo* el perfil de permeación bucal y la absorción cinética del fármaco.[9]

1. ESTUDIOS *in vitro*

Para la evaluación de la mucoadhesión *in vitro*, se mide el grado de queratinización como parámetro porque pueden influir en la robustez y estado de hidratación de la capa mucosa.[85]

En la mayor parte de los estudios *in vitro* sobre el transporte del fármaco a través de la mucosa bucal se han usado los tejidos bucales animales, que se sacrifican inmediatamente antes de comenzar el experimento. Las membranas entonces se colocan y se almacenan en frío a 4°C generalmente en soluciones amortiguadoras hasta que son montados en las celdas de difusión para evaluar *in vitro* la permeación.[26]

Actualmente no existen medios uniformes para valorar la viabilidad del tejido estudiado, el nivel de trifosfato de adenosina (ATP) como indicador de la viabilidad del tejido no es el método más significativo al valorar la permeación experimental, ya que depende de condiciones experimentales específicas como pH y temperatura.[9]

Se usan tejidos animales como modelos *in vitro* depende de la viabilidad y uniformidad del tejido disectado porque afecta directamente los resultados y conclusión de los estudios. Por ende, se ha sugerido el manejo de cultivos celulares bucales también son útiles en modelos *in vitro* [81] para la permeación bucal y metabolismo del fármaco. Sin embargo, para utilizar estos cultivos celulares depende del número de capas celulares diferenciadas y la composición lipídica de las capas de la barrera se debe caracterizar bien.[9] Con los resultados se calcula la permeabilidad del compartimiento receptor en un período de tiempo dado, ecuación (**2**): [11]

$$P_c\left(\mathrm{cm}/\mathrm{s}\right) = \frac{R \times V}{A \times 100 \times 60} \qquad (\mathbf{2})$$

P_c= Coeficiente de permeabilidad ± desviaciones típicas
R= Velocidad de la transferencia (%/min)
V= Volumen de compartimiento (cm^3 o mL de donante)
A= Área del tejido expuesto (cm^2)

2. ESTUDIOS *in vivo*

Los métodos *in vivo* fueron originados por *Beckett* con la prueba denominada de absorción bucal, a partir del volumen expulsado se determina la cantidad del fármaco absorbido. En estudios *in vivo* se maneja con modelos animales, [9] las desventajas de este método es que no logra simular la dilución salival, el tragar

accidental ni la incapacidad para localizar la solución del fármaco en el sitio específico bucal o gingival de la cavidad oral.[9, 86]

Para cuantificar la absorción bucal, se debe mantener al fármaco sobre la mucosa utilizando el sistema mucoadhesivo.[9, 86] Es muy difícil un diseño significativo, bien controlado experimentos reproducibles exactamente simulando la liberación del fármaco a través de la mucosa *in vivo*. [29, 85]

2. ESPECIES DE ANIMALES EXPERIMENTALES

La mucosa oral de animales experimentales que se han usado extensamente para estudios *in vivo*, es de animales pequeños (ratas, hámsteres y conejillos de indias) que comúnmente son un modelo a elegir. Debido a la semejanza del tejido animal y el tejido humano en las ultraestructuras y propiedades metabólicas.[1, 9, 11]

La mucosa bucal de hámsteres es totalmente diferente a la humana porque los roedores usan las mejillas para almacenamiento del alimento y por lo tanto el tejido es queratinizado. La rata tiene una mucosa bucal gruesa y una superficie queratinizada.[9, 1, 11] Sin embargo, las elecciones limitan gravemente el valor obtenido de los datos, los humanos son diferentes a la mayoría de los animales del laboratorio porque tienen una capa de revestimiento oral que es totalmente queratinizado.[11]

Para los estudios de permeabilidad y liberación se incluyen, frecuentemente utilizados como alternativa de la mucosa oral humana, tejidos de la mucosa oral animal de perros, cerdos, conejos y monos que son conocidos por su semejanza a la mucosa humana con respecto al epitelio oral no queratinizado.[9, 1]

La mucosa bucal animal se remueve quirúrgicamente de la cavidad oral y la membrana de la mucosa bucal se aísla. La preparación del tejido se efectúa cuidadosamente para mantener su viabilidad e integridad de la mucosa oral, ya

que la pérdida del mucus. La red de mucus es extremadamente sensible y es inevitable que sufra cambios en su ambiente.[26]

La mucosa oral porcina en términos del contenido en lípidos y su composición, estructura, morfología y función de la membrana de permeabilidad es probablemente el modelo más adecuado para estudios de permeabilidad bucal porque esencialmente no hay diferencias con la humana. Los cerdos tienen una mucosa bucal no-queratinizada semejante a la humana, costo económico en manejo y conservación, así como fácil disponibilidad y área de superficie mucosa relativamente grande que producen un modelo animal igualmente atractivo para estudios de liberación del fármaco bucal y para los estudios *in vitro* son más satisfactorios comparados con el tejido bucal perruno. [9, 1, 11]

La mucosa oral perruna es no-queratinizada, tiene una semejanza cercana a la humana, es fácil su conservación, el área de superficie es relativamente extensa, ocasionando una mínima variación individual y considerablemente menos costoso que la mucosa de monos.[11] Los perros son ideales debido a su rápido crecimiento, sin embargo su manejo se considera difícil.[9]

El conejo es el único roedor de laboratorio que tiene una mucosa con revestimiento no-queratinizado semejante al tejido humano y se han utilizado extensamente en estudios experimentales. La dificultad al usar la mucosa oral de conejo, sin embargo, es la repentina transición del tejido queratinizado en los márgenes de la mucosa lo que hace difícil aislar la región no-queratinizada.[9, 11]

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente se requiere contribuir al desarrollo de formulaciones innovadoras que conlleven a la investigación de nuevas formas de dosificación que presenten mayores ventajas para el paciente y se obtenga un producto farmacéutico eficaz, seguro y de óptima calidad. Además el método de fabricación propuesto es sencillo lo que implica una disminución en el costo de producción.

Simultáneamente, se considera que la mucosa bucal es un excelente sitio de acción por lo cual se propuso la formulación del parche para el tratamiento de enfermedades bucales.

El desarrollo de parches bucales ofrece ventajas considerables como la fácil aplicación, comodidad y el tiempo de aplicación se acorta, se reducen los efectos secundarios (mejora la eficacia terapéutica y disminuye la toxicidad).

El parche bucal proporciona al paciente una sensación de frescura, disminuye el riesgo de convertir una enfermedad eventual en crónica y el éxito reside en la satisfacción integral del paciente ya que contribuye a la salud oral.

Otra característica importante a considerar es la selección de los principios activos por lo cual se propusieron productos naturales para minimizar efectos secundarios, adversos y tóxicos. También se basa en la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos para la cavidad bucal y se considera su actividad antibacteriana, antifúngica y antiviral.

La selección específica de *E. purpurea* se deriva del resultado de las investigaciones clínicas recientes que sugieren que realmente puede estimular al sistema inmunológico contribuyendo a combatir las infecciones virales.

La elección de *Propóleo* se sustenta en la investigación realizada por *Gispert y col.* porque lo han empleado como ingrediente activo de una crema dental y las pruebas demuestran un rendimiento satisfactorio y eficaz.[28]

Además, se sugiere la utilización de preparaciones herbales que no irriten la mucosa bucal, tales como *tintura* para equinácea y de *extracto* etanólico para propóleo.

Por las razones expuestas en el presente proyecto se pretende realizar la combinación de polímeros, investigando el efecto de varias composiciones de la película polimérica compuesta NaCMC, PVP o Eudragit NE30D, para preparar las películas con las características apropiadas. Debido a que los polímeros de alta viscosidad aumentan la mucoadhesividad de los parches tienden a causar la distribución no homogénea de los polímeros y del fármaco, teniendo como resultado la velocidad no previsibles de la liberación *in vitro*, por lo tanto, el elevado hinchamiento causado por NaCMC se podría disminuir a través de la fuerza mucoadhesiva del PVP o del Eudragit NE30D.

La calidad de las películas elaboradas, se evalúan a través del hinchamiento, las características mucoadhesivas, organolépticas, velocidad de disolución, tiempo de adhesión y la factibilidad de la película para la preparación del parche bucal.

La liberación del fármaco *in vitro* se determina a través de los perfiles de disolución. Para la prueba de disolución se efectúa empleando la celda de Franz modificada y los resultados obtenidos se analizan matemáticamente.

El efecto de la concentración del plastificante en la liberación de los principios activos, se contrasta mediante el estudio *in vitro* y las películas con las mejores características organolépticas se eligen para someterlas a otras pruebas como viscosidad, uniformidad de contenido y pH.

III. OBJETIVOS

A. GENERAL:

Obtener una matriz polimérica con el propósito de formular un parche bucal, evaluar sus características fisicoquímicas y caracterizar sus perfiles de liberación *in vitro*. Las matrices poliméricas deben poseer un contenido homogéneo del extracto etanólico de propóleo y tintura de equinácea, ambos empleados como principios activos.

B. PARTICULARES:

Desarrollar la formulación para los sistemas obtenidos de la mezcla de los polímeros a diferentes proporciones y seleccionar la formulación, obteniendo estudios preliminares que permitan elegir el polímero o mezcla de polímeros y la proporción del plastificante adecuado, para obtener la óptima formulación del parche bucal.

Validar el método analítico para determinar la cantidad de los principios activos (extracto etanólico de propóleo y tintura de equinácea) en la prueba *in vitro*.

Analizar si la cinética de liberación de los parches bucales fabricados se ajustan a una cinética de liberación de orden definido o algún modelo matemático definido.

IV. HIPÓTESIS

Dado que en los sistemas poliméricos existen diversos factores que afectan la liberación del principio activo como la naturaleza y concentración del polímero, así como la cantidad y características fisicoquímicas del plastificante; al modificar las proporciones de la mezcla de polímeros NaCMC, Eudragit NE30D, PVP y Polietilenglicol se obtendrán diferentes perfiles de liberación. Además al utilizar el polímero NaCMC se espera una elevada liberación debido a su alta viscosidad y al adicionar PVP se logrará optimizar la permeabilidad, la liberación de los ingredientes activos y se obtendrá una película uniforme.

V. METODOLOGÍA

A. Recursos físicos

1. MATERIAL

- 3 Pipetas Pasteur con bulbo de hule
- 20 portaobjetos 25.4 × 76.2 mm y 2 cubreobjetos circulares Corning
- 40 tubos de ensayo (10 x 75 mm) y 15 tubos (13 x 100 mm)
- 5 pipetas graduadas de 5 y 10 mL y 2 pipetas graduadas de 1 mL 1/10 Pirex
- 2 gradillas metálicas para 40 tubos
- 3 pipetas volumétricas 1, 2, 3, 5 y 10 mL Pyrex
- 5 vasos de precipitado 20, 50,150, 250 mL Kimax
- 2 probetas 50, 100 y 250 mL Pirex
- 2 embudos planos de tallo corto 125 mm
- soporte universal con varilla de 60 cm
- anillo metálico con broche 7.5 cm diámetro
- vidrio de reloj de 65 y 90 mm

- agitador de vidrio 300 × 6 mm Kimax
- 2 termómetros -10 a 150 ° C
- 144 frascos de vidrio ámbar con tapas de roscas de 10 mL
- 40 tubos capilares sin heparina 75 mm Marienfeld
- 5 cámaras cromatográficas (frascos de vidrio con tapa hermética ~250 mL)
- cámara de humedad (recipiente de polietileno con tapa hermética ~2 L)
- 10 matraces volumétricos con tapón de vidrio de 10, 25 y 100 mL
- 5 jeringas® Hamilton 1 y 5 mL
- 2 buretas con llave de teflón de 10 mL y pinzas dobles para bureta
- 3 barras magnéticas PTFE 20 x 6 mm, cilíndrica sin anillo
- refractario® Pyro-rey de 18.5 x 10.5 cm
- papel pH escala 5-10 Neutralit® Merck
- papel filtro Whatman
- 2 pliegos de papel couche sintético polypap de 4 puntos
- papel aluminio de grueso calibre® Bago-bag
- cinta autoadherible® Tuk

2. EQUIPO

- Cronómetro CASIO®
- agitador para tubos tipo Vortex Craft®
- balanza analítica OHAUS® Plus & Estándar y Mettler® PC 2000
- estufa Caisa® (20, 40, 50 y 70 ° C)
- Cámara de UV Camag® UV- Betracinter con longitud de onda corta 254 nm y larga 365 nm
- higrómetro Termo–hygro Organon® Modelo Taylor 5368
- baño ultrasónico Transsonic 820/H Lab-Line®
- 3 celdas modificadas de Franz ~125 mL de capacidad
- placa de calentamiento y agitación Thermolyne® Modelo 1000

- espectrofotómetro UV-Visible 8 Auto–cell Labomed Inc.® acoplado a PC
- viscosímetro Broockfield Modelo LVT (aguja No.64)

3. REACTIVOS

- agua destilada
- ácido fórmico
- tolueno*
- acetato de etilo*
- cloroformo
- metanol JT Baker®
- etanol JT Baker®
- n-hexano* Merck®
- acetona* EM Science®
- ácido sulfúrico*
- sílica gel
- acetato de plomo
- permanganato de potasio*
- cloruro de sodio* J.T. Baker®
- hidróxido de sodio* J.T. Baker ®
- óxido de aluminio*
- fosfato monobásico de potasio* J.T. Baker®
- fosfato dibásico de sodio* J.T. Baker®

* Son sustancias con grado reactivo (GR).

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

1. MATERIAS PRIMAS

⌖ Extracto etanólico de propóleo	Extracto de propóleo®*Mixim*
⌖ Tintura de equinácea	Equinácea ® *Bioextracto*
⌖ Poli(acrilato de etilo–co–metacrilatos de metilo)	Eudragit NE 30D® *Röhm Pharma*
⌖ Copolímero de ácido metacrílico–metacrilato de metilo (1:1)	Eudragit L 100® *Röhm Pharma*
⌖ Copolímero de ácido metacrílico–metacrilato de metilo (1:2)	Eudragit S100® *Röhm Pharma*
⌖ Copolímero metacrilato de amonio tipo A	Eudragit RL 100 ® *Röhm Pharma*
⌖ Copolímero metacrilato de amonio tipo B	Eudragit RS100® *Röhm Pharma*
⌖ Polivinilpirrolidona	Kollidon® *25BASF*
⌖ Carboximetilcelulosa de sodio	Croscarmellose sodium®BASF
⌖ Polietilenglicol (PEG 400)	*Merck*
⌖ Miristato de isopropilo	IPM® *Unichema*
⌖ Manitol	----------
⌖ Menta y Anís	*Century Laboratories®*

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

B. Diagrama de bloques

En el diagrama se presenta la metodología general que se desarrolló durante el proyecto para lograr la formulación requerida y las pruebas necesarias para obtener una forma farmacéutica factible.

PREFORMULACIÓN.

Caracterización de los principios activos. ⇨ Selección de excipientes en función de sus características. ⇨ Compatibilidad principio activo -excipiente.

FORMULACIÓN.

Elección de los agentes poliméricos (tipo y %) y del plastificante. ⇨ Propuesta de formulación. ⇨ Evaluación física de la formulación. ⇩

Pruebas de control:
1. Variación de peso
2. Resistencia al doblar
3. Hinchamiento

LIBERACIÓN DEL ACTIVO A TRAVÉS DE LA PRUEBA DE DISOLUCIÓN.

Selección del aparato de disolución. ⇨ Selección del medio de disolución. ⇨ Selección de condiciones hidrodinámicas:
1. Velocidad
2. Temperatura
3. Tiempo

⇔ Desarrollo y validación del método analítico. ⇩

Evaluación de la factibilidad de la matriz polimérica elegida como aplicación a una formulación de parche bucal.

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

1. SELECCIÓN DE EXCIPIENTES EN FUNCIÓN DE SUS CARACTERÍSTICAS.

a. Selección de las matrices poliméricas

La elección de los polímeros utilizados se sustentó en estudios previamente realizados y reportados por algunos autores como *Naffe, Chun, Perioli y col*, los cuales han desarrollado formulaciones farmacéuticas para aplicación bucal, además dicha elección se fundamenta en las características fisicoquímicas que presenta cada polímero. Para seleccionar la matriz polimérica más adecuada se realizaron mezclas utilizando un polímero mucoadhesivo y un polímero formador de película y que posteriormente se pudiera utilizar como parche bucal.

Para la elección de las formulaciones tentativas, se prepararon mezclas poliméricas con 500 mg en peso total, para su elaboración se utilizaron los polímeros Eudragit® L 100, S100, RL 100, RS100 y NE 30D, Polivinilpirrolidona y Carboximetilcelulosa de sodio y se adicionó como plastificante al Polietilenglicol 400; las proporciones manipuladas se describen a continuación:

- Polímero mucoadhesivo con plastificante 1:1
- Polímeros formadores de película con plastificante 1:1
- Polímero mucoadhesivo y formador de película 40:60 y 60:40 con plastificante 35 %
- Polímero mucoadhesivo y formador de película 70:30 con plastificante al 30 y 35 %
- Mezcla NaCMC – Eudragit NE 30D 65: 35 y 35: 65, con plastificante al 25 y 30 % respectivamente
- Mezcla NaCMC – PVP 60:40 y 70: 30 con plastificante al 25, 30, 35 y 40%

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

De las matrices poliméricas elaboradas se seleccionaron doce, las cuales se muestran en la Tabla 10. Los criterios utilizados en la selección de las matrices poliméricas se presentan en la Tabla 3. La pauta crítica en dicha selección fue que las matrices mostraran una apariencia adecuada.

b. Caracterización de los principios activos

1) Extracto etanólico de propóleo

a) Descripción. Las características físicas deben corresponder con las especificaciones establecidas en la Tabla 6. El aspecto externo, olor, color, sabor y consistencia del EEP se determinaron mediante una inspección visual y organolépticamente, según correspondiera. La estructura del EEP se determinó microscópicamente, para su observación, se colocó una gota del extracto en el centro del portaobjetos, misma que se selló con un cubreobjetos y evitando la formación de burbujas de aire.[56]

b) Ensayos de identidad

(1) Reacción de Shinoda. Esta reacción detecta la presencia de flavonoides y determina la calidad del EEP. En un tubo de ensayo (13 x 100 mm), se colocaron 5 gotas de EEP y se agregó una gota de SR de permanganato de potasio y se midió el tiempo en el que se llevó a cabo la reacción.[56]

(2) Cromatografía en Capa Fina. Para la técnica de CCF (MGA- FH 0050) se efectuó el método clásico, se empleó sílica gel como fase estacionaria y la propuesta de las fases móviles son: tolueno- acetato de etilo- ácido fórmico (75:15:3), o bien cloroformo-metanol-ácido fórmico. (75:5:4).[84, 95]

c) Solubilidad. MGA 0821.[78] Se colocó 1 mL de la muestra en un tubo de ensayo (13 x 100 mm), se agregó cada uno de los disolventes (orgánicos y agua) mililitro

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

a mililitro, se agitó suavemente para obtener la solución empleando un agitador tipo Vortex y se determinó la solubilidad de acuerdo a la Tabla 1:

TABLA 1. Criterios para determinar la solubilidad de la sustancia probada.[78]

DESCRIPCIÓN	PARTES DE DISOLVENTE POR 1 PARTE DE SOLUTO
Muy soluble	Menos de 1
Fácilmente soluble	De 1 a 10
Soluble	De 10 a 30
Escasamente soluble	De 30 a 100
Ligeramente soluble	De 100 a 1000
Muy ligeramente soluble	De 1000 a 10,000
Prácticamente insoluble o insoluble	Más de 10, 000

d) Resinas solubles en etanol. Se pesó 1g de EEP y se colocó en un tubo de ensayo (13 x 100 mm), se adicionaron 5 mL de alcohol etílico (96 °), se agitó durante 3 min con un agitador tipo Vortex y utilizando una pipeta volumétrica se adicionó 1 mL de etanol (96°) en intervalos de 2 min hasta formar una solución ámbar. [56]

e) Índice de oxidación. Esta determinación se incluye en las Normas de Calidad de Rusia (NORMA RST – RSFSR-317-77), Cuba y Rumania. Esta prueba se efectuó por triplicado. Se pesaron 0.2 g de EEP en vaso de precipitado de 150 mL, se adicionaron 5 mL de etanol y se dejó reposar durante 1 h. Después se agregaron 100 mL de agua destilada, se agitó la solución y se filtró lentamente a través del papel filtro Whatman # 40.

De esta solución filtrada, se midieron 10 mL con una pipeta volumétrica y se aforaron en un matraz volumétrico con capacidad de 100 mL. Posteriormente con pipeta volumétrica de 2 mL se extrajo la solución y se transfirió a un tubo de ensayo (13 x 100 mm), se adicionó 1 mL de ácido sulfúrico al 20 % y se agitó en

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

el Vortex durante 1 min. A la solución obtenida se le añadió 1 gota de SR de permanganato de potasio y simultáneamente se inició el funcionamiento del cronómetro. La lectura del tiempo transcurrido para el cambio de coloración se registró en segundos.[56]

f) Cera. Según la NORMA RST – RSFSR-317-77. Se pesaron 3 g de EEP, se colocaron en un vaso de precipitado de 250 mL y se adicionaron 200 mL de agua destilada, se mezcló bien, se tapó con un vidrio de reloj y se hirvió durante 15 min. La solución se dejó enfriar durante 15 minutos, se filtró con papel filtro Whatman previamente pesado y se secó en la estufa a 70° C. Se retiró el papel de la estufa, se dejó enfriar y se pesó.[64] El contenido de cera se calculó en porcentajes, utilizando la fórmula **(3)**:

$$\text{cera} = \frac{b \times 100}{a}$$

$$a = \text{Muestra de propóleo en g} \qquad \textbf{(3)}$$

$$b = \text{Peso de la cera en g}$$

g) Reacción cualitativa de compuestos fenólicos. Según la NORMA RST–RSFSR-317-77. Se pesaron 0.2 g de EEP, se colocó en un vaso de precipitado de 20 mL, se adicionaron 5 mL de etanol, se sumergió en baño maría durante 3 min, se enfrió y se filtró la solución.

Se midió 1 mL del filtrado, se adicionaron 10 mL de etanol y se agitó cuidadosamente. En un tubo de ensayo se tomó 1 mL de esta solución, se adicionó 0.1 mL de hidróxido de sodio al 20 %. En otro tubo también se midió 1 mL de la solución con pipeta volumétrica y se adicionaron 0.5 mL de acetato de plomo al 10 %. La solución del primer tubo debe colorearse rápidamente dando un color anaranjado -amarillento y oscurecerse la solución del segundo tubo muestra un color amarillo-verdoso que se precipitará.[64]

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

h) Índice de refracción. Según el MGA 0741. Se prepara la muestra, se calibra el aparato y se obtiene la lectura.[78]

i) Compuestos fenólicos. Según la CUBA GUIDELINE NRAG 870-88. Se pesó aproximadamente 1 g de EEP y se colocó en un vaso de precipitado de 50 mL, al cual se le adicionaron 15 mL de la solución cloroformo–acetona (2:1) inmediatamente se agitó y se mantuvo en reposo durante una hora a temperatura ambiente y finalmente se filtró. Al filtrado obtenido se le adicionaron 15 g de óxido de aluminio, se agitó y se filtró. Se lavó bien el papel filtro Whatman con cloroformo-acetona hasta eliminar todo el óxido de aluminio.

En otro papel filtro Whatman se colocaron 15 g de óxido de aluminio y se agregaron 5 mL de solución cloroformo-acetona. Se secaron los papeles filtro durante 30 min a una temperatura ~ 80° C, se enfriaron y finalmente se determinó el peso de cada uno. Posteriormente se efectuó el cálculo correspondiente, siguiendo la fórmula **(4)**:

$$\%\ \text{de compuestos fenólicos} = \frac{b_1 - b_2}{a} \times 100$$

$$a = \text{Peso de muestra del EEP} \qquad \textbf{(4)}$$

$$b_1 = \text{Peso del papel filtro con óxido de alumnio}$$

$$b_2 = \text{Peso de papel filtro con muestra}$$

j) Mezcla mecánica. Según la CUBA GUIDELINE NRAG 870-88. Se pesó aproximadamente 1g de EEP y se colocó en un vaso de precipitado de 50 mL, se adicionaron 15 mL de solución cloroformo–acetona (2:1), se agita y se mantiene durante 1 h a temperatura ambiente y después se filtró. El filtro con el sedimento se humedeció en 15 mL de la mezcla de cloroformo–acetona y se seca a 25 ° C hasta lograr un peso fijo.

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

La fórmula **(5)** para efectuar el cálculo fue:

$$\%\ \text{de impurezas mecánicas} = \frac{b_1 - b_2}{a} \times 100$$

$a = \text{Muestra de propóleo}$

$b_1 = \text{Peso de propóleo}$

$b_2 = \text{Peso del papel filtro}$

(5)

k) pH. Según el MGA-0701. Se efectúan 2 determinaciones y las lecturas se deben reportar hasta 0.01 unidades.[78]

l) Densidad. Según el MGA-0251 se determina con el picnómetro calibrado a 25°C y se efectúan 2 lecturas.[78]

m) Cuenta total de mesófilos aerobios. Según el MGA-0571. Recuento de microorganismos mesófilos aerobios se realiza con el método de vaciado en placa. Se informa el número de UFC por mililitro del producto.[78]

n) Cuenta total de hongos y levaduras. Según el MGA-0571. Recuento de hongos y levaduras, se realiza igual al recuento de microorganismos mesófilos, excepto que se utiliza el medio agar dextrosa-Sabouraud y se incuba entre 20 a 25°C de 5 a 7 días.[78]

o) Microorganismos patógenos. De acuerdo al MGA-FH 0170 se efectúa la determinación de algunos microorganismos tales como: *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. [84]

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

2) Tintura de equinácea

a) Descripción. Se inspecciona la muestra y se determinan las características organolépticas (olor, textura y color).[63]

b) Ensayos de identidad

(1) Cromatografía en Capa Fina. *(MGA- FH 0050)* Con el método clásico se empleó sílica gel (fase estacionaria) y se utilizó como fase móvil: n-hexano-acetato de etilo (2:1).[84, 96]

c) Solubilidad. MGA 0821.[78] Se determinó de acuerdo a lo descrito para propóleo y se determinó la solubilidad de acuerdo a la Tabla 1.

d) Densidad. Según lo indica el MGA-0251.

e) pH. Se efectúa según lo descrito en MGA-0701.

f) Índice de refracción. MGA 0741.Se determina como se describió en propóleo.

g) Presencia de *E. coli, Salmonella, Estafilococos*. MGA–FH 0170 Para *Escherichia coli* se prepara en caldo MacConkey y se incuba a 43- 45°C/18–24 h. *Staphylococcus sp.* se prepara en cultivo enriquecido y un subcultivo, se incuba a 35–37° C/24 – 48 h.[84] *Salmonella sp.* se prepara en un medio enriquecido y se incuba a 35–37°C/5–7 h.[84, 65]

h) Cuenta total de hongos y levaduras. Según el MGA-0571[78] y como se describió en la metodología para propóleo.

i) Cuenta total de mesófilos aerobios. Según el MGA-0571[78] y se describió anteriormente para propóleo.

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

c. Compatibilidad fármaco- excipiente

Las muestras se prepararon por duplicado en una proporción 1:1 de principio(s) activo(s) – excipiente, para lo cual se pesaron cantidades equivalentes de cada sustancia y se colocaron en frascos de vidrio ámbar con tapas de rosca. Las muestras se sometieron a condiciones de 20, 30 y 50° C también a 75 % HR a 50°C y se presentan en la Tabla 2.

TABLA 2. Las muestras preparadas y sometidas a la prueba de compatibilidad.

Principio(s) activo(s)	Excipiente
Propóleo	----------
Propóleo	Eudragit NE30D
Propóleo	NaCMC
Propóleo	PVP
Propóleo	Polietilenglicol
Propóleo	Manitol
Equinácea	----------
Equinácea	Eudragit NE30D
Equinácea	NaCMC
Equinácea	PVP
Equinácea	Polietilenglicol
Equinácea	Manitol
Propóleo + Equinácea	----------
Propóleo + Equinácea	Eudragit NE30D
Propóleo + Equinácea	NaCMC
Propóleo + Equinácea	PVP
Propóleo + Equinácea	Polietilenglicol
Propóleo + Equinácea	Manitol

Después de 20 días de someter las muestras a cada condición, se analizaron mediante técnicas visuales y CCF *(MGA- FH 0050)* se siguió el método clásico y el adsorbente utilizado *(MGA –FH 0200)* fue sílica gel y usando las fases móviles:

1) Propóleo. Tolueno- acetato de etilo- ácido fórmico (75:15:3), o bien: cloroformo-metanol-ácido fórmico. (75:5:4)[95]

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

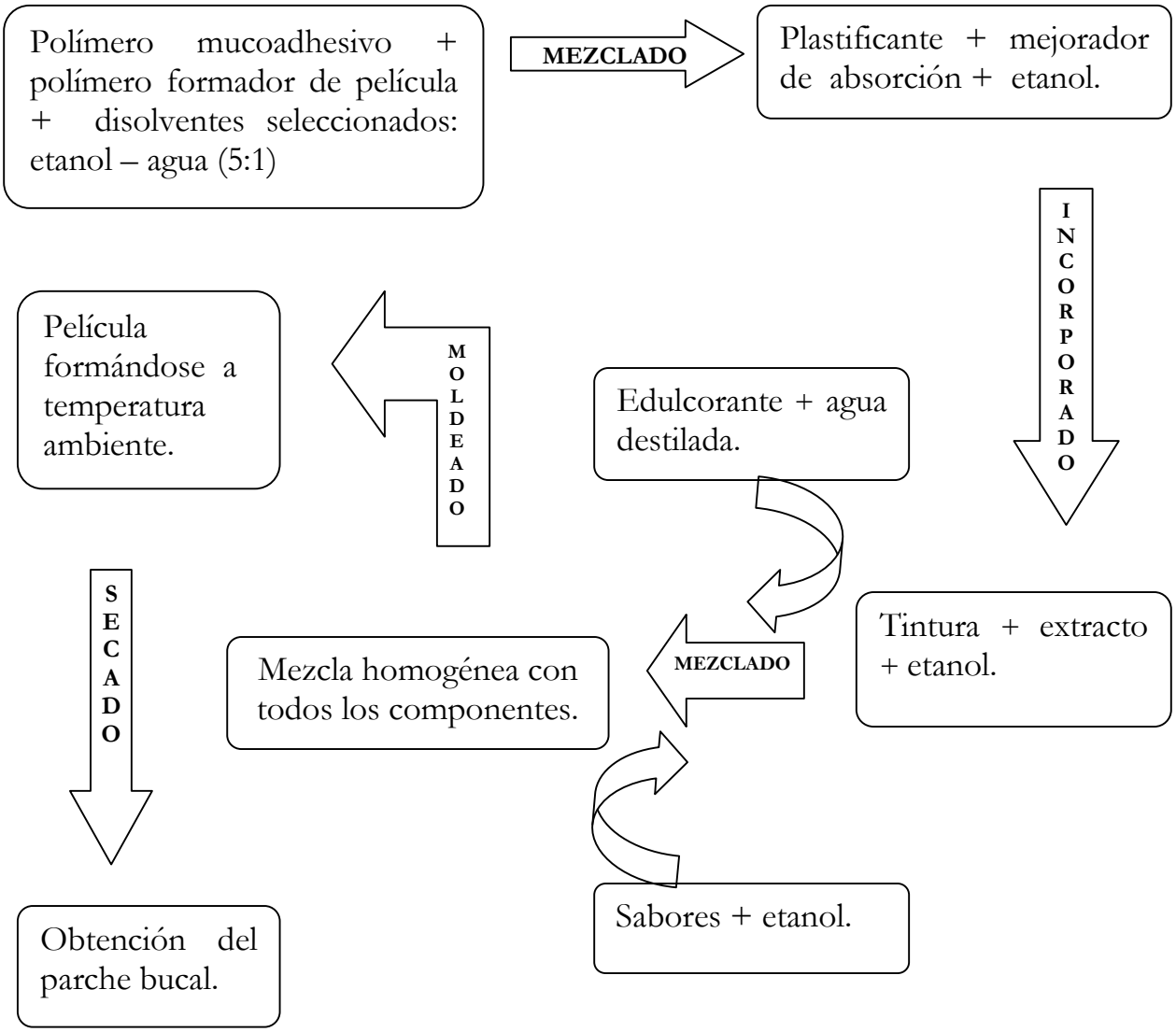
Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

2) Equinácea. n-hexano-acetato de etilo (2:1).[96]

3) Propóleo + Equinácea. n-hexano - acetato de etilo- ácido fórmico (75:15:3)[95, 96]

2. FABRICACIÓN DE LA FORMA FARMACÉUTICA

Para la fabricación de los parches bucales se utilizó el método del disolvente, el diagrama general se muestra a continuación.



Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

a. Preparación de las formulaciones

Se pesaron las cantidades correspondientes del polímero mucoadhesivo y del polímero formador de película, se vertieron en un vaso de precipitado con capacidad ~100 mL y se mezclaron con 30 mL de agua-etanol (5:1).

A la mezcla polimérica se le adicionó gradualmente la cantidad correspondiente del plastificante (PEG 400) al que previamente se le agregó la cantidad que pertenece al mejorador de absorción (IPM).

La mezcla se homogenizó manualmente con un agitador de vidrio durante 15 min, impidiendo la formación de burbujas y finalmente se agregaron 3 mL de etanol. Al obtener la mezcla homogénea sin grumos ni burbujas, se le agregaron las preparaciones herbales de equinácea y propóleo previamente disueltas en 2.5mL de etanol.

Después se añadió el edulcorante previamente pesado y disuelto en 2.2 mL de agua destilada y también se adicionaron los saborizantes (anís y menta) disueltos en 0.5 mL de etanol.

Se obtuvo una mezcla homogénea con todos los componentes que se vertió sobre una superficie plana de papel couche polypap con dimensiones de 10×5×1.5 cm, el cual se protegió con papel aluminio grueso para obtener mejor soporte y resistencia.

Finalmente la mezcla se dejó secar a temperatura ambiente durante 24h para eliminar los disolventes residuales.[20]

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

3. EVALUACIÓN FÍSICA DE LA FORMULACIÓN

TABLA 3. Criterios para la evaluación física de las formulaciones.

Prueba	Especificación
Apariencia	La muestra debe ser homogénea, traslúcida, libre de grumos o partículas extrañas.[17]
Color	Verde-amarillento anisocromático.
Sabor	Agradable, ligeramente dulce: anisado o mentolado.
Adhesividad	La muestra debe ser adecuadamente adhesiva. [17]

a. Apariencia

La muestra se observó a través con un lente convergente para determinar la presencia de burbujas o grumos dentro de la formulación, esta prueba se realizó por triplicado a través de una inspección visual.

b. Color

Se obtuvo la respuesta objetiva de 20 personas voluntarias. Los criterios son: Desagradable, Ligeramente desagradable, Normal y Agradable.

c. Sabor

Se determinó con la respuesta objetiva de 20 personas voluntarias. Los criterios son: Desagradable, Ligeramente desagradable, Insípido, Normal y Agradable.

d. Adhesividad

La muestra se colocó en un vidrio de reloj con un diámetro de 5 cm, el tamaño de la muestra es de 1 cm^2 y se le adicionaron 0.5 mL de agua destilada a 37° C. La muestra se sometió a una cámara de humedad a 37 ± 0.5° C y 75 ± 5 % de HR durante 1 h, se sustrajo y se sumergió en 1 mL de amortiguador de fosfatos a pH 6.8 y la muestra se presionó con el sistema modificado (ver Fig. 4) durante 20 seg.

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

En esta prueba se determinó la adhesividad por quintuplicado.[35, 41] Los criterios son: Ninguna, Ligera, Moderada y Adecuada.[17, 29]

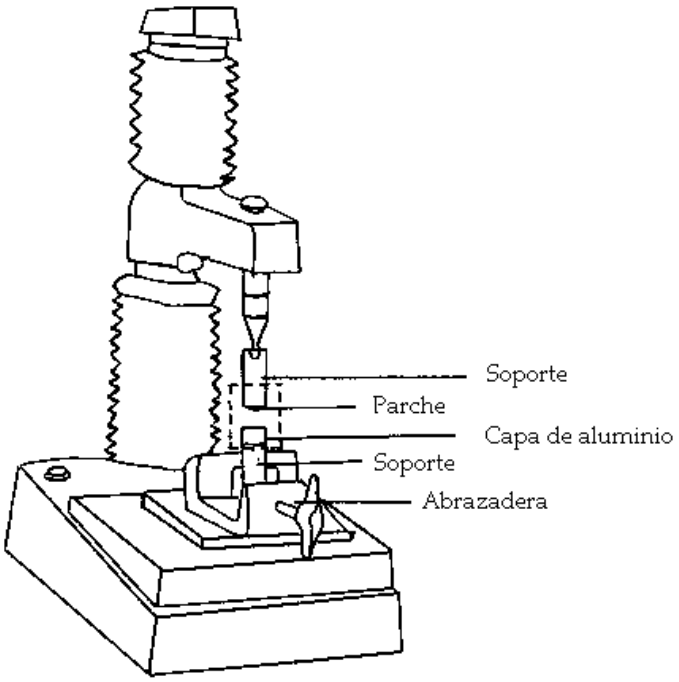


Figura 4. Sistema modificado para evaluar la adhesividad.[35]

4. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

a. Método espectrofotométrico para evaluar extracto etanólico de propóleo y tintura de equinácea.

El método analítico utilizado durante este estudio se sustentó en el hecho que ambos principios activos son sustancias cromóforas y por lo tanto son capaces de absorber en la región UV, lo cual se comprobó con los espectros obtenidos para cada uno de los ingredientes activos (ver Anexo 1).

El desarrollo del método se logró con los resultados obtenidos en el barrido del espectro UV – Visible de los 700 a 200 nm para cada ingrediente activo, en los cuales se pudieron observar los máximos a las longitudes de onda seleccionadas: 210.8 y 257.5 nm.

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

A los resultados obtenidos se aunó lo reportado para la cuantificación del propóleo *González y col*, que desarrollaron 3 métodos espectrofotométricos[59] y para la cuantificación de equinácea *Oomah y col*, emplearon diversas técnicas analíticas: fluorescencia, calorimetría de barrido diferencial (DSC), HPLC, CCF y espectroscopia UV de la cual reportaron que *Echinacea purpurea* absorbe de 232 a 390 nm.[90]

1) Preparación de la curva estándar. Se pesaron exactamente 0.7500 g de tintura de equinácea y 0.2500 g de extracto etanólico de propóleo, ambas sustancias se colocaron en un matraz aforado de 100 mL, se diluyó con una solución amortiguadora de fosfatos a pH 6.8 hasta la marca de aforo. La solución obtenida se sumergió en un baño ultrasónico durante 2 min.

De la solución anterior se midieron 6.25, 1.25 y 3.75 mL con una bureta de 10 mL y cada uno se colocó en matraces de 25 mL y se aforaron con la solución amortiguadora antes mencionada.

Simultáneamente se midieron 1 y 2 mL de la solución inicial, cada uno se colocó por separado en un matraz volumétrico de 10 mL de capacidad y cada uno se llevó al aforo. Las soluciones obtenidas se sumergieron en el baño ultrasónico durante 2 min.

2) Preparación del blanco A. Solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8[78]

3) Preparación del blanco B. Se prepararon 10 mL de placebo equivalentes a 4.6225 cm^2 de parche bucal, para dicha preparación se pesaron los excipientes y se agregó el volumen correspondiente de solución amortiguadora de fosfatos 6.8.

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

b. Validación del método propuesto

La validación del método propuesto fue evaluado siguiendo lo recomendado por la USP y *Guidelines ICH*.[89] Los parámetros analíticos evaluados en la fueron los siguientes:

1) Selectividad. Se estableció que los principios activos se podían evaluar espectrofotométricamente en la región UV y cada uno emitió un máximo en longitudes de onda diferentes. Una vez que se obtuvieron los espectros de ambos principios activos se determinó que era necesario evaluar cada componente de la formulación. A continuación, se analizó cada excipiente por separado, se preparó a la concentración en la que se encuentra dentro de la formulación y se disolvió en una solución amortiguadora de fosfatos (pH 6.8) para su evaluación. De cada uno de los excipientes se determinó su capacidad de absorción en el rango de longitud de onda utilizado (UV).

2) Linealidad. Este parámetro se determinó mediante la construcción de una curva estándar de concentración (x) en función de la absorbancia (y). Se utilizaron cinco diferentes niveles de concentración, las cuales se prepararon a partir de una misma solución estándar y se efectúo un análisis por triplicado para cada dilución. Con los datos obtenidos se calcularon el coeficiente de correlación r, el coeficiente de determinación r^2 y los parámetros de regresión. Los criterios de aceptación son $r \geq 0.99$ y $r^2 \geq 0.98$.

3) Precisión y exactitud. La precisión se determinó mediante el análisis por sextuplicado de la muestra de propóleo y equinácea. Con los datos obtenidos se calculó el coeficiente de variación. Para evaluar la exactitud se preparó un placebo analítico con los componentes presentes en la forma farmacéutica. A la cantidad de placebo analítico equivalente a una muestra se le adicionó la cantidad de equinácea y propóleo correspondientes al 100 % presente en la muestra. Los

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

placebos adicionados se analizaron bajo las mismas condiciones, utilizando como referencia a equinácea y propóleo. Se determinó la cantidad recuperada del analito. El criterio de aceptación del coeficiente de variación para métodos espectrofotométricos es CV< 3 %.

4) Precisión intermedia. Se analizaron por triplicado una muestra homogénea cuyo contenido se encontraba incluido en el intervalo lineal de las concentraciones que conforman la linealidad del método. Este análisis se efectuó utilizando el mismo equipo bajo las mismas condiciones de operación. En muestras independientes para cada ingrediente activo, se determinó el coeficiente de variación para el cual se establece que CV ≤ 3%.

5) Estabilidad de la muestra. Se determinó por medio del monitoreo del contenido del propóleo y de equinácea a diferentes tiempos. Se preparó una solución que contenía ambos ingredientes activos en su equivalente al 100%, se disolvieron en la solución amortiguadora de fosfatos 6.8 y se llevó a cabo el análisis (t = 0). Esta solución se almacenó en un lugar obscuro y se efectuaron las lecturas a las 2, 4, 8 y 24 hs; cada análisis se comparó contra una solución estándar preparada recientemente antes de cada análisis. El criterio de aceptación es que los ingredientes activos son estables si no existe diferencia significativa entre los valores obtenidos del contenido entre los diferentes muestreos.

5. PRUEBAS DE CONTROL

a. Variación de peso

Se determinó el peso de los parches bucales. La prueba se efectuó en diez parches. Se calcularon la media y desviación estándar.

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

b. Resistencia al doblar

La resistencia se determinó al doblar los parches repetidas veces. El parche se dobló en el mismo lugar hasta que se rompió y el número de veces que la película resistió a la dobladura sin romperse proporcionó el valor de la resistencia.[82]

c. Medida de hinchamiento

Se determinó colocando las películas poliméricas en 5 mL de amortiguador de fosfatos a pH 6.8, el hinchamiento se midió cada 50 seg en un intervalo de 3 min a temperatura ambiente. En cada intervalo predeterminado de tiempo, los residuos del amortiguador se eliminaron y se pesó la película hinchada. El hinchamiento se calculó empleando la fórmula **(6)**:

$$\% \text{ Hinchamiento} = \left[\left(\frac{W_p - W_s}{W_s}\right)\right] \times 100 \qquad \textbf{(6)}$$

donde W_s y W_p son el peso de la película seca antes de la prueba y el peso de la película hinchada después de someterla a la prueba, respectivamente.[27]

6. PRUEBA DE DISOLUCIÓN

TABLA 4. Requerimientos para efectuar la prueba de disolución.

Selección	Condiciones
1. Aparato de disolución	Celda de Franz
2. Medio de disolución	Solución reguladora de fosfatos pH = 6.8
3.Selección de condiciones hidrodinámicas a) Velocidad b) Temperatura c) Tiempo	Recolectar muestras de 3 mL.[50] a) 150 rpm b) 37 ± 1 ° C [50, 83] c) Muestrear a intervalos de tiempo fijos: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 y 60 min.[82]

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

a. Descripción del sistema para la prueba de disolución

Se utilizó como baño maría un refractario Pyro-rey® que contenía agua destilada (~750 mL), para mantener la temperatura a 37°C ± 1°C se empleó una placa de calentamiento y agitación Thermolyne. ®

La placa Thermolyne® se empleó para consolidar 2 condiciones hidrodinámicas, velocidad y te

Posteriormente, se sumergieron las 3 celdas de Franz y para recolectar las muestras en los tiempos predeterminados se empleó un cronómetro. Para la obtención de la muestra, se extrajo el volumen establecido y se vertió en un tubo de ensayo (10×75 mm). Las muestras obtenidas se analizaron con el espectrofotómetro UV para determinar la cantidad liberada de los principios activos.[94]

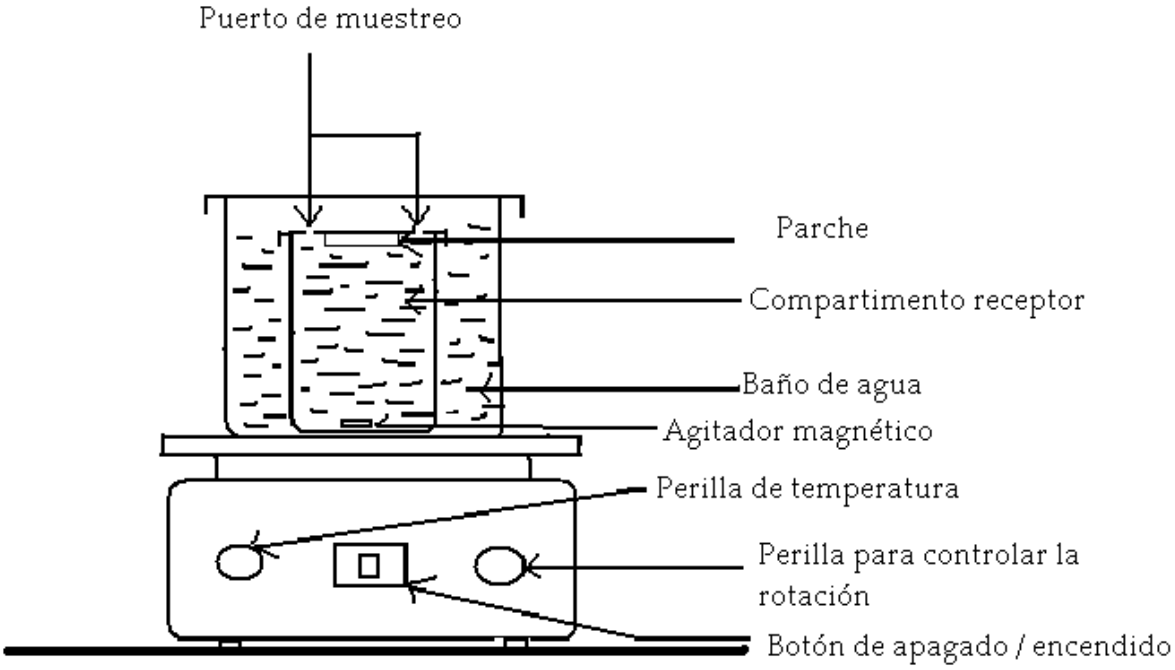


Figura 5. Aparato para la prueba de disolución.[94]

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

1) Aparato de disolución. La celda de Franz (Fig. 6), se caracteriza por tener un volumen efectivo, aproximado a 125 mL del medio de disolución en el compartimento receptor y hay un área superficial apropiada para la colocación del parche bucal.[82, 83] Las limitaciones de las propiedades hidrodinámicas han sido controladas con la introducción del sistema desarrollado por *Budhathoki & Thapa,* debido a que el mezclado es eficiente y la temperatura es controlada durante la experimentación. (Fig.5)[94]

Los parámetros de funcionamiento críticos son la velocidad de agitación en el medio receptor, el volumen de muestra colectada a partir del medio receptor y la temperatura de la cámara receptora,[27] para tener la agitación requerida se empleó una barra magnética cilíndrica, para la recolección de la muestra se empleó una jeringa sin aguja de 100 unidades DM-medicrat® y la temperatura de la cámara receptora constantemente se controló.

Figura 6. Celdas de Franz empleadas para la prueba de disolución.

2) Medio de disolución. Se disuelve 28.8 g de fosfato dibásico de sodio y 11.45 g de fosfato monobásico de potasio, se diluye en 1000 mL.[78]

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

3) Eficiencia de disolución. La eficiencia de disolución (ED) es un modelo independiente, que consiste en estimar el área bajo la curva de disolución entre dos puntos dados. La eficiencia de disolución se calculó de acuerdo a la ecuación **(7)**:

$$ED_t = \frac{\int_0^t y \; dt}{y_{100} \; t \times 100} \qquad \textbf{(7)}$$

en donde la integral representa el área bajo la curva de disolución entre el tiempo cero y en t, y es el porcentaje del ingrediente activo liberado hasta el tiempo t, mientras que y_{100} indica 100 por ciento liberado; t en nuestro estudio fue de 30 minutos. [101]

4) Cinética de disolución. Análisis matemático mediante el cual se determina la velocidad de disolución. Para calcular la cinética de liberación de ambos ingredientes activos en la formulación elegida, se estimaron algunos modelos matemáticos como: orden cero, primer orden, de Higuchi y de Hixson & Crowell. El criterio para distinguir el modelo más apropiado se basó en el valor obtenido en el coeficiente de determinación (r^2).

7. EVALUACIÓN DE LA FACTIBILIDAD DE LA MATRIZ POLIMÉRICA SELECCIONADA

a. pH de superficie

Los parches bucales se dejaron hinchar durante 2 min dentro de una caja de Petri que contenía 0.7 mL de una solución amortiguadora de fosfatos isotónica. En la superficie del parche hinchado se colocó el papel pH Neutralit® con el cual se midió el pH de superficie, se efectuaron 3 determinaciones y la media de las lecturas se registró.

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

b. Viscosidad

Las soluciones acuosas que contienen los polímeros con el plastificante se prepararon en la misma concentración de los parches. Se utilizó el viscosímetro Broockfield con aguja LV número 64 y se determinó con 30 rpm a temperatura ambiente. Se registraron los valores y se obtuvo la media de 3 determinaciones.[82]

c. Uniformidad de contenido

Esta prueba se basa en la determinación cuantitativa del contenido individual de los principios activos, para lo cual se analizan individualmente. El parche bucal se disolvió en 100 mL de solución amortiguadora isotónica (pH 6.75), el contenido del (los) principio(s) activo(s) en la formulación se determinó espectrofotométricamente en UV y se efectuaron 3 determinaciones.

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

VI. RESULTADOS

A. Selección de excipientes

TABLA 5. Función de los excipientes empleados dentro de la formulación.

COMPONENTE	FUNCIÓN
Carboximetilcelulosa de sodio	Polímero mucoadhesivo
Eudragit NE30 D	Polímero formador de película
Polivinilpirrolidona	Polímero formador de película
Polietilenglicol 400	Plastificante
Propóleo	Principio activo
Equinácea (*Echinacea purpurea*)	Principio activo
Manitol	Edulcorante
Miristato de isopropilo	Mejorador de absorción
Menta	Saborizante
Anís	Saborizante

B. Caracterización de los principios activos

TABLA 6. Certificado de análisis del propóleo.

DETERMINACIÓN	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
* 1. Descripción a) Color b) Olor c) Sabor d) Estructura e) Consistencia	Material resinoso producido por las abejas, suspendido en etanol. a) Castaño oscuro o rojo. b) Característico, resinoso, aromático proveniente de la mezcla del olor de hierbas aromáticas y miel. c) Resinoso, amargo, ligeramente fuerte. [56] d) Presencia de deformaciones heterogéneas. e) De 25 a 40 ° C es líquido, a menos de 20 ° C es dura.	a) Café oscuro e intenso. b) Penetrante, aromático, característico. c) Resinoso, astringente y ligeramente amargo. d) Presenta deformaciones heterogéneas. e) Líquido translúcido.
2. Ensayos de identidad a) Reacción de Shinoda b) Identificación con CCF	Positiva Positiva	POSITIVA POSITIVA
3. Solubilidad	Soluble en etanol e insoluble en cloroformo.	Soluble en etanol, acetona, y acetato de etilo, muy ligeramente soluble en hexano y cloroformo.
4. Resinas solubles etanol	Del 70 al 85 %	88.46 %
5. Índice de oxidación	No mayor a 22 seg.	CONFORME
6. Cera	Del 15 al 30 %	14.8116 %
7. Reacción cualitativa de compuestos fenólicos	Presencia de precipitado amarillo-verdoso	CONFORME
* 8. Índice de refracción	1.3325 – 1.3755	1.3438
9. Compuestos fenólicos	No menos de 30 %	52.52 %
10. Mezcla mecánica	No más del 20 %	7.31 %
* 11. pH (25° C)	5.0 – 6.0	5.72
* 12. Densidad (20° C)	0.900 – 1.010 g/mL	0.975 g/mL
* 13. Cuenta total de mesófilos aerobios	100 UFC/g	CONFORME
* 14. Cuenta total de hongos y levaduras	100 UFC/g	CONFORME
* 15. Microorganismos patógenos	Ausencia	CONFORME
* Especificaciones realizadas por el Laboratorio *Mixim*		

TABLA 7. Certificado de análisis para equinácea.

DETERMINACIÓN	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
* 1. Descripción a) Color b) Olor	Extracto líquido o tintura que posee 30% de contenido hidroalcohólico con color verde claro a amarillento con olor y sabor característico. La tintura posee un color ámbar, ligeramente turbia y con sabor característico. [65, 73]	Líquido ligeramente turbio con olor y sabor característico, presenta un color ámbar rojizo.
2. Ensayos de identidad a) Identificación del perfil por CCF	Positiva	POSITIVA
4. Solubilidad	Soluble en agua	Fácilmente soluble en agua, soluble en etanol, metanol, acetona y acetato de etilo, muy ligeramente soluble en hexano y cloroformo.
* 5. Densidad (20° C)	0.895 – 1.020	0.976
* 6. pH (20° C)	5.5 – 6.5	6.1
* 7. Índice de refracción	1.3365 – 1.3540	1.3447
* 8. Presencia de *E.coli*, *Salmonella sp*; *Staphylococcus sp.*	Negativo [84]	NEGATIVO
* 9. Cuenta total de hongos y levaduras	Máximo 100 UFC/g	CONFORME
* 10. Cuenta total de mesófilos aerobios	100 UFC/g	CONFORME
* 11. Microorganismos patógenos	Ausencia	CONFORME
* Pruebas reportadas por el proveedor Bioextracto		

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

C. Compatibilidad

TABLA 8. Resultados de la compatibilidad entre el principio activo, polímeros y plastificante propuestos (condiciones de 20, 30, 50° C y 75 % HR/50°C) durante 30 días.

Principio(s) activo(s)	Polímero	20 ° C	40 ° C	50 ° C	75 % HR a 50 ° C
Propóleo	Eudragit NE30D	—	☑	—	—
Propóleo	NaCMC	—	—	—	—
Propóleo	PVP	—	—	—	—
Propóleo	Polietilenglicol	—	—	—	—
Propóleo	Manitol	—	—	—	—
Equinácea	Eudragit NE30D	—	☑	—	—
Equinácea	NaCMC	—	—	—	—
Equinácea	PVP	—	—	—	—
Equinácea	Polietilenglicol	—	—	—	—
Equinácea	Manitol	—	—	—	—
Propóleo + Equinácea	Eudragit NE30D	—	☑	—	—
Propóleo + Equinácea	NaCMC	—	—	—	—
Propóleo + Equinácea	PVP	—	—	☑	—
Propóleo + Equinácea	Polietilenglicol	—	—	—	—
Propóleo + Equinácea	Manitol	—	—	—	—

— No hay cambio químico ni físico
☑ Hay cambio físico
· Hay cambio químico

TABLA 9. Resultados de la compatibilidad obtenidos en CCF, únicamente para las muestras que presentaron un cambio físico.

CONDICIÓN	INGREDIENTES ACTIVOS	Rf	MEZCLAS DE LOS COMPONENTES	Rf
40 °C	Propóleo	0.40	Propóleo + Eudragit NE30D	0.39
40 °C	Equinácea	0.55	Equinácea + Eudragit NE30D	0.53
40 °C	Propóleo + Equinácea	0.57	Propóleo + Equinácea + Eudragit NE 30D	0.55
50 °C	Propóleo + Equinácea	0.58	Propóleo + Equinácea + PVP	0.58
50 °C	Propóleo + Equinácea	0.58	Propóleo + Equinácea + PVP	0.58

Rf = Factor de desplazamiento o índice de retención.

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

D. Formulaciones

TABLA 10. Resultados de las formulaciones propuestas.

FORMULACIÓN	% POLÍMERO			% PLASTIFICANTE	% PRINCIPIO ACTIVO		% EDULCORANTE	% SABORIZANTES		% MEJORADOR
	A MUCOADHESIVO	B	C		A	B		A	B	
		FORMADOR DE PELÍCULA								
1	34	17	-----	24.5	5	15	2	0.75	0.75	1
2	30	15	-----	30.5	5	15	2	0.75	0.75	1
3	38	20	-----	17.5	5	15	2	0.75	0.75	1
4	30	-----	30	15.5	5	15	2	0.75	0.75	1
5	35	----	23	17.5	5	15	2	0.75	0.75	1
6	25	----	20	30.5	5	15	2	0.75	0.75	1
7	40	----	15.5	20	5	15	2	0.75	0.75	1
8	40	----	12.5	23	5	15	2	0.75	0.75	1
9	35	----	15.5	25	5	15	2	0.75	0.75	1
10	35	----	17.5	23	5	15	2	0.75	0.75	1
11	30	----	17.5	28	5	15	2	0.75	0.75	1
12	30	----	20.5	25	5	15	2	0.75	0.75	1

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

1. EVALUACIÓN FÍSICA

TABLA 11. Resultados de las pruebas efectuadas a las formulaciones propuestas.

Formulación	Apariencia	Sabor	Color	Adhesividad
1	Heterogénea, presenta grumos y opaca.	Agradable	Normal	Moderada
2	Heterogénea, opaca, presenta grumos grandes.	Ligeramente desagradable	Ligeramente desagradable	Moderada
3	Heterogénea, presenta grumos muy grandes y burbujas.	Agradable	Desagradable	Ligera
4	CORRESPONDE	CORRESPONDE	CORRESPONDE	CORRESPONDE
5	CORRESPONDE	CORRESPONDE	CORRESPONDE	CORRESPONDE
6	Homogénea, opaca con capa ligeramente blanquecina y presenta pequeños grumos.	Normal	Agradable	Adecuada
7	CORRESPONDE	CORRESPONDE	CORRESPONDE	CORRESPONDE
8	Homogénea, presenta grumos y burbujas.	Normal	Ligeramente desagradable	Adecuada
9	Homogénea, opaca con capa blanquecina y presenta pequeños grumos.	Agradable	Desagradable	Adecuada
10	CORRESPONDE	CORRESPONDE	CORRESPONDE	CORRESPONDE
11	Homogénea, opaca y presenta grumos.	Ligeramente desagradable	Normal	Adecuada
12	CORRESPONDE	CORRESPONDE	CORRESPONDE	CORRESPONDE

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

TABLA 12. Resolución de la evaluación física de las formulaciones.

FORMULACIÓN	EVALUACIÓN	FORMULACIÓN	EVALUACIÓN
1	NO SE ACEPTA	7	**SE ACEPTA**
2	NO SE ACEPTA	8	NO SE ACEPTA
3	NO SE ACEPTA	9	NO SE ACEPTA
4	**SE ACEPTA**	10	**SE ACEPTA**
5	**SE ACEPTA**	11	NO SE ACEPTA
6	NO SE ACEPTA	12	**SE ACEPTA**

E. Desarrollo del método analítico

Para establecer las condiciones experimentales, con las cuales se lograran lecturas eficaces para el método analítico, se obtuvieron los espectros de cada sustancia empleada en la formulación. En el ANEXO 1 se muestran los espectros UV obtenidos para cada uno de los ingredientes activos, equinácea y propóleo; de ambos ingredientes activos y de la mezcla de excipientes de la formulación.

F. Validación

El ANEXO 2 contiene la información obtenida para la validación de cada uno de los ingredientes activos, de tal manera que se muestran las tablas correspondientes a los resultados.

En este ANEXO se incluyen los valores para cada uno de los parámetros evaluados los cuales fueron: linealidad y precisión del sistema, linealidad del método, repetibilidad, exactitud, precisión intermedia y estabilidad de la muestra.

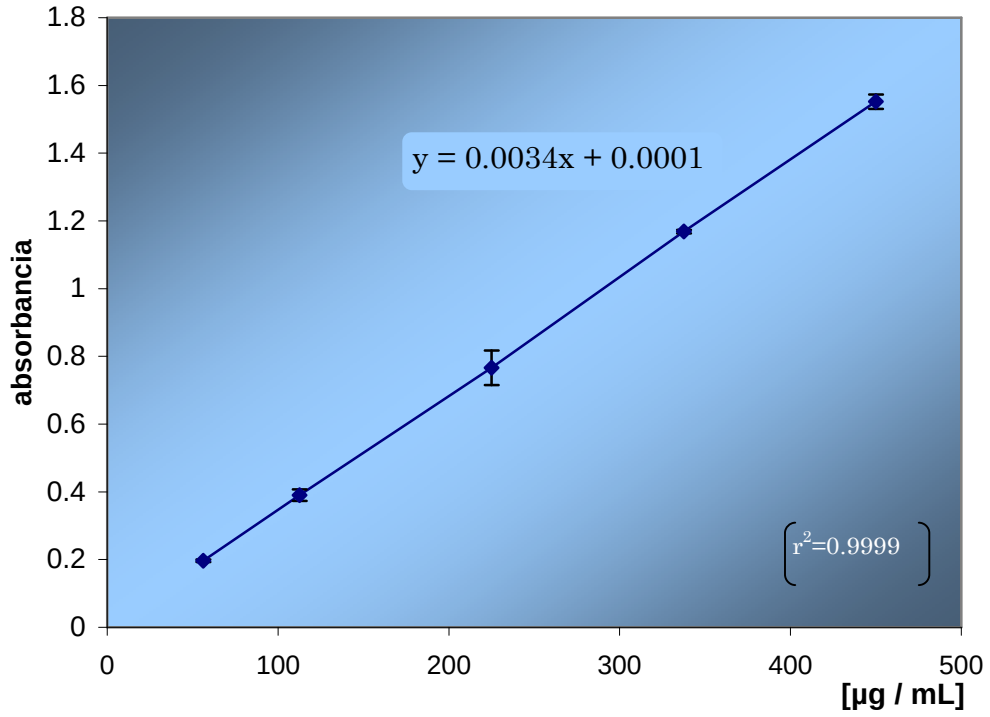
En la sección A se exhiben los cálculos evaluados para **Equinácea** y en la sección B se presentan los cálculos estimados para **Propóleo.**

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

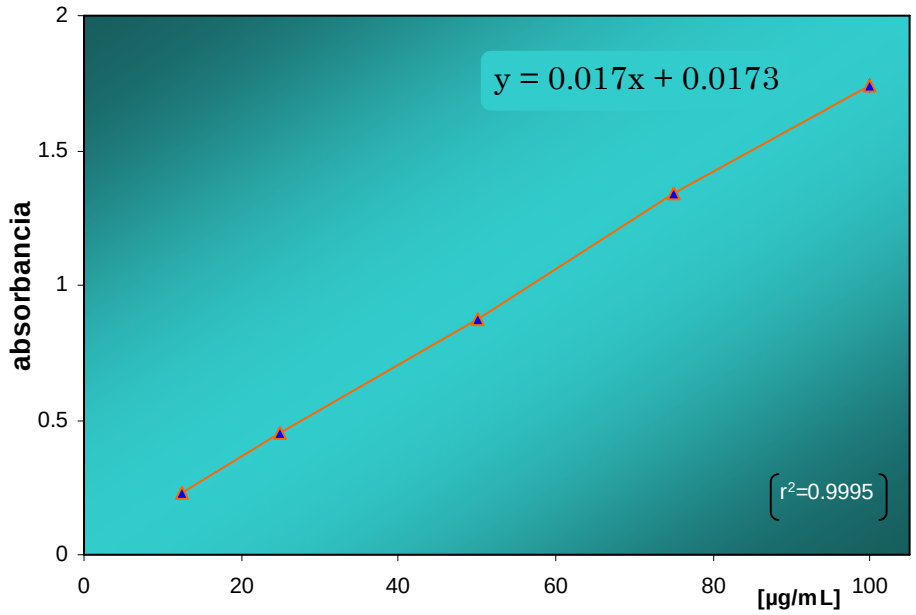
Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

1. SISTEMA

ESQUEMA 1. Linealidad del sistema para la tintura de equinácea.



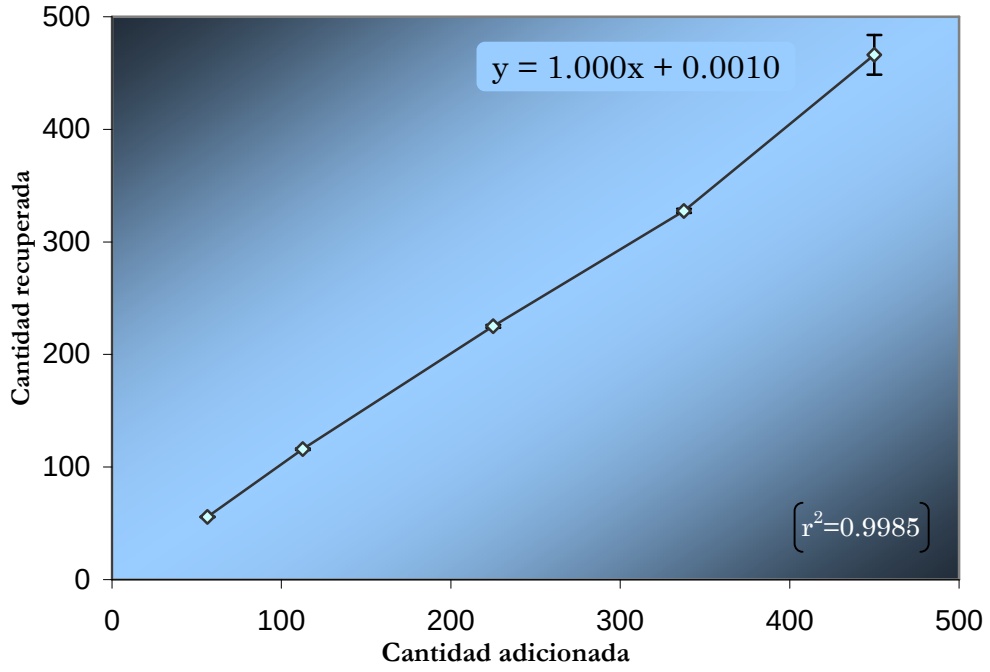
ESQUEMA 2. Linealidad del sistema para el extracto etanólico de propóleo.



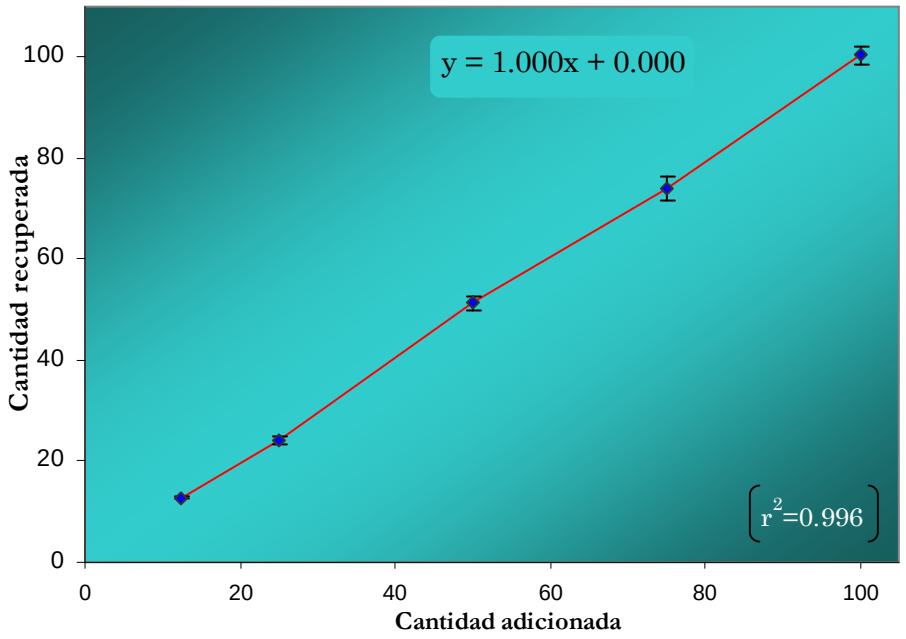
Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

ESQUEMA 3. Linealidad del método para la tintura de equinácea.



ESQUEMA 4. Linealidad del método para el extracto etanólico de propóleo.



Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

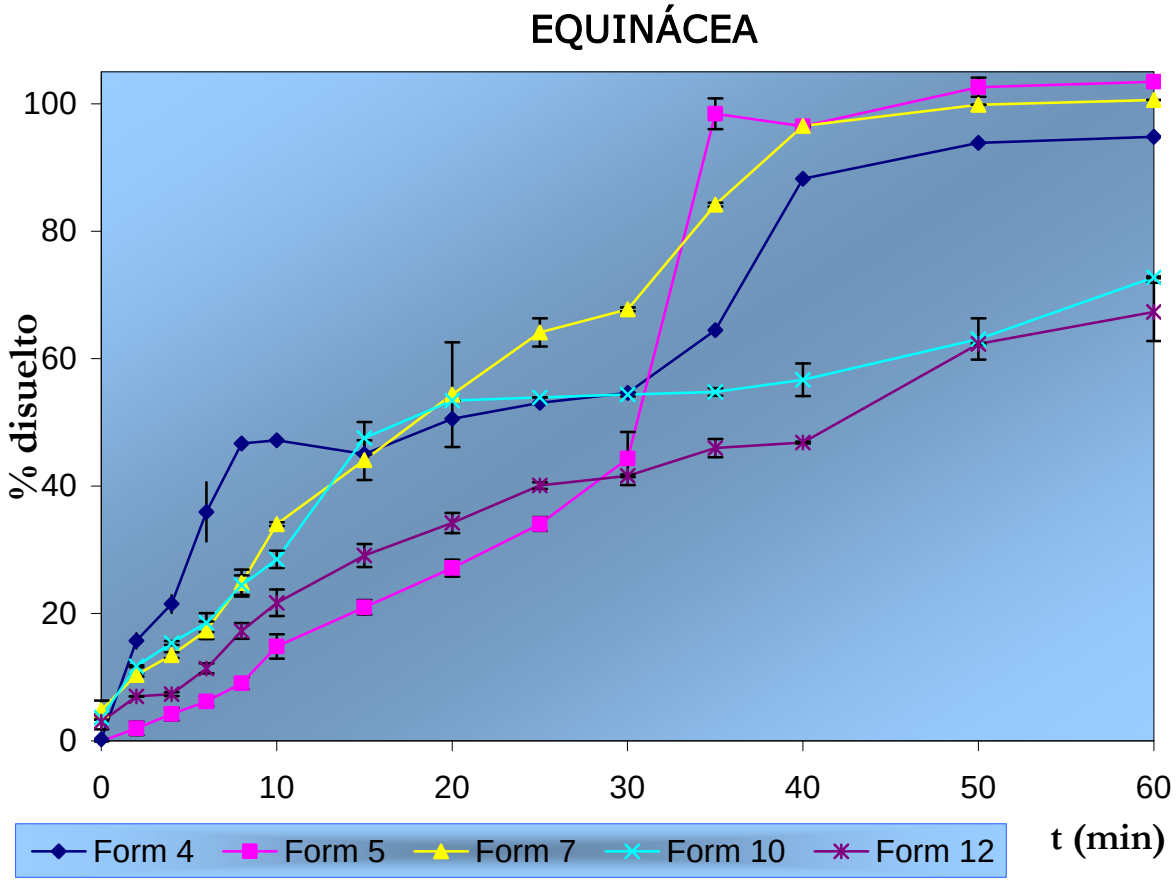
G. Características de los parches bucales

TABLA 13. Caracterización de las formulaciones sugeridas para ser utilizadas como parche bucal.

Formulación	Variación de peso (g)		Resistencia al doblar	Medida de hinchamiento
	$\bar{x} \pm \sigma$	n		
4	0.9933 ± 0.0229	10	56	95.45 %
5	0.9269 ± 0.0073	10	53	94.87 %
7	0.9634 ± 0.0151	10	83	96.35 %
10	0.9378 ± 0.0144	10	62	97.77 %
12	0.9748 ± 0.0466	10	42	91.43 %

H. Disolución

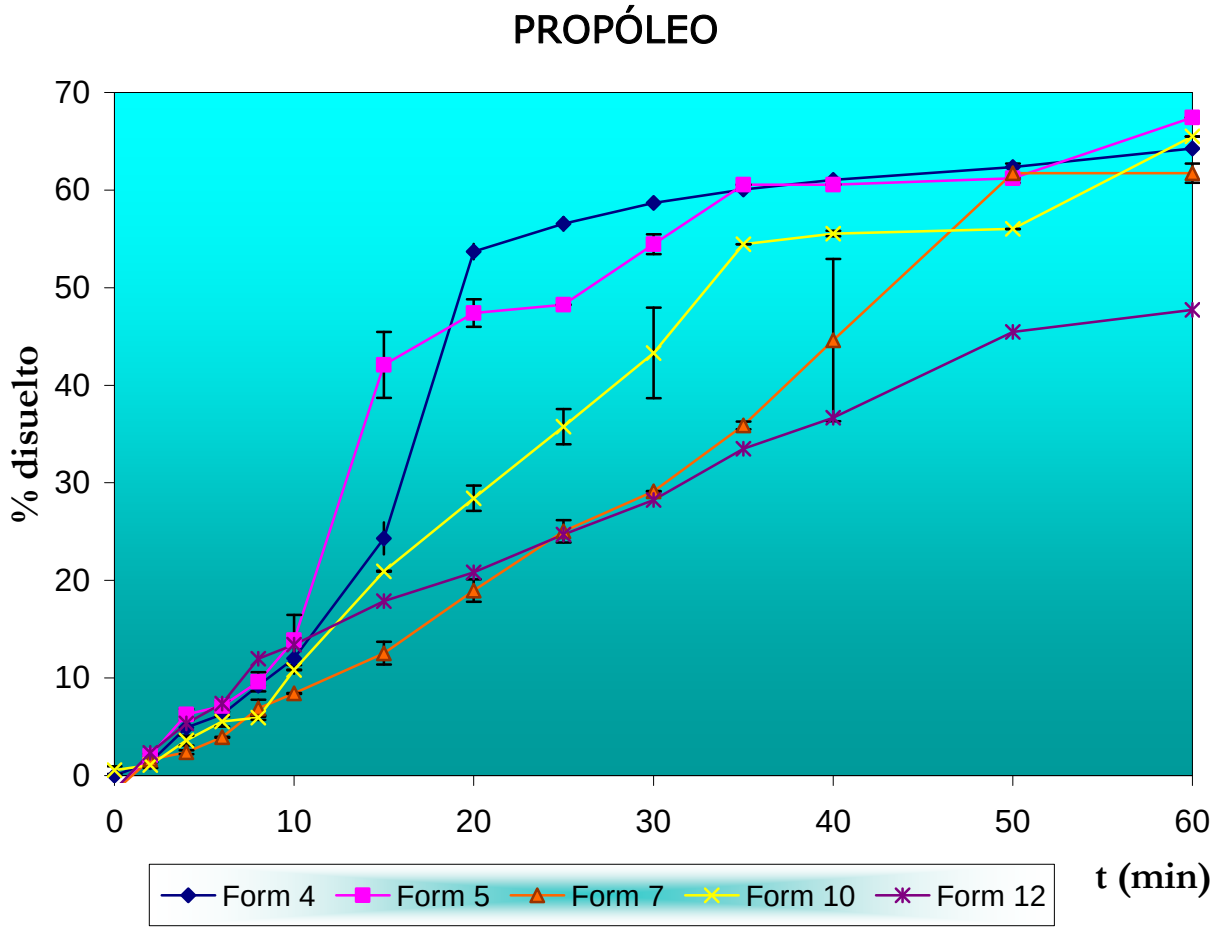
Los perfiles de liberación para las formulaciones 4, 5, 7, 10 y 12 se muestran en el ANEXO 3, lo



GRÁFICA 1. Perfiles de liberación obtenidos para equinácea en las formulaciones probadas.

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!



GRÁFICA 2. Perfiles de liberación obtenidos para propóleo en las formulaciones probadas.

I. Criterios de comparación para las formulaciones

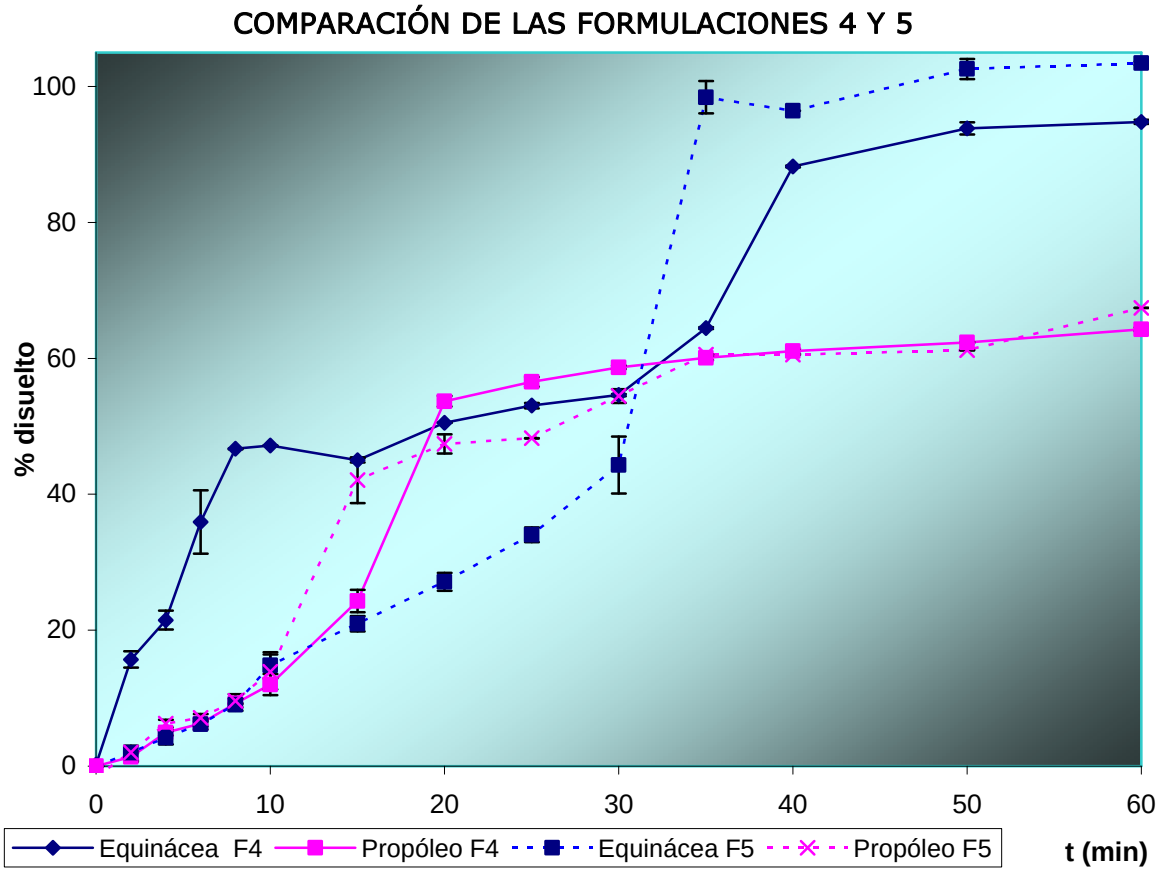
TABLA 14. Valores de la eficiencia de disolución a los 30 minutos para ambas formulaciones.

FORMULACIÓN	EFICIENCIA DE DISOLUCIÓN(ED_{30}) % ± SD[1]	
	EQUINÁCEA	PROPÓLEO
4	87 % ± 0.436	65% ± 0.375
5	69 % ± 3.660	68% ± 1.769

[1] DESVIACIÓN ESTÁNDAR

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!



GRÁFICA 3. Contraste de los perfiles de liberación obtenidos para los ingredientes activos en las formulaciones 4 y 5

El ANEXO 4 contiene los cálculos correspondientes a la cinética de Higuchi para ambos principios activos.

TABLA 15. Estimaciones para la cinética de disolución.

ECUACIÓN	INGREDIENTE ACTIVO
% ND = %ND$_o$ – kt	----------
% ND = 98.6155 – 11.9877 t	EQUINÁCEA
% ND = 110.7552 – 10.9368 t	PROPÓLEO
% ND = Por ciento no disuelto y **k** = constante de la velocidad de disolución	

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

J. Pruebas finales

1. EVALUACIÓN DE LA FACTIBILIDAD DE LA MATRIZ POLIMÉRICA

TABLA 16. Evaluación final de las formulaciones sometidas a la prueba de disolución.

Formulación	pH de superficie	Viscosidad [1]
4	7.0	2700 cpoises
5	7.0	2700 cpoises
7	7.0	3100 cpoises
10	7.0	3300 cpoises
12	7.0	3800 cpoises
[1] Viscosímetro Brookfield modelo LV aguja No. 64 a 30 rpm		

2. UNIFORMIDAD DE CONTENIDO

TABLA 17. Determinación crítica de la homogeneidad del contenido

Formulación	Uniformidad de contenido	
	EQUINÁCEA	PROPÓLEO
m_1	100.5848 %	96.3227 %
m_2	104.5532 %	102.5944 %
m_3	102.9658 %	94.3393 %
m_4	103.1642 %	97.3947 %
m_5	107.1870 %	97.3947 %
$\bar{x} \pm SD^1$	103.6910 ± 2.4196	97.6092 ± 3.0533
CV	2.3334	3.1281

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

A. Preformulación

Los excipientes seleccionados para la formulación inicialmente se enlistan en la Tabla 5, donde se propusieron excipientes que pudieran dar las características de una formulación de parche bucal: de película mucoadhesiva, edulcorante, mejoradores de absorción y saborizantes, además de los compuestos activos. Previamente a la propuesta de formulación se efectuó un estudio de compatibilidad fármaco – excipiente a 20°, 40° y 50° C que se llevó a cabo durante 30 días, los resultados obtenidos se registran en la Tabla 8.

A través de la inspección visual se observó un cambio físico en propóleo – eudragit NE30D (40° C) y en la mezcla equinácea: propóleo – eudragit NE30D (40° C), debido a que el polímero presentó un cambio de color. De forma más ligera en equinácea – eudragit NE30D a (40° C); es decir, donde el polímero eudragit NE30D adquiere la tonalidad (color) de la tintura, más intensamente en la mezcla propóleo – eudragit NE30D a 40 °C que la mezcla equinácea – eudragit NE30D a 40 °C; cabe señalar que en las otras muestras se reportó que no presentan interacción, ya que no se presentó ningún cambio como el antes mencionado.

La coloración que presentó el polímero (eudragit NE30D) corresponde a los pigmentos naturales que contienen las preparaciones herbales de los ingredientes activos y también se debe al contenido etanólico del extracto (propóleo) y al contenido hidroalcohólico de la tintura (equinácea), pues al mezclar el polímero con etanol las muestras presentaron turbiedad. Sin embargo, el cambio de coloración en las muestras no fue una condición suficiente para omitir al eudragit NE30D dentro de las formulaciones, debido a que la evaluación que se realizó también por CCF, donde se encontró que los activos no tenían cambio en sus Rf

(Tabla 9) cuando estaban en combinación con el Eudragit contrastado con el activo solo, ambos corridos en las mismas condiciones.

Otro cambio que se presentó fue en la muestra de equinácea: propóleo – PVP (50° C) donde se detectó la presencia de minúsculos grumos, dado que el estudio de compatibilidad se efectuó en una proporción 1:1 y que dentro de la formulación la PVP se encuentra en una cantidad menor, equivalente al 30% o menos y aunado al hecho que la CCF reveló que no existe un cambio en el ingrediente activo, se sugirió que podría utilizarse como polímero dentro de la formulación.

Por otra parte, no se efectuó la compatibilidad principio(s) activo(s) – saborizante(s), principio(s) activo(s) – edulcorante, ni principio(s) activo(s) – mejorador de absorción; debido al bajo porcentaje (2, 1 y 0.75%) utilizado dentro de la formulación del edulcorante, del mejorador de absorción y de los saborizantes, respectivamente. A través de los resultados obtenidos se infiere que los excipientes seleccionados pueden estar en combinación para una formulación de parche bucal.

Los ingredientes activos equinácea y propóleo en este estudio son de origen natural y cuya presentación es una tintura y un extracto respectivamente, el control de calidad de los mismos es por lo tanto de gran utilidad y podría evidenciar la presencia de condiciones de pureza no susceptibles para ser usados como ingrediente activos, el concentrado de las pruebas realizadas y sus respectivos resultados, se presentan en la Tabla 6 y 7, ambos principios activos tienen la calidad deseada para utilizarlos en una formulación, cabe aclarar que algunas de las especificaciones reportadas fueron proporcionadas por el certificado de control de calidad. El Laboratorio *Mixim* proporcionó el certificado de análisis que avala las características para el extracto de propóleo y el certificado

de control de calidad lo proporcionó *Bioextracto* para la tintura de equinácea. Los certificados proporcionados aparecen en la Tabla 6 y 7.

En base a la información obtenida y características de cada uno de los excipientes se propusieron formulaciones donde el contenido de activo, edulcorante y mejorador de absorción se mantuvieron constantes y se varió el porcentaje de plastificante y de los polímeros presentes. Doce de las formulaciones anteriores se presentan en la Tabla 10.

B. Formulación

En nueve de doce formulaciones se probó como polímero a la polivinilpirrolidona (PVP), este polímero se seleccionó porque se ha utilizado en la elaboración de parches bucales debido a su fuerza bioadhesiva y su principal característica que no irrita la mucosa bucal.[9] Entre sus características se destaca como sustancia no tóxica que forma capas claras, brillantes y duras.[99]

Las formulaciones de los parches elaborados con PVP cumplen con las características organolépticas y físicas (formulaciones 4-12) al estar conforme a las especificaciones planteadas inicialmente para una formulación adecuada (apariencia, color, sabor y adhesividad), como se observa en el concentrado presentado en la Tabla 3.

Las formulaciones con PVP fueron más adhesivas que las formulaciones elaboradas con Eudragit NE30D. En cuanto a sabor y color, las formulaciones que contienen PVP fueron mucho mejores debido a que PVP es insípida y Eudragit NE30D es ligeramente amargo.

Contrario a las formulaciones que contenían PVP, las formulaciones elaboradoras con Eudragit NE30D fueron más obscuras y prevalecía la

formación de grumos por lo tanto, se consideraron con una apariencia no recomendable.

Se reporta que los parches bucales elaborados con Eudragit NE30D forman una capa continua y con la adición de PVP se obtienen películas flexibles,[35] así mismo también se reporta que al evaluar las propiedades físicas y mecánicas de las películas de parches con Eudragit NE30D y PVP para la aplicación bucal son rígidos.[29] Sin embargo en este estudio las formulaciones que contenían la mezcla de eudragit con PVP no presentaron estas características y se consideraron como formulaciones no factibles para seguirlas evaluando.

La carboximetilcelulosa de sodio (NaCMC) fue utilizada como polímero mucoadhesivo, es decir, las películas formadas con NaCMC se desintegran rápidamente, son solubles en agua y producen una capa continua, lisa, elegante y flexible; además de ser un polímero atóxico, inerte e insípido.[99]

Se ha reportado que formulaciones de NaCMC combinada con PVP presentan mejores características debido a que la PVP actúa como coadyuvante para optimizar las propiedades mucoadhesivas de NaCMC, además que la NaCMC es capaz de extenderse a lo largo del área de aplicación (bucal) sin deformarse, debido a sus propiedades mecánicas. [29] Con base a la información anterior, en todas nuestras formulaciones se propuso la combinación de estos componentes.

En todas las formulaciones se adicionó el polietilenglicol (PEG 400) como plastificante con el fin de mejorar la flexibilidad de la película polimérica para la mucosa bucal, se sabe que si el parche bucal no tiene la flexibilidad adecuada, será incómoda para su aplicación.[27]

Se reporta que al adicionar PEG al polímero, la mucoadhesión mejora significativamente debido a la penetración del PEG a través de la interfase

mucosa-polímero.[13] También se ha reportado que la adición de PEG incrementó el brillo de las películas mucoadhesivas, proporciona una baja toxicidad y no interacciona con PVP, no admite crecimiento fúngico y es soluble en agua. [99]

Shojaei & Li evaluaron la fuerza mucoadhesiva de PEG con diversos pesos moleculares (200, 400 y 1000) y reportan que PEG 400 obtiene la mayor fuerza mucoadhesiva: 4.35 ± 0.69 N/cm^2.[22] En consecuencia, en este estudio se seleccionó este peso molecular y únicamente se probó este plastificante.

Los parches bucales deben cumplir con tres requisitos: la película se debe adherir, conservar su fuerza adhesiva sobre la superficie del mucus e hincharse en un corto período de tiempo.[27] La adhesividad en nueve de las doce formulaciones que contienen PVP con NaCMC satisfacen los criterios que especificó nuestra prueba de acuerdo a la metodología propuesta (Tabla 3).

El hinchamiento es una propiedad importante cuando se evalúa la integridad de la película en un parche bucal, porque este comportamiento es un indicativo sobre la velocidad de penetración y relajación de las cadenas poliméricas, una vez que están en contacto directo con el fluido bucal. Se ha reportado, que para películas elaboradas con PVP, se obtiene un alto porcentaje de hinchamiento directamente proporcional al espesor que caracteriza a las matrices poliméricas.[29]

El tiempo de contacto inicial entre los mucoadhesivos y la capa mucosa puede afectar de forma decisiva la funcionalidad del sistema, ya que determina la extensión de la hidratación y del hinchamiento de los polímeros, condiciones estrechamente relacionadas con la característica de adhesividad de las formulaciones.[12]

La medida de hinchamiento sólo fue realizada para las formulaciones 4, 5, 7,

10 y 12; debido a que estas fueron las formulaciones con mejores características físicas y organolépticas para parches bucales. (Tablas 11 y 12)

El porcentaje de hinchamiento de las formulaciones mencionadas se encuentra en el rango del 91 al 97 %, donde se introdujo el amortiguador 6.8 a la red polimérica, mostrándose como una hidratación no excesiva y por lo tanto, la forma del parche no logró deformarse. Para las formulaciones 4 y 5 se obtuvo un porcentaje de hinchamiento cercano al 95 %, indicando que la penetración de las moléculas del amortiguador en la red polimérica se muestra favorecida significativamente debido a los puentes de hidrogeno, en mayor medida que los parches con hinchamientos arriba del 95% como lo indican *Chun y col.*[27] Sin embargo una hidratación excesiva al cien por ciento tendría como consecuencia la formación de espacios vacíos dentro de la matriz polimérica y se podría obtener una estructura menos resistente y vulnerable a la simulación de la fuerza mecánica. [82]

Respecto a las características físicas de las formulaciones de los parches bucales, el intervalo de peso fue entre 926.88 a 993.29 mg. Las características físicas, organolépticas y también el desempeño adhesivo de los parches formulados fueron adecuados según las especificaciones previamente estipuladas.

La resistencia al doblar de los parches formulados fue otra de las pruebas que se realizó a las formulaciones como parte de su caracterización física, la resistencia al doblar se registró y fue menor a 85 unidades, como se muestra en la Tabla 13. Se requiere conocer la resistencia al doblar porque al obtener el valor de la fuerza que opondrá el parche a los movimientos causados por la boca cuando el paciente tiene que hablar, reír y tragar.[82] Las formulaciones 4 y 5 poseen una resistencia equivalente, la formulación 7 obtuvo la máxima con 83 unidades y la formulación 12 obtuvo la menor resistencia con 42 unidades.

Las formulaciones evaluadas 4, 5, 7, 10 y 12 cumplen con las especificaciones impuestas en cada prueba como variación de peso, resistencia al doblar y medida de hinchamiento, los resultados obtenidos se muestran en Tabla 13.

Las cinco formulaciones anteriores (4, 5, 7, 10 y 12) mostraron un comportamiento deseable, a pesar de que las propiedades exhibidas de las películas poliméricas muestran diferencias en cada formulación, por lo tanto, cada una revela características específicas que se manifestaron posteriormente en los perfiles de liberación.

C. Desarrollo y validación del método

Se debe demostrar que el método analítico seleccionado y desarrollado, es el adecuado y apto para evaluar la forma farmacéutica elaborada. Por lo tanto, el método que se utilizó debía ser confiable para evaluar los principios activos utilizados en el parche bucal.

Para desarrollar el método analítico y analizar ambos ingredientes activos, se requiere cumplir con los parámetros mínimos para seleccionar la técnica más apropiada: segura, confiable y eficaz. En este estudio, el método de cuantificación de los ingredientes activos fue complicado porque equinácea y propóleo son sustancias de origen natural, constituidos por varios componentes y ambos son preparaciones herbales, tintura y extracto respectivamente.

Las preparaciones herbales se deben cuantificar en un intervalo extenso de concentraciones, porque el método sería utilizado no solamente para cuantificar los ingredientes activos en la forma farmacéutica, también debería aplicarse para la estimación de la caracterización de los perfiles de liberación obtenidos en la formulación de parche bucal.

La técnica analítica seleccionada para analizar los principios activos: equinácea y propóleo fue espectroscopia UV, debido a las características estructurales de ambos compuestos, satisface especificidad y sensibilidad, al obtener señales de absorbancia para cada compuesto en longitudes de onda diferentes dentro del mismo espectro, a 210.85 y 257.55 nm para propóleo y equinácea respectivamente.

La validación del método analítico es el proceso mediante el cual se comprueba que la metodología empleada se basa en los principios teóricos y se ha optimizado para el propósito concluyente que es la medición. Sin embargo, no sólo evalúa que la obtención de la medida sea correcta, también es una medida de la efectividad total del sistema analítico y asegura que el método empleado es el óptimo.

Para obtener la validación adecuada, se debe considerar la técnica de análisis, características generales del compuesto, forma farmacéutica (matriz) y los niveles de concentración.

Para este estudio se propuso un método de análisis por espectroscopia UV, en función de que los activos tienen características como sustancias cromóforas. La técnica analítica propuesta para la cuantificación de los activos y sometida para su validez está descrita en la metodología, los parámetros obtenidos en la validación realizada fueron: linealidad, precisión, exactitud y estabilidad de la muestra.

1. SISTEMA

Los gráficos presentados en los esquemas 1 y 2, nos muestran la proporcionalidad entre la concentración y la respuesta medida (absorbancia) para nuestros 2 activos en las longitudes de onda de 210.85 nm y 257.55 nm para propóleo y equinácea respectivamente. Al encontrar coeficientes de

determinación mayor al 0.98 en ambos casos, los rangos de concentración evaluados: 56.25 a 450 μg/mL y a 12.5 a 100 μg/mL para equinácea y propóleo respectivamente y coeficientes de variación menores al 1.5% cuando se realiza la precisión del sistema, los resultados indican que el sistema es lineal y preciso.

2. MÉTODO

a. Selectividad

El parámetro de selectividad se evaluó y se aplicó para diferenciar entre varias sustancias de la muestra, ya que es aplicable a métodos en los que existen dos o más componentes cuantificables en una matriz compleja, como fue en nuestra formulación de parche bucal.

Al comparar espectrofotométricamente la preparación herbal de equinácea y propóleo, con cada uno de los componentes de la formulación, no se observó interferencia de estos últimos con el máximo de absorción de los ingredientes activos (equinácea y propóleo).

También se determinó el espectro de la mezcla equinácea – propóleo y se observó que los picos no se superponen, los máximos y mínimos obtenidos en la lectura individual se conservan, por lo tanto, la selectividad es óptima para este método espectrofotométrico. Por último se determinó el espectro con los mezcla de excipientes de la formulación (Anexo 1), la respuesta fue nula, por lo tanto, no interfieren en la lectura de los principios activos. Conjugando la respuesta de cada excipiente y principio activo, se infiere que el método es selectivo para evaluar equinácea y propóleo a las longitudes de onda de 210.85 y 257.55 nm.

b. Linealidad

Al graficar el porcentaje adicionado contra el porcentaje recuperado, se obtuvo un gráfico lineal (ver esquema 3 y 4), con lo cual, se indica que el procedimiento

para analizar la muestra y/o los componentes restantes de la formulación, no afecta la cuantificación de los ingredientes activos, ya que los porcentajes son directamente proporcionales. Tal como lo indican los resultados de coeficiente de determinación mayor a 0.98, pendiente aproximadamente igual a uno y una ordenada al origen aproximadamente igual a cero, criterios que cumplen satisfactoriamente el método para equinácea y propóleo como puede observarse en los esquemas 3 y 4.

c. Precisión y exactitud

La exactitud y la precisión del método para equinácea y propóleo, se evaluaron en el nivel central de concentración. La variabilidad de los resultados experimentales para la cuantificación de equinácea y propóleo en términos de precisión, a un nivel de concentración satisfacen los criterios de aceptación reportados por *Brittain***,** al obtener en porcentaje el coeficiente de variación de 1.015 para equinácea y propóleo respectivamente, que indican la baja variabilidad entre las determinaciones experimentales realizadas para la cuantificación de los activos.[100]

Para propóleo la exactitud del método reportada como el intervalo del por ciento de recobro fue de 98.710 – 100.799 %, este intervalo obtenido no se alejó significativamente del valor real, con lo cual se indica la cercanía entre el porcentaje recuperado y el valor de referencia preestablecido (97 – 103%), por lo tanto, el método desarrollado para propóleo se considera exacto.

En equinácea la exactitud se encuentra por debajo del criterio de aceptación (97 – 103%), al obtenerse un intervalo de por ciento de recobro del 90.0645 - 90.8296 %, sugiriendo que el método pudiera ser no exacto, sin embargo, para nuestro estudio no se consideró como tal, tomando como base su baja dispersión en determinaciones experimentales (precisión) y su proporcionalidad evaluada en

la linealidad del método, aunado a que *Pomponio y col,* evaluaron los compuestos fenólicos de equinácea por HPLC y reportan una exactitud cercana al 90%[76] y considerar que las preparaciones herbales que contienen diversos componentes, muchos de ellos a concentraciones muy bajas, pueden interferir en mayor o menor medida en la cuantificación de la sustancia de interés, además se conoce que la estandarización de preparaciones herbales se afecta por diversos factores implícitos como: parte de la planta usada, temperatura de manejo – almacenamiento, método de recolección, transporte de materia prima, edad y exposición, todo esto afecta aparatosamente la calidad y consecuentemente el valor terapéutico de medicinas herbales. [44]

d. Precisión Intermedia

La precisión del método en términos de precisión intermedia fue evaluada para los ingredientes activos en todo el rango de concentraciones establecido para cada compuesto.

En equinácea el grado de dispersión entre la serie de muestras leídas en absorbancia se encuentra en el intervalo preestablecido, es menor al 2% por lo tanto, el CV del 1.10 % refleja que las determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio y en diferentes días presentan baja dispersión.

De igual forma, para propóleo el grado de dispersión entre la serie de muestras leídas se encuentra en el intervalo preestablecido menor al 2%, por lo tanto, el coeficiente de variación refleja que las determinaciones independientes realizadas en laboratorio, inter-día presentan baja dispersión, lo cual indica que no existe influencia de errores aleatorios en los niveles de concentración.

e. Estabilidad de la muestra

Para asegurar la integridad de las sustancias de interés, se debe evaluar la estabilidad de la muestra, con lo cual se cerciora que las mismas conservan sus propiedades desde la toma de muestra hasta su análisis final, así que el porcentaje recuperado inicial y final no debe exceder el 3%.

Las muestras deben conservar sus propiedades fisicoquímicas y de concentración, después de almacenarse determinado tiempo bajo ciertas condiciones, según las necesidades experimentales requeridas.

Para el caso de equinácea con previo conocimiento de su inestabilidad por la degradación y oxidación del ácido cichórico así como otros derivados caféicos.[92] Se estableció que el estudio de estabilidad de las muestras se llevaría a cabo evaluando su contenido inmediatamente después de ser preparadas para su análisis, a la hora, a las 2, 4, 8 y 24 horas después, éstas últimas resguardadas de la luz y a temperatura ambiente. Bajo estas condiciones la equinácea se mantuvo estable durante 8 horas, el tiempo de estabilidad pudiera ser corto, sin embargo para fines prácticos funciona adecuadamente.

Las muestras preparada del propóleo para su cuantificación, mostró a través de las lecturas obtenidas que conserva sus propiedades fisicoquímicas y su concentración, después de almacenarse durante 8 horas bajo las condiciones antes mencionadas porque se ha demostrado que propóleo es fotosensible. [44] Por lo tanto, se considera que las muestras son estables hasta por 8 horas sólo si se resguardan bajo las condiciones antes mencionadas.

D. Disolución

1. SISTEMA ELEGIDO

Toda formulación propuesta debe cumplir no solamente con la aceptación de sus especificaciones físicas, químicas y de contenido, previamente establecidas. También debe evaluarse la capacidad de la formulación para liberar el o los componentes activos de tal manera que puedan éstos estar disponibles para ser absorbidos y cumplir satisfactoriamente con el objetivo de la forma farmacéutica.

Una vez que se tenía el método analítico y las mejores formulaciones según las especificaciones preestablecidas, se procedió a elegir las más susceptibles a tener una liberación de activos adecuados para una formulación de parche bucal.

Para lo cual, un diseño adaptado de la celda de Franz es el que se propuso como el equipo a utilizar, la elección de la celda de Franz se efectuó porque su manejo es fácil, se diminuye la cantidad empleada del medio de disolución (solución amortiguadora 6.8) aproximadamente 130 mL y se ha reportado que el uso de este equipo es el mas idóneo para estudiar el comportamiento de los parches bucales.[27, 82, 94] Las condiciones del equipo de disolución a utilizar fueron estudiadas y establecidas finalmente como se describen en la Tabla 4.

2. PERFILES DE LIBERACIÓN

Los perfiles de liberación para la equinácea y propóleo en forma individual para las formulaciones 4, 5, 7, 10 y 12, se presentan en los gráficos 1 y 2. Donde se puede observar que la liberación de los ingredientes activos inicia desde los 2 minutos hasta los 60 minutos, en mayor o menor magnitud dependiendo de la formulación. Lo que indica que las formulaciones propuestas presentan una liberación inmediata congruente con los componentes de la formulación.

a. Equinácea

Los parches bucales deben liberar el ingrediente activo en escasos minutos, por lo tanto se consideran como formulaciones de liberación inmediata y se debe cumplir con el requisito de la mayor liberación en el menor tiempo.

Para equinácea se observa que la liberación inicia a los 2 min y continúa hasta los 50 min, después de este minuto la liberación de las diferentes formulaciones probadas se mantiene constante.

Las formulaciones 5 y 12 presentan la menor cantidad del ingrediente activo liberado a los 10 min, que es del 14 % y del 21.5 %, al mismo tiempo para las formulaciones 7 y 10 les corresponde el 28.5 y 34 % respectivamente, en tanto que, a la formulación 4 le corresponde el 47.2 % liberado.

Al contrastar los resultados obtenidos es sencillo inferir que la formulación 4 obtuvo el máximo liberado, al menor tiempo.

El perfil de liberación trazado por la formulación 4 presenta el comportamiento esperado para una formulación de parche bucal, es decir, la liberación del activo teóricamente deberá llevarse a cabo en forma rápida e inmediata dado que, la administración de la formulación deberá estar el menor tiempo posible en la mucosa bucal, para evitar molestias al paciente.

b. Propóleo

Al evaluar al otro ingrediente activo (propóleo), dentro de las formulaciones propuestas para parche bucal, se comprobó la liberación inmediata, puesto que los perfiles muestran un porcentaje liberado a los 2 minutos después de haber iniciado la prueba de disolución.

El comportamiento reportado de los perfiles obtenidos de las diferentes formulaciones fue muy cercano, ya que, los porcentajes se encuentran entre el 8% al 13% aproximadamente entre todas las formulaciones en los primeros 10 minutos.

Las formulaciones 7 y 10 liberaron un 8.5% y 10% respectivamente, las formulaciones 5 y 12 liberaron hasta un 13% aproximadamente, así como la formulación 4 liberó un 12%.

Al cotejar los valores emitidos en los 10 minutos, como fue en el caso de la liberación de equinácea, no era suficiente, por lo tanto, se determinó que era necesaria la evaluación del % liberado en los siguientes tiempos de muestreo.

Los valores obtenidos a los 15 minutos presentaron diferencias significativas entre una formulación y otra, por ejemplo la formulaciones 7 y 12 alcanzaron un 12.5 y 18 % liberado respectivamente, las formulaciones 4 y 10 lograron liberar un 25 y 20% respectivamente, en tanto que la formulación 5 obtuvo un máximo liberado del 42%. Por consiguiente, al contrastar estos valores, la decisión de qué formulación presentaba una mejor liberación de propóleo se redujo a comparar las formulaciones 4 y 5.

La diferencia obtenida en el porcentaje liberado, a los 20 minutos, sugiere una diferencia notoria entre la formulación 4 y 5 al obtenerse que la formulación 4 supera el 50 % liberado, en tanto que la formulación 5 permanece por debajo, con un 47%, no obstante a los 15 min la formulación 5 tiene una significativa mayor liberación que la formulación 4. En función del comportamiento encontrado para las formulaciones 4 y 5 se decidió evaluar la eficiencia de disolución para comparar estas dos formulaciones.

Es necesario evidenciar que la formulación 5 gráficamente presenta altibajos (ver Gráfica 3) mientras que la formulación 4 registra un perfil más satisfactorio y cercano al modelo teórico, por lo tanto la formulación 4 se prefirió sobre la formulación 5.

3. EFICIENCIA

El criterio utilizado para la evaluación y comparación de los perfiles de liberación, para las formulaciones 4 y 5, fue la eficiencia de disolución (ED).

Los datos obtenidos se evaluaron con el parámetro de eficiencia de disolución ED_{30}, los valores calculados provenientes de las formulaciones probadas representan la cantidad del ingrediente activo liberado a los 30 minutos y se enlistan en la Tabla 14. Estos valores describen cuantitativamente el área del principio activo liberado como se muestra en la Gráfica 3 y confirma la diferencia significativa entre las formulaciones 4 y 5, también se logra establecer la posible disimilitud entre los perfiles de liberación.

También se evaluó la variación promedio entre una determinación y otra, para las formulaciones antes mencionadas, los valores estimados se concentran en la Tabla 14, a través de los cuales es sencillo demostrar que la formulación 4 posee baja dispersión entre sus determinaciones y puede sugerirse que es más eficiente.

4. CINÉTICA

Los datos obtenidos en la prueba de disolución se analizaron para los diferentes modelos (ANEXO 4). Se calcularon los valores para los coeficientes de determinación de ambos ingredientes activos, se obtuvo un r^2 0.9289 y 0.9092 para equinácea y propóleo respectivamente, lo cual indica que los valores obtenidos se ajustan al modelo de Higuchi. Los valores de la media y el

intercepto obtenido de la ecuación no lineal del modelo de Higuchi fueron evaluados y se muestran en la Tabla 15.

Una vez que se obtuvo el modelo matemático, se determinó la constante de la velocidad de disolución para ambos principios activos, así se obtuvo para equinácea 11.9877 y 10. 9668 para propóleo (ANEXO 4). Además se obtuvieron las gráficas correspondientes a la cinética de liberación (Higuchi) para ambos ingredientes activos, las cuales se presentan en el ANEXO 4.

D. Pruebas finales

1. pH

El pH de superficie obtenido en todas las formulaciones fue conveniente al obtener un pH neutral, significa que no se espera ninguna irritación en la mucosa bucal. Los resultados obtenidos para esta prueba se presentan en la Tabla 16.

2. VISCOSIDAD

La liberación más alta de los principios activos fue obtenida en las formulaciones 4 y 5, este resultado puede ser explicado a través de la viscosidad que presentan las soluciones poliméricas de dichas formulaciones. *Naffe y col*, establecieron a través de un estudio preliminar que a menor viscosidad mayor liberación de los principios activos.[82] Se ha reportado que existe una relación inversa entre un valor bajo de viscosidad y un valor alto de liberación del ingrediente activo en formulaciones de parche bucal debido a que la viscosidad se relaciona con la fuerza y durabilidad de la capa de gel, causando que la difusión del principio activo sea más fácil entre menor sea el valor de la misma.[82]

Los resultados obtenidos para las formulaciones 4, 5, 7, 10 y 12 se muestran en la Tabla 16. La viscosidad de las formulaciones 4 y 5 fueron equivalentes (2700

cpoises), ambas soluciones presentan la más baja viscosidad respecto a otras formulaciones evaluadas y también una mayor liberación en ambos principios activos. Se ha reportado que las propiedades viscoelásticas de PVP al 35 % contribuyen relativamente a la difusión de los principios activos, por esta razón ambas formulaciones (4 y5) consiguen liberar al menos un 60 % de ambos principios activos. La formulación 4 con PVP al 30 %, tiene la viscosidad más baja en comparación con otras formulaciones que lo contienen, sugiriendo que este contenido de PVP es apto para la liberación de los ingredientes activos. En cambio, al incrementar la cantidad de PVP, aumenta la bioadhesividad de la formulación pero causa una distribución no homogénea de los polímeros y del principio activo, obteniendo como resultado una velocidad de liberación no previsible del activo[35] esto justifica el comportamiento discrepante e inconstante del propóleo en las formulaciones 7 y 10. La formulación 12 exhibe la más alta viscosidad (3800 cpoises), por lo cual, demuestra que su liberación es más baja comparada con las demás formulaciones, como se muestra en las Gráficas 1 y 2 para equinácea y propóleo, respectivamente.

3. UNIFORMIDAD DE CONTENIDO

Para evaluar la uniformidad de dosis existen dos métodos: variación de masa y uniformidad de contenido. El método de variación de peso, previamente evaluado, no es suficiente porque la formulación contiene dos principios activos: equinácea y propóleo. En el MGA 0299 se establece que cada principio activo debe ser evaluado.[78]

Como describe *Naffe y col.* que se efectúen al menos 5 determinaciones para obtener un resultado significativo[82] en este procedimiento. El análisis se efectúa espectrofotométricamente a dos longitudes de onda y para que se apruebe, según el MGA 0299, es necesario que la desviación estándar relativa sea menor del 6

por ciento y que el intervalo de contenido se encuentre entre un 85 y 115 % de contenido.[78]

La uniformidad de contenido de equinácea y propóleo se evaluó en la formulación 4 y los valores obtenidos se registran en la Tabla 17. Se estimó el contenido de equinácea y en el cual se obtuvo un 97.61% con un coeficiente de variación del 3.12%. Al contrastar el contenido promedio con el intervalo de contenido especificado se dedujo que equinácea satisface el porcentaje de uniformidad establecido y también cumple con el límite de variación.

En esta misma formulación se evaluó el contenido del propóleo y se obtuvo un 103.69 % y un coeficiente de variación del 2.33%, así se establece que propóleo también cumple ambos requerimientos mínimos para ser aprobado en la prueba de uniformidad de contenido. Por lo cual, la formulación 4 resulta excelente porque obtiene resultados satisfactorios en esta prueba final que es decisiva, puesto que refleja la homogeneidad en el contenido de los principios activos.

VIII. CONCLUSIONES

1. La mezcla de los polímeros mucoadhesivos (NaCMC) y formadores de película (PVP) es adecuada para la elaboración de parches bucales.

2. El polímero hidrofílico PVP mostró buenas propiedades mucoadhesivas y excelentes características de hinchamiento.

3. El polímero Eudragit NE30D no es recomendable para ser utilizado en la formulación de parches bucales de liberación inmediata puesto que no mejoró apreciablemente la adhesividad de los parches que lo contenían, además causó una dispersión no uniforme de los principios activos.

4. El plastificante empleado (PEG 400) favorece la elasticidad, flexibilidad de la película y la liberación de los ingredientes activos.

5. La polivinilpirrolidona (PVP), carboximetilcelulosa de sodio (NaCMC) y el polietilenglicol (PEG 400) no presentan incompatibilidad con la tintura de equinácea ni con el extracto etanólico de propóleo (EEP).

6. Se encontraron diferencias entre las 12 formulaciones propuestas, lo cual se demostró a través de pruebas físicas, organolépticas y de control de calidad.

7. Se validó el método analítico para la determinación del extracto etanólico de propóleo, así como de la tintura de equinácea en una formulación para parche bucal, para aplicarlo en la determinación de estos ingredientes activos en la prueba de liberación. Los parámetros evaluados fueron: precisión, exactitud, precisión intermedia, estabilidad de la muestra, selectividad y linealidad.

8. Los parches mucoadhesivos propuestos son un sistema competente para la liberación del extracto etanólico de propóleo y la tintura de equinácea para la aplicación bucal, puesto que las formulaciones (4, 5, 7, 10 y 12) sometidas a esta prueba lograron liberar ambos ingredientes activos.

9. De las formulaciones sometidas a la prueba de disolución, la formulación 4 es la mejor para liberar equinácea y propóleo en más del 60 % antes de los 30 minutos.

10. La cinética de liberación para equinácea y propóleo es de segundo orden o de Higuchi.

11. Las pruebas de viscosidad y pH confirman que la formulación 4 es factible para ser utilizada como parche bucal.

12. La prueba de uniformidad de contenido muestra que la formulación 4 posee un contenido homogéneo de equinácea y propóleo.

IX. PROPUESTAS O RECOMENDACIONES

1. Fabricar lotes de parches bucales que contengan la mezcla de NaCMC y PVP en una concentración constante para evaluar el efecto de plastificante (PEG 400) a diferentes concentraciones.

2. Adicionar algún tipo de colorante a la formulación elegida para contrarrestar el efecto del EEP.

3. Elaborar un escalamiento de las mejores formulaciones (4, 5) y definir los puntos críticos de la misma.

4. Evaluar y analizar la compatibilidad entre el anís, menta, manitol y miristato de isopropilo con ambos ingredientes activos para complementar el estudio de compatibilidad efectuado.

5. Realizar el estudio formal de estabilidad acelerada durante 3 ó 6 meses para las formulaciones propuestas, de acuerdo a la NOM – 073.

6. La liberación de los principios activos podría ser optimizada incorporando al mejorador de absorción en diferentes concentraciones ya que es un componente crítico en esta área.

7. Diseñar una prueba *in vivo* para la aplicación del parche bucal y si es necesario seleccionar alguna especie animal considerando lo que se ha reportado.

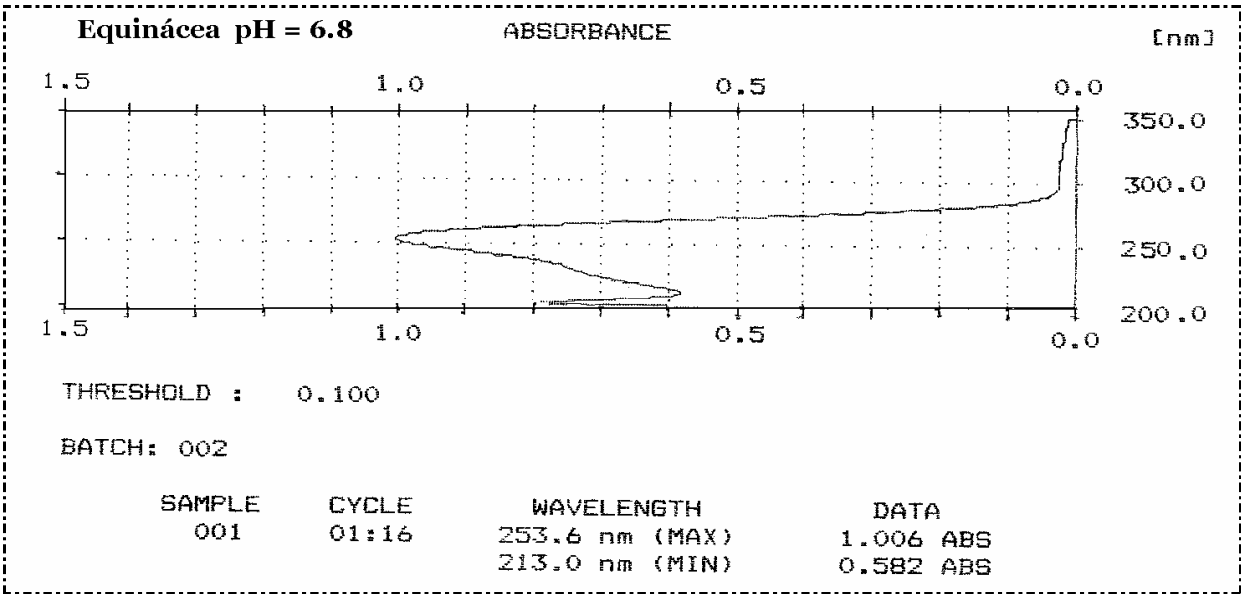
8. Determinar el tiempo de mucoadhesión y elegir la mucosa bucal más adecuada.

9. Diseñar una prueba *in vivo* para definir la fuerza de mucoadhesión que posee la formulación 4.

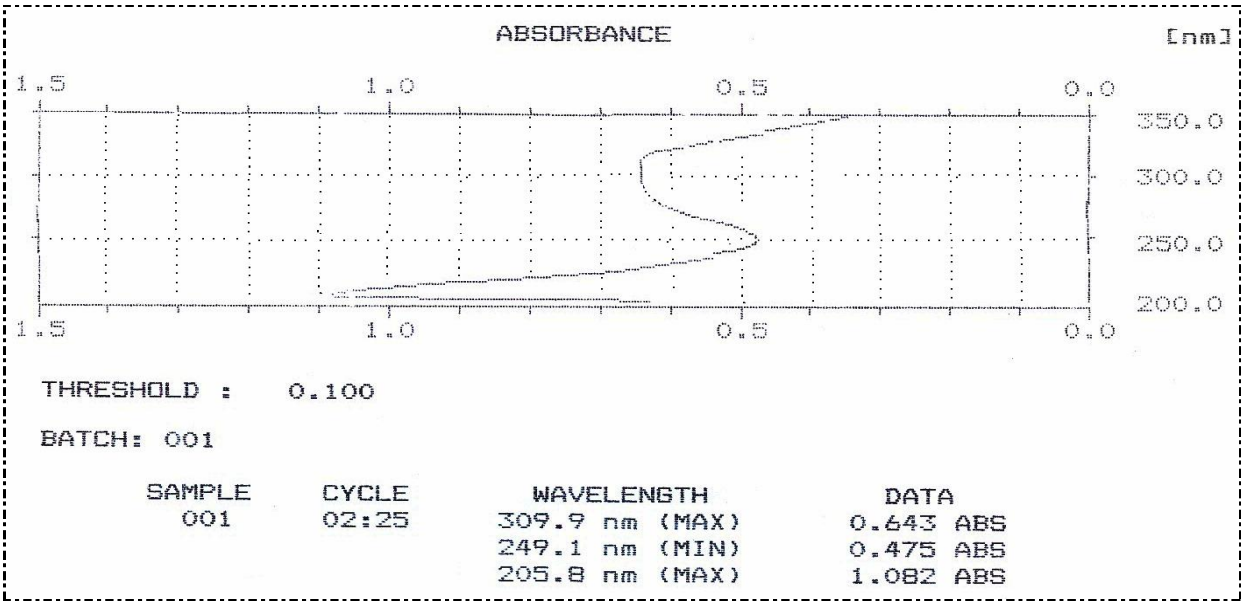
X. ANEXOS

Anexo 1

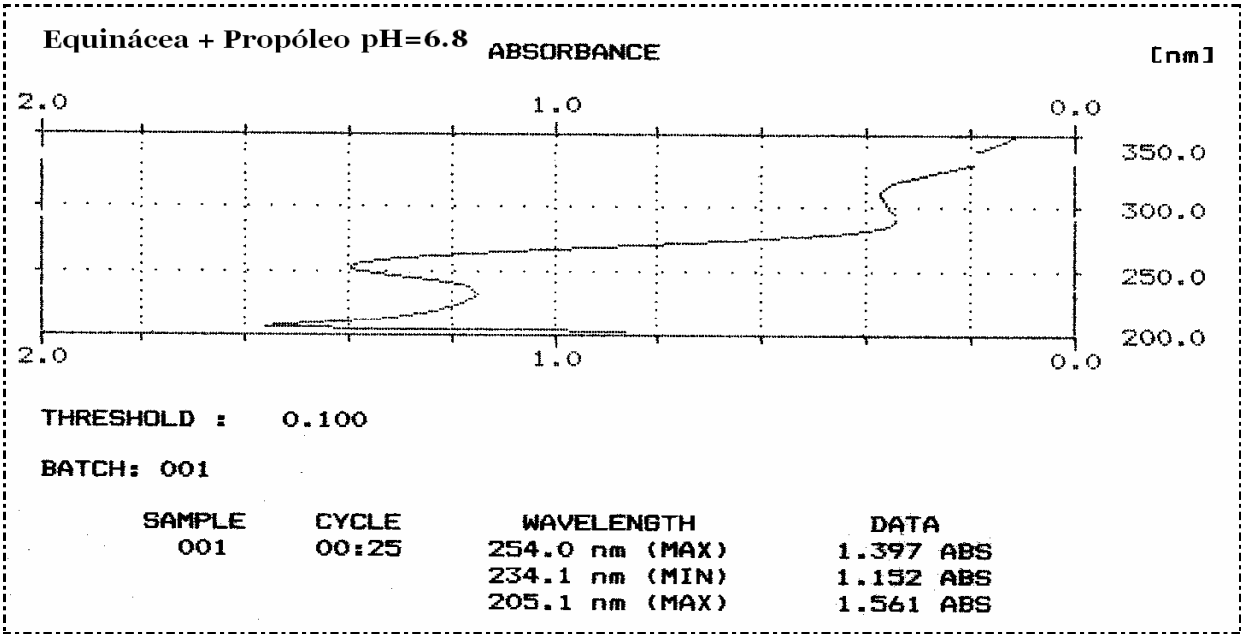
Espectros obtenidos de los principios activos y excipientes en solución amortiguadora a pH 6.8, el rango de la longitud de onda fue de 200 a 350 nm y con una absorbancia de 0 a 1.5; todas las muestra se leyeron en el espectrofotómetro UV–Visible Perkin Elmer lamda 2.



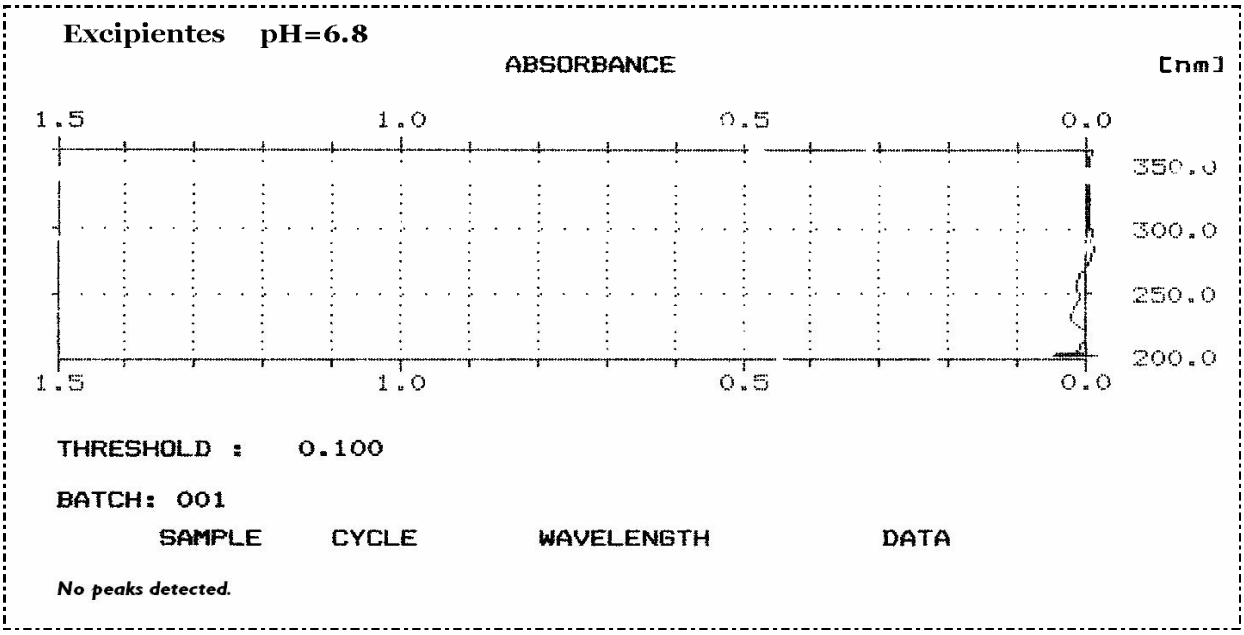
GRÁFICA 4. Espectro de equinácea y presenta un máximo a 253.6 nm



GRÁFICA 5. Espectro de propóleo y presenta un máximo a 205.8 nm aproximadamente.



GRÁFICA 6. Espectro de obtenido para ambos ingredientes activos (equinácea y propóleo), se observa el máximo para cada sustancia.



GRÁFICA 7. Espectro obtenido de la mezcla de los excipientes empleados en la formulación sugerida para ser empleada como parche bucal.

B. Anexo 2

1. VALIDACIÓN PARA EQUINÁCEA

a. Sistema

TABLA 18. Se presentan los valores de las lecturas obtenidas (absorbancia), con las cuales se procedió a calcular el valor de la pendiente (m), la ordenada al origen (b), el coeficiente de determinación (r^2) y el coeficiente de variación (CV) para evaluar la linealidad del sistema.

[µg / mL]	Absorbancia			Promedio	Desviación estándar
56.25	0.1960	0.1968	0.1960	0.1963	0.0005
112.5	0.3900	0.3890	0.3920	0.3903	0.0015
225.0	0.7660	0.7530	0.7790	0.7660	0.0130
337.5	1.1689	1.1687	1.1680	1.1685	0.0005
450.0	1.5510	1.5410	1.5640	1.5520	0.0115
r^2	0.9999	0.9996	0.9999	**0.9998**	
b	0.0000	0.0000	0.0002	0.0001	**CV**
m	0.0034	0.0034	0.0034	0.0034	**1.1099 %**

TABLA 19. Valores obtenidos (absorbancia) para estimar la precisión del sistema. Posteriormente se reportan los cálculos de la media aritmética ($\bar{y}$), la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV).

	Absorbancia
	0.730
	0.716
	0.741
	0.717
	0.728
	0.731
$\bar{y}$	0.7272
SD	0.0094
CV	**1.2942 %**

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

b. Método

TABLA 20. Se estimó la cantidad recuperada para evaluar la linealidad del método. Para lo cual, se calculó el valor de la pendiente (m), la ordenada al origen (b), el coeficiente de determinación (r^2) y el coeficiente de variación (CV).

[µg / mL]	Cantidad recuperada			Promedio F	Desviación estándar F
56.25	55.6463	55.6447	56.1586	55.8165	0.2962
112.5	115.3427	115.4961	116.7303	115.8564	0.7607
225.0	225.9997	225.5643	223.5112	225.0251	1.3290
337.5	329.0853	325.5552	328.1066	327.5824	1.8225
450.0	455.1759	486.6070	456.7433	466.1754	17.7116
r^2	0.9990	0.9919	0.9985	**0.9964**	
b	0.0000	0.0001	0.0000		**CV**
m	1.0000	1.0611	1.0000		**1.2267 %**

TABLA 21. Se determinó la cantidad recuperada del analito. Para estimar la repetibilidad, se calcularon los valores de la media aritmética ($\bar{y}$), la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV) correspondientes al porcentaje de recobro.

Absorbancia	Cantidad Adicionada	Cantidad Recuperada	% Recobro	Solución de referencia
0.8647	225	212.6544	94.5131	0.9149
0.8815	225	216.7860	96.3493	
0.8817	225	216.8352	96.3711	
0.8820	225	216.9090	96.4040	
0.8650	225	212.7282	94.5458	
0.8830	225	217.1549	96.5133	
Σ	574.6967		$\bar{y}$	95.7828
Σy^2	55050.7761		**SD**	0.9725
n	6		**CV**	**1.0153 %**

Donde **Σ** es la sumatoria, **Σy^2** la suma de cuadrados y **n** es el número de muestras analizadas.

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

TABLA 22. Se obtuvo la cantidad recuperada de analito a través de las lecturas obtenidas (absorbancia). Para calcular la exactitud se valoró el promedio ($\bar{y}$), la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV). Además se utilizó el porcentaje de recobro para calcular el intervalo de confianza IC (μ).

Solución de referencia	Absorbancia	Cantidad Adicionada	Cantidad Recuperada	% Recobro
0.9149	0.825	225	202.8910	90.1738
	0.824	225	202.6451	90.0645
	0.829	225	203.8747	90.6110
	0.830	225	204.1207	90.7203
	0.828	225	203.6288	90.5017
	0.831	225	204.3666	90.8296
Σ	542.9009		$\bar{y}$	90.4835
Σy²	49124.0219		SD	0.3046
n	6		**CV**	**0.3366 %**
			IC $_{recobro}$	
			90.0645 % –	90.8296 %

Donde **Σ** es la sumatoria, **Σy²** es la suma de cuadrados y **n** es el número de muestras analizadas.

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

TABLA 23. Se determinó la cantidad recuperada, para calcular el valor correspondiente a la media aritmética ($\bar{y}$), la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV) para evaluar la precisión intermedia.

	[µg/mL]	Cantidad Recuperada			Promedio F	Desviación Estándar F
1ª Curva	56.25	55.6463	56.2288	57.0062	56.2938	0.6823
	112.5	115.3428	114.8874	114.6679	114.9660	0.3442
	225	225.9997	227.0033	225.3551	226.1194	0.8306
	337.5	329.0853	326.4050	327.6394	327.7099	1.3415
	450	455.1759	456.7253	456.5814	456.1609	0.8560
	r^2	0.9990	0.9983	0.9986		
	b	0.0000	0.0000	0.0000		**CV**
	m	1.0000	1.0000	1.0000		**0.4951 %**
2ª Curva	56.25	55.6447	54.9562	57.0062	55.8690	1.0433
	112.5	115.4961	115.2903	114.6679	115.1514	0.4312
	225	225.5643	227.7974	225.3551	226.2389	1.3537
	337.5	325.5552	328.0628	327.6394	327.0858	1.3423
	450	456.6070	455.1434	456.5814	456.1106	0.8377
	r^2	0.9981	0.9987	0.9986		
	b	-0.3278	0.0000	0.0000		**CV**
	m	0.9994	1.0000	1.0000		**0.6868 %**
3ª Curva	56.25	56.1586	53.8056	53.8482	54.6041	1.3464
	112.5	116.7303	114.3216	114.6702	115.2407	1.3017
	225	223.5112	226.0679	227.9473	225.8421	2.2266
	337.5	328.1066	338.4547	333.5009	333.3541	5.1756
	450	456.7433	448.6001	451.2833	452.2089	4.1497
	r^2	0.9985	0.9998	0.9996		
	b	0.0000	0.0000	0.0000		**CV**
	m	1.0000	1.0000	1.0000		**1.4124 %**

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

TABLA 24. Para evaluar la estabilidad de la muestra, se determinó el contenido del analito (m_i) en por ciento a diferentes tiempos.

	IP ($\breve{y}_0$)	1 h ($\breve{y}_1$)	2 hr ($\breve{y}_2$)	4hr ($\breve{y}_3$)	8 hr ($\breve{y}_4$)	24 hr ($\breve{y}_5$)
m_1	100.1570	99.2187	98.9079	98.9010	98.4399	84.5070
m_2	99.6860	98.9062	98.1279	98.2731	97.9719	84.1940
m_3	99.8430	99.5312	99.2199	99.6860	99.0639	84.1940

Donde IP es inmediatamente preparado y hr es el tiempo en horas.

TABLA 25. Después se procedió a calcular el valor de la diferencia absoluta de la media aritmética $|d_i|$ para cada tiempo de muestreo respecto a la media aritmética del análisis inicial ($\breve{y}_0$).

	IP ($\breve{y}_0$)	1 h ($\breve{y}_1$)	2 hr ($\breve{y}_2$)	4hr ($\breve{y}_3$)	8 hr ($\breve{y}_4$)	24 hr ($\breve{y}_5$)	Condiciones de almacenaje
m_1	100.1570	99.2187	98.9079	98.9010	98.4399	84.5070	Sin luz, temperatura ambiente.
m_2	99.6860	98.9062	98.1279	98.2731	97.9719	84.1940	
m_3	99.8430	99.5312	99.2199	99.6860	99.0639	84.1940	
Σy_0	299.6860	n_0	3	$\bar{y}_0$	99.8953		
Σy_1	297.6562	n_1	3	$\bar{y}_1$	99.2187	$\lvert d_1 \rvert$	0.6766
Σy_2	296.2558	n_2	3	$\bar{y}_2$	98.7519	$\lvert d_2 \rvert$	1.1434
Σy_3	296.8603	n_3	3	$\bar{y}_3$	98.9534	$\lvert d_3 \rvert$	0.9419
Σy_4	295.4758	n_4	3	$\bar{y}_4$	98.4919	$\lvert d_4 \rvert$	1.4034
Σy_5	252.8951	n_5	3	$\bar{y}_5$	84.2984	$\lvert d_5 \rvert$	15.5969

TABLA 26. Estimación de las varianzas ponderadas para evaluar el intervalo de confianza.

		Varianzas ponderadas	
S^2_0	0.0575		
S^2_1	0.0976	Sp^2_0	0.0517
S^2_2	0.3164	Sp^2_1	0.1246
S^2_3	0.5011	Sp^2_2	0.1862
S^2_4	0.3002	Sp^2_3	0.1192
S^2_5	0.0326	Sp^2_4	0.0300

TABLA 27. Intervalos de confianza (IC) estimados para determinar la estabilidad de las muestras analizadas de equinácea. La muestra se considera no es estable bajo las condiciones preestablecidas, debido a que el intervalo de confianza no incluye el valor de cero.

IC_1	-1.0702 a 0.2829	ESTABLE
IC_2	-1.0778 a 0.1442	ESTABLE
IC_3	-0.5454 a 0.9483	ESTABLE
IC_4	-1.0563 a 0.1333	ESTABLE
IC_5	-14.4936 a -13.8934	NO ESTABLE

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

2. VALIDACIÓN PARA PROPÓLEO

a. Sistema

TABLA 28. Para evaluar la linealidad del sistema se obtuvieron las lecturas (absorbancia) correspondientes, se calculó el valor de la pendiente (m), la ordenada al origen (b), el coeficiente de determinación (r^2) y el coeficiente de variación (CV).

[µg / mL]	Absorbancia			Promedio	Desviación estándar
12.5	0.2320	0.2310	0.2330	0.2320	0.0010
25	0.4510	0.4500	0.4511	0.4507	0.0006
50	0.8770	0.8760	0.8765	0.8765	0.0005
75	1.3409	1.3410	1.3400	1.3406	0.0005
100	1.7328	1.7199	1.7618	1.7382	0.0215
r^2	0.9994	0.9991	0.9998	**0.9994**	
b	0.0191	0.0215	0.0113	0.0173	**CV**
m	0.0173	0.0172	0.0175	0.0174	**2.4438 %**

TABLA 29. Para estimar la precisión del sistema, se obtuvieron las lecturas (absorbancia) para calcular el valor de la media aritmética ($\bar{y}$), la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV).

	Absorbancia
	0.942
	0.914
	0.925
	0.916
	0.921
	0.929
$\bar{y}$	0.9245
SD	0.0102
CV	**1.1047 %**

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

b. Método

TABLA 30. Para estimar la linealidad del método se determinó la cantidad recuperada y se calculó el valor de la pendiente (m), la ordenada al origen (b), el coeficiente de determinación (r^2) y el coeficiente de variación (CV).

[µg / mL]	Cantidad recuperada			Promedio F	Desviación estándar F
12.5	12.5142	13.0805	12.8791	12.8246	0.2871
25	23.0891	24.2193	24.8589	24.0557	0.8962
50	52.7103	49.9557	51.5065	51.3908	1.3809
75	75.2622	75.3989	71.0832	73.9148	2.4531
100	98.9241	99.8456	102.1722	100.3140	1.67391
r^2	0.9976	0.9980	0.9948	**0.9968**	
b	0.0000	0.0000	0.0000		**CV**
m	1.0000	1.0000	1.0000		**2.7277 %**

TABLA 31. Para estimar la repetibilidad, se determinó la cantidad recuperada del analito y se procedió a calcular el valor de la media aritmética ($\bar{y}$), la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV) correspondientes al porcentaje de recobro.

Absorbancia	Cantidad Adicionada	Cantidad Recuperada	% Recobro	Solución de referencia
0.8647	50	49.3550	98.7100	0.876
0.8815	50	50.3139	100.6278	
0.8817	50	50.3253	100.6507	
0.8820	50	50.3425	100.6849	
0.8650	50	49.3721	98.7443	
0.8830	50	50.3995	100.7991	
Σ	600.2169		$\bar{y}$	100.0361
Σy^2	60048.5450		**SD**	1.01570
n	6		**CV**	**1.01533 %**

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

TABLA 32. Para calcular la exactitud se obtuvo la cantidad recuperada de analito a través de las lecturas obtenidas. Se procedió a calcular el valor de la media aritmética ($\bar{y}$), la desviación estándar (SD), el coeficiente de variación (CV) y se utilizó el porcentaje de recobro para calcular el intervalo de confianza IC (μ).

Solución de referencia	Absorbancia	Cantidad Adicionada	Cantidad Recuperada	% Recobro
0.876	0.8647	50	49.3550	98.7100
	0.8815	50	50.3139	100.6278
	0.8817	50	50.3253	100.6507
	0.8820	50	50.3425	100.6849
	0.8650	50	49.3721	98.7443
	0.8830	50	50.3995	100.7991
Σ	600.2169		$\bar{y}$	100.03615
Σy^2	60048.5450		**SD**	1.0157
n	6		**CV**	**1.0153 %**
			$IC_{recobro}$	
			98.710 % - 100.799 %	

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

TABLA 33. Se estimó la cantidad recuperada, para calcular el valor correspondiente a la media aritmética ($\bar{y}$), la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV) para evaluar la precisión intermedia.

	[µg/mL]	Cantidad Recuperada			Promedio F	Desviación Estándar F
1ª Curva	12.5	12.5142	12.2798	12.9813	12.5918	0.3571
	25	23.0891	24.6543	23.7368	23.8267	0.7865
	50	52.7103	51.1204	50.7569	51.5292	1.0389
	75	75.2622	74.5669	75.5909	75.1400	0.5228
	100	98.9241	99.8785	99.4339	99.4122	0.4776
	r^2	0.9976	0.9997	0.9994		
	b	0.0000	0.0000	0.0000		**CV**
	m	1.0000	1.0000	1.0000		**1.8658 %**
2ª Curva	12.5	13.0805	12.8685	12.4834	12.8108	0.3027
	25	24.2193	24.5316	24.6613	24.4707	0.2272
	50	49.9557	49.7537	50.0416	49.9170	0.1478
	75	75.3989	75.6078	75.9910	75.6659	0.3003
	100	99.8456	99.7383	99.3227	99.6355	0.2762
	r^2	0.9998	0.9998	0.9997		
	b	0.0000	0.0000	0.0000		**CV**
	m	1.0000	1.0000	1.0000		**0.8524 %**
3ª Curva	12.5	12.8791	12.9795	11.8560	12.5715	0.62170
	25	24.8589	24.3740	25.1770	24.8033	0.4044
	50	51.5065	51.3546	50.8035	51.2216	0.3699
	75	71.0832	72.4905	75.1158	72.8965	2.0467
	100	102.172	101.3014	99.5476	101.0070	1.3368
	r^2	0.9956	0.9980	0.9997		
	b	0.0000	0.0000	0.0000		**CV**
	m	1.0000	1.0000	1.0000		**2.2858 %**

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

TABLA 24. Para evaluar la estabilidad de la muestra, se determinó el contenido del analito (m_i) en por ciento a diferentes tiempos.

	IP ($\check{y}_0$)	1 h ($\check{y}_1$)	2 hr ($\check{y}_2$)	4hr ($\check{y}_3$)	8 hr ($\check{y}_4$)	24 hr ($\check{y}_5$)
m_1	0.848	0.850	0.842	0.836	0.840	0.795
m_2	0.847	0.849	0.837	0.825	0.826	0.794
m_3	0.849	0.863	0.835	0.830	0.836	0.809

Donde IP es inmediatamente preparado y hr es el tiempo en horas.

TABLA 25. Después se procedió a calcular el valor de la diferencia absoluta de la media aritmética $|d_i|$ para cada tiempo de muestreo respecto a la media aritmética del análisis inicial ($\check{y}_0$).

	IP ($\check{y}_0$)	1 h ($\check{y}_1$)	2 hr ($\check{y}_2$)	4hr ($\check{y}_3$)	8 hr ($\check{y}_4$)	24 hr ($\check{y}_5$)	Condiciones de almacenaje
m_1	98.7194	98.7224	99.6450	98.5849	98.8235	93.0913	Sin luz, temperatura ambiente.
m_2	98.6030	98.6063	99.0532	97.2877	97.1765	92.9742	
m_3	98.8358	100.2323	98.8166	97.8773	98.3529	94.7307	
Σy_0	296.1583	n_0	3	$\bar{y}_0$	98.7194		
Σy_1	297.5610	n_1	3	$\bar{y}_1$	99.1870	$\lvert d_1 \rvert$	0.4675
Σy_2	297.5148	n_2	3	$\bar{y}_2$	99.1716	$\lvert d_2 \rvert$	0.0154
Σy_3	293.7500	n_3	3	$\bar{y}_3$	97.9167	$\lvert d_3 \rvert$	1.2549
Σy_4	294.3529	n_4	3	$\bar{y}_4$	98.1176	$\lvert d_4 \rvert$	0.2010
Σy_5	280.7962	n_5	3	$\bar{y}_5$	93.5987	$\lvert d_5 \rvert$	4.5189

TABLA 26. Estimación de las varianzas ponderadas para evaluar el intervalo de confianza.

		Varianzas ponderadas	
S^2_0	0.0135		
S^2_1	0.8228	Sp^2_0	0.2788
S^2_2	0.1821	Sp^2_1	0.0652
S^2_3	0.4218	Sp^2_2	0.1451
S^2_4	0.7197	Sp^2_3	0.2444
S^2_5	0.9644	Sp^2_4	0.3260

TABLA 27. Intervalos de confianza (IC) estimados para determinar la estabilidad de las muestras analizadas de propóleo. La muestra se considera no estable bajo las condiciones preestablecidas, debido a que el intervalo de confianza no incluye el valor de cero.

IC_1	-0.4464	a	1.3815	ESTABLE
IC_2	-0.4574	a	0.4266	ESTABLE
IC_3	-1.9143	a	-0.5955	NO ESTABLE
IC_4	-0.6548	a	1.0567	ESTABLE
IC_5	-5.5071	a	-3.5306	NO ESTABLE

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

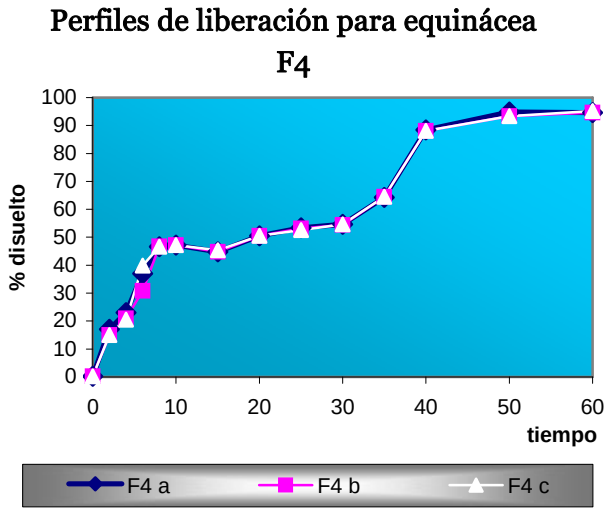
Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

ANEXO 3

PRUEBA DE DISOLUCIÓN

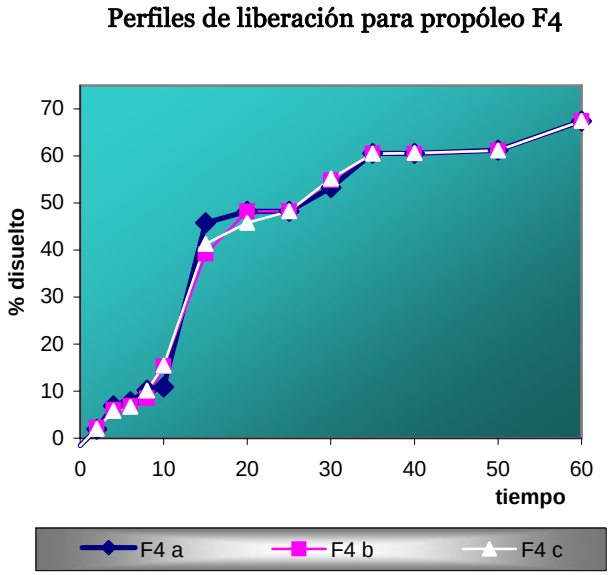
FORMULACIÓN 4 (F_4)			
tiempo	% disuelto		
0	0.002	0.001	0.001
2	17.083	15.008	15.008
4	23.048	20.973	20.454
6	37.052	30.828	39.904
8	46.647	46.777	46.647
10	47.166	47.166	47.165
15	44.832	44.832	45.350
20	50.537	50.537	50.537
25	53.390	53.130	52.612
30	54.687	54.427	54.686
35	64.282	64.541	64.541
40	88.400	88.141	88.140
50	94.883	93.327	93.326
60	94.624	94.624	95.141

TABLA 36a. Resultados obtenidos en la prueba de disolución para F_4 para equinácea.



F_4			
tiempo	% disuelto		
0	0.000	0.001	0.001
2	1.901	2.246	1.995
4	6.891	6.075	5.792
6	7.770	6.891	6.671
8	10.217	8.491	10.155
10	10.908	15.301	15.427
15	45.775	39.184	41.287
20	48.223	48.223	45.775
25	48.254	48.285	48.223
30	53.307	54.876	55.190
35	60.556	60.588	60.525
40	60.556	60.525	60.619
50	61.247	61.184	61.152
60	67.429	67.429	67.429

TABLA 36b. Resultados obtenidos en la prueba de disolución para F_4 para propóleo.

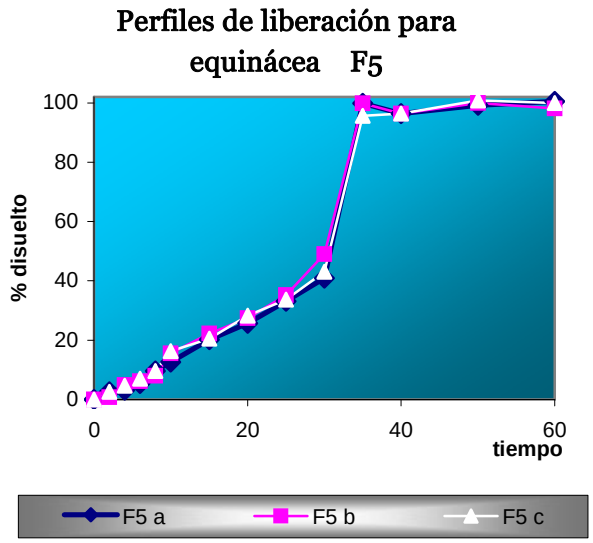


Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

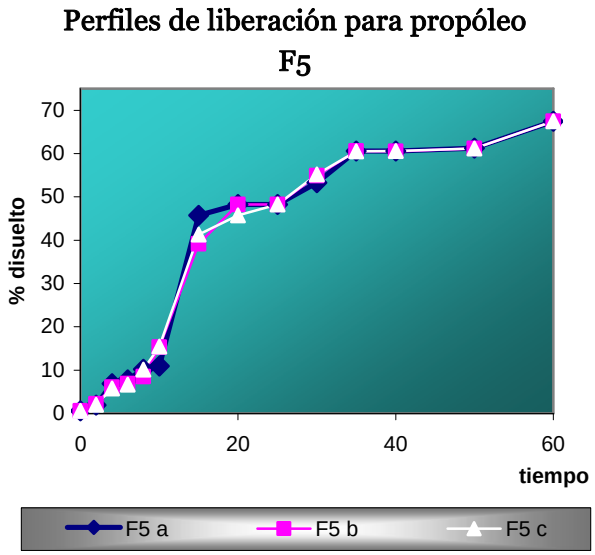
FORMULACIÓN 5 (F_5)			
tiempo	% disuelto		
0	0.003	0.001	0.003
2	2.560	0.745	2.560
4	3.079	4.894	4.635
6	5.413	6.191	6.969
8	9.562	8.006	9.562
10	12.674	15.527	16.305
15	20.195	22.270	20.454
20	25.641	27.456	28.234
25	33.162	35.236	33.680
30	40.942	48.981	43.016
35	99.811	99.811	95.661
40	96.439	96.439	96.439
50	100.014	100.041	100.085
60	100.182	100.400	100.441

TABLA 37a. Resultados obtenidos en la prueba de disolución para F_5 para equinácea.



F_5			
tiempo	% disuelto		
0	0.001	0.002	0.001
2	1.901	2.246	1.995
4	6.891	6.075	5.792
6	7.769	6.891	6.671
8	10.217	8.491	10.155
10	10.908	15.301	15.427
15	45.775	39.184	41.287
20	48.222	48.222	45.775
25	48.254	48.285	48.222
30	53.307	54.876	55.190
35	60.556	60.588	60.525
40	60.556	60.525	60.619
50	61.247	61.184	61.152
60	67.429	67.429	67.429

TABLA 37b. Resultados obtenidos en la prueba de disolución para F_5 para propóleo.

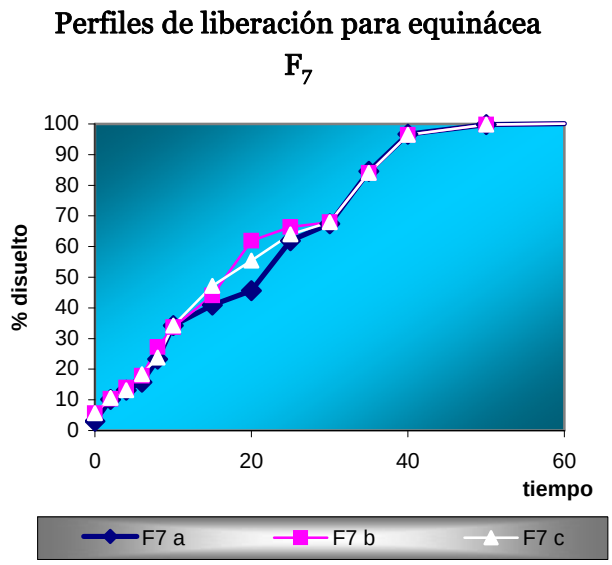


Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

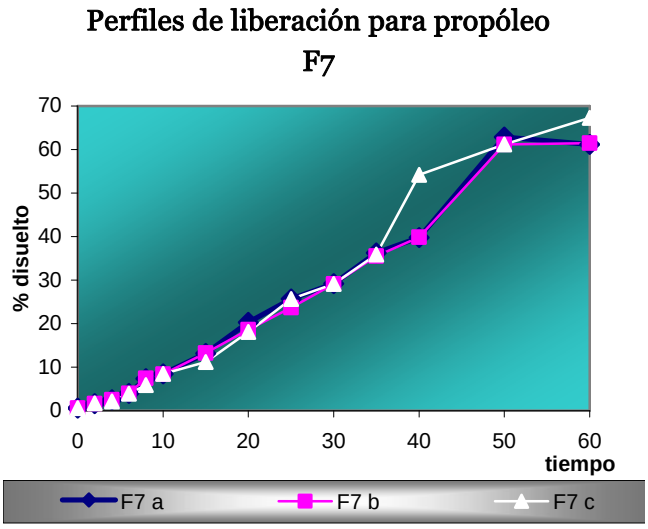
FORMULACIÓN 7 (F_7)			
tiempo	% disuelto		
0	0.004	0.001	0.002
2	10.081	10.340	10.599
4	13.193	13.971	13.193
6	15.786	17.861	18.380
8	23.307	27.197	23.826
10	34.199	33.680	34.199
15	40.942	44.054	47.166
20	45.610	61.948	55.464
25	61.948	66.357	64.022
30	67.394	67.913	67.913
35	84.510	83.991	83.991
40	96.699	96.439	96.439
50	99.811	99.811	99.811
60	100.059	100.058	100.055

TABLA 38a Resultados obtenidos en la prueba de disolución para F_7 para equinácea.



F_7			
tiempo	% disuelto		
0	0.000	0.000	0.001
2	1.650	1.618	1.681
4	2.528	2.497	2.152
6	3.941	3.972	3.878
8	7.361	7.424	5.886
10	8.428	8.365	8.460
15	13.167	13.262	11.190
20	20.260	18.597	18.063
25	25.689	23.712	25.689
30	29.173	29.141	29.110
35	36.265	35.481	35.889
40	39.812	39.843	54.217
50	62.878	61.152	61.184
60	61.152	61.466	67.303

TABLA 38b. Resultados obtenidos en la prueba de disolución para F_7 para propóleo.

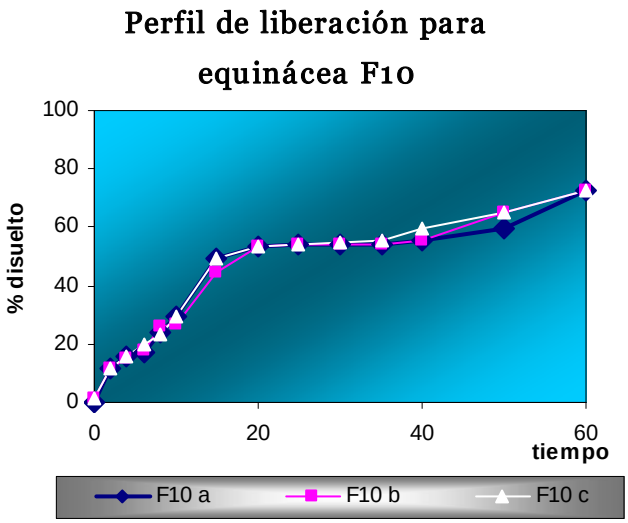


Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

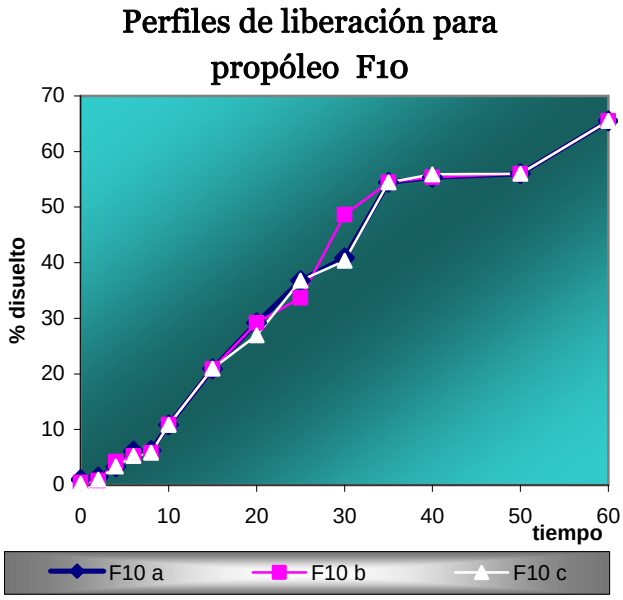
FORMULACIÓN 10 (F_{10})			
tiempo	% disuelto		
0	0.005	0.003	0.005
2	11.637	11.637	11.896
4	15.527	15.008	15.527
6	17.342	18.120	20.195
8	23.826	26.159	23.307
10	29.272	26.938	29.271
15	48.981	44.572	48.981
20	53.390	53.389	53.386
25	53.908	53.906	53.908
30	54.168	54.167	54.686
35	54.427	54.425	55.464
40	55.205	55.205	59.614
50	59.355	65.060	64.800
60	72.890	72.580	72.840

TABLA 39a. Resultados obtenidos en la prueba de disolución para F_{10} para equinácea.



F_{10}			
tiempo	% disuelto		
0	0.009	0.004	0.002
2	1.430	0.834	0.991
4	3.282	4.192	3.313
6	6.106	5.227	5.259
8	6.200	5.792	5.824
10	10.814	10.876	10.814
15	20.919	20.888	20.982
20	29.173	29.170	26.913
25	36.799	33.660	36.799
30	40.879	48.662	40.377
35	54.436	54.436	54.436
40	55.378	55.378	55.880
50	56.005	56.007	56.037
60	65.483	65.483	65.515

TABLA 39b. Resultados obtenidos en la prueba de disolución para F_{10} para propóleo.



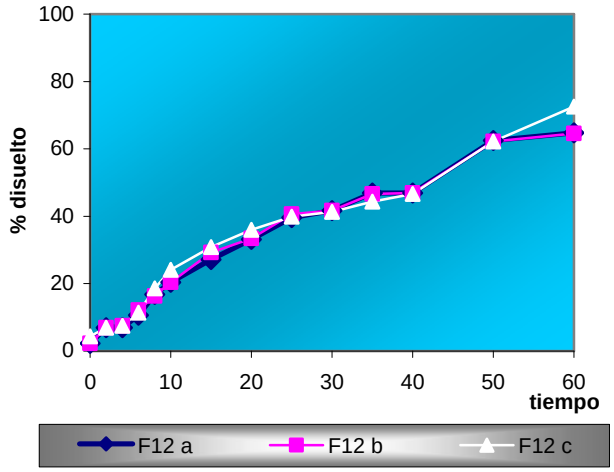
Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

FORMULACIÓN 12 (F_{12})			
tiempo	% disuelto		
0	0.000	0.001	0.000
2	6.969	6.969	6.968
4	6.969	7.487	7.487
6	10.599	12.156	11.378
8	16.824	16.305	18.639
10	20.454	20.454	24.085
15	27.197	29.272	30.828
20	33.161	33.421	36.014
25	39.645	40.682	39.904
30	41.720	41.720	41.357
35	46.906	46.647	44.313
40	46.906	46.906	46.647
50	62.466	62.207	62.207
60	64.800	64.541	72.581

TABLA 40a. Resultados obtenidos en la prueba de disolución para F_{12} para equinácea.

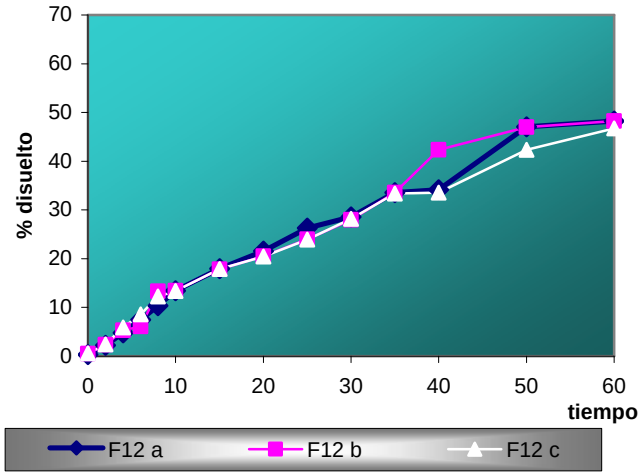
Perfiles de liberación para equinácea F12



F_{12}			
tiempo	% disuelto		
0	0.003	0.005	0.001
2	2.246	2.340	2.403
4	4.788	5.322	5.886
6	7.487	6.106	8.554
8	10.343	13.324	12.289
10	13.418	13.450	13.356
15	17.938	17.843	17.875
20	21.547	20.511	20.448
25	26.254	23.963	23.900
30	28.577	27.980	28.200
35	33.535	33.566	33.378
40	34.163	42.322	33.535
50	47.030	46.999	42.322
60	48.254	48.253	46.716

TABLA 40b. Resultados obtenidos en la prueba de disolución para F_{12} para propóleo.

Perfiles de liberación para propóleo F12



Created by eDocPrinter PDF Pro!!

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

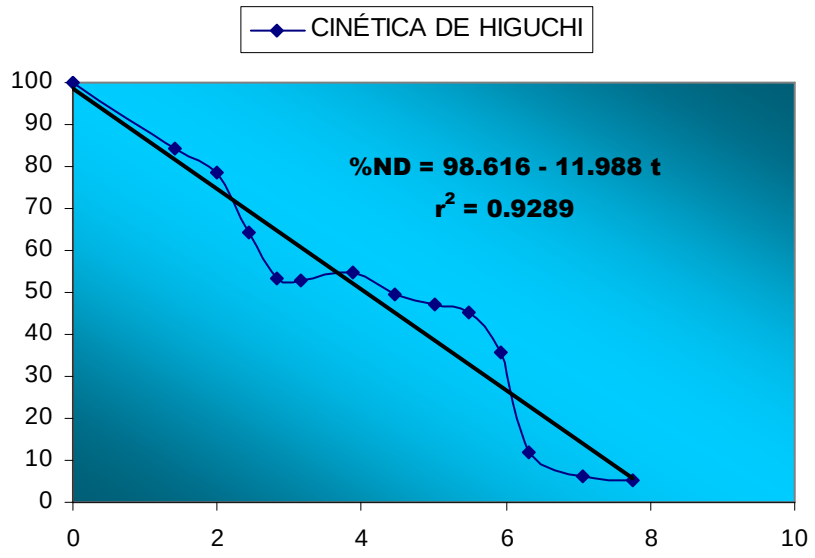
ANEXO 4

TABLA 38a. Estimación de los diferentes modelos matemáticos para determinar la cinética de liberación de la formulación 4 (equinácea).

Modelo	r^2	pendiente	intercepto
Higuchi	0.9289	11.9877	98.6155
Orden cero	0.8744	1.3962	79.5969
Primer orden	0.8776	-0.0467	4.6297
Hixson & Crowell	0.9054	0.0456	4.4645

a. Equinácea

t ½	% No Disuelto
0	100
1.4142	89.5235
2.000	85.5243
2.4495	75.6062
2.8284	67.9159
3.1623	67.5022
3.8730	68.64833
4.4721	64.8179
5.000	63.0860
5.4772	61.8032
5.9161	55.0006
6.3245	39.1315
7.0711	35.4253
7.7460	34.1630
r	**-0.9636**
r^2	**0.9289**
k	**-11.9877**
% ND_0	**98.6155**



GRÁFICA 8. Cinética obtenida para equinácea en F_4.

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

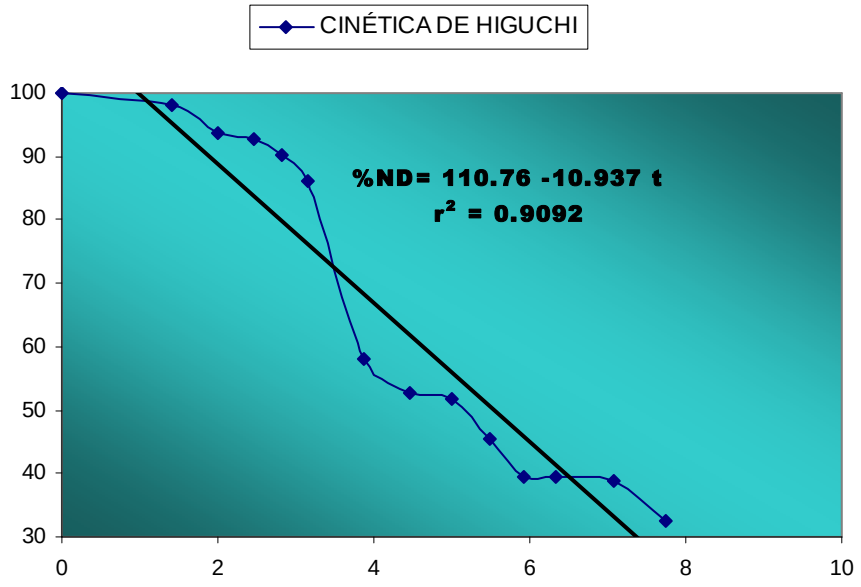
Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

TABLA 38b. Estimación de los diferentes modelos matemáticos para determinar la cinética de liberación de la formulación 4 (propóleo).

Modelo	r^2	pendiente	intercepto
Higuchi	0.9092	10.9368	110.7552
Orden cero	0.8429	0.2641	93.1934
Primer orden	0.9037	-0.0207	4.5597
Hixson & Crowell	0.8840	0.0270	4.5551

b. Propóleo

$t_{½}$	% No Disuelto
0	99.9993
1.4142	97.9526
2.000	93.7473
2.4495	92.8893
2.8284	90.3790
3.1623	86.1213
3.8730	57.9180
4.4721	52.5930
5.000	51.7460
5.4772	45.5423
5.9161	39.4437
6.3245	39.4333
7.0711	38.8057
7.7460	32.5710
r	**-0.9535**
r^2	**0.9092**
k	**-10.9368**
% ND_o	**110.7552**



GRÁFICA 9. Cinética obtenida para propóleo en F_4.

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 Hoogstraate JA, Wertz PW. Drug delivery via the buccal mucosa. Pharmaceutical Science & Technology Today 1998; 1: 309-316.

2 Cilurzo F, Minghetti P, Selmin F, Casiraghi A, Montanari L. Polymethacrylate salts as new low-swellable mucoadhesive materials. Journal of Controlled Release 2003; 88: 43-53.

3 Shojaei AH, Zhou S, Li X. Transbuccal delivery of acyclovir (II): feasibility, system design, and *in vitro* permeation studies. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science 1998; 2: 66-73.

4 Castellanos JL. Mucosa bucal. Revista de la Asociación Dental Mexicana 2002; 59: 73.

5 Birudaraj R, Berner B, Shen S, Li X. Buccal permeation of buspirone: mechanistic studies on transport pathways. Journal of Pharmaceutical Sciences 2005; 94: 70-78.

6 Senel S, Hincal AA. Drug permeation enhancement via buccal route: possibilities and limitations. Journal of Controlled Release 2001; 22: 133-144.

7 Squier CA. The permeability of oral mucosa. Critical Reviews in Oral Biology ε Medicine 1991; 2:13-32.

8 Jablonski C. Diccionario ilustrado de odontología. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires 1992.

9 Shojaei AH. Buccal Mucosa as a route for systemic drug delivery: a review. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science 1998; 1: 15-30.

10 Nicolazzo JA, Reed BL, Finnin BC. The effect of various *in vitro* conditions on the permeability characteristics of the buccal mucosa. Journal of Pharmaceutical Sciences 2003; 92: 2399-2410.

11 Lee J, Kil Lee S, Choi YW, The effect of storage conditions on the permeability of porcine buccal mucosa. Archives Pharmacal Research 2002; 25: 546-549.

12 Rodríguez C, Cerezo A, Salem I. Sistemas de liberación bioadhesivos. Ars Pharmaceutica 2000; 1: 115-128.

13 Peppas NA, Sahlin JJ. Hydrogels as mucoadhesive and bioadhesive materials: a review. Biomaterials 1996; 17: 1553-1561.

14 Martin L, Wilson G, Koosha F, Uchegbu IF. Sustained buccal delivery of the hydrophobic drug denbufylline using physically cross-linked palmitoyl glycol chitosan hydrogels. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2003; 55: 35-45.

15 Eouani C, Piccerelle P, Prinderrea P, Bourret E, Joachim J. *In-vitro* comparative study of buccal mucoadhesive performance of different polymeric films. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2001; 52: 45-55.

16 Mashru R, Sutariya V, Sankalia M, Sankalia J. Transbuccal delivery of lamotrigine across porcine buccal mucosa: *in vitro* determination of routes of buccal transport. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science 2005; 8: 54-62.

17 Desai GH, Pramod KM. Preparation and evaluation of a novel buccal adhesive system. American Association of Pharmaceutical Scientist Pharmaceutical Science and Technology 2004; 5: 1-9.

18 Salamat-Miller N, Chittchang M, Johnston T. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. Advanced Drug Delivery Reviews 2005; 57: 1666 – 1691.

19 Prescott L, Harley J, Klein D. Microbiología. 4ª ed, Madrid: Mc Graw Hill Interamericana, 2000: 391, 401, 542, 551, 594, 837, 948-949.

20 Repka MA, McGinity JW. Bioadhesive properties of hydroxypropylcellulose topical films produced by hot-melt extrusion. Journal of Controlled Release 2001; 70: 341–351.

21 Hägerström H. Polymer gels as pharmaceutical dosage forms. Acta Universitatis Upsaliensis 2003; 13-16.

22 Shojaei AH, Li X. Mechanisms of buccal mucoadhesion of novel copolymers of acrylic acid and polyethylene glycol monomethylether monomethacrylate. Journal of Controlled Release 1997; 47: 151-161.

23 Miliauskas G, Venskutonis PR, Van Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food Chemistry 2004; 85: 231–237

24 Attia MA, El-Gibaly I, Shaltout E , Fetih N. Transbuccal permeation, anti-inflammatory activity and clinical efficacy of piroxicam formulated in different gels. International Journal of Pharmaceutics 2004; 276: 11–28.

25 Lee J, Wook YW. Enhanced *ex vivo* buccal transport of propranolol: evaluation of phospholipids as permeation enhancers. Archives Pharmacal Research 2003; 26: 421-425.

26 Hao J, Heng PW. Buccal delivery systems. Drug Development and Industrial Pharmacy 2003; 29: 821-832.

27 Chun MK, Kwak BT, Choi HK. Preparation of buccal patch composed of carbopol, poloxamer and hydroxypropyl methylcellulose. Archives Pharmacal Research 2003; 26: 973-978.

28 Gispert AE, Cantillo EE, Rivero LA, Padrón IM. Actividad anticaries de una crema dental con propóleos. Revista Cubana de Estomatología 2000; 37: 166-170.

29 Perioli L, Ambrogi V, Angelici F, Ricci M, Giovagnoli S, Capuccella M, Rossi C. Development of mucoadhesive patches for buccal administration of ibuprofen. Journal of Controlled Release 2004; 99: 73- 82.

30 Cafaggi S, Leardi R, Parodi B, Caviglioli G, Russo E, Bignardi G. Preparation and evaluation of a chitosan salt-poloxamer 407 based matrix for buccal drug delivery. Journal of Controlled Release 2005; 102: 159-169.

31 Khoo C, Frantzich S, Rosinski A, Sjöström M, Hoogstraate J. Oral gingival delivery systems from chitosan blends with hydrophilic polymers. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2003; 55: 47–56.

32 Marschütz MK, Bernkop SA. Thiolated polymers: self-crosslinking properties of thiolated 450 kDa poly(acrylic acid) and their influence on mucoadhesion. European Journal of Pharmaceutical Sciences 2002; 15: 387-394.

33 Irwin C, McCullough K, Jones D. Chlorhexidine-containing mucoadhesive polymeric compacts designed for use in the oral cavity: an examination of their physical properties, *in vitro/in vivo* drug release properties and clinical acceptability. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 2003; 14: 825-832.

34 Bernkop SA, König V, Leitner VM, Krauland H, Brodnik I. Preparation and characterisation of thiolated poly (methacrylic acid)–starch compositions. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2004; 57: 219–224.

35 Wong CF, Yuen KH, Peh KK. Formulation and evaluation of controlled release Eudragit buccal patches. International Journal of Pharmaceutics 1999; 178: 11-22.

36 Leitner VM, Marschütz MK, Bernkop SA. Mucoadhesive and cohesive properties of poly(acrylic acid)-cysteine conjugates with regard to their molecular mass. European Journal of Pharmaceutical Sciences 2003; 18: 89-96.

37 Nafee AN, Ismail FA, Boraie NA, Mortada LM. Mucoadhesive buccal patches of miconazole nitrate: *in vitro/in vivo* performance and effect of ageing. International Journal of Pharmaceutics 2003; 264: 1-14.

38 Tan TY, Peh KK, Al-Hanbali O. Effect of carbopol and polyvinylpyrrolidone on the mechanical, rheological, and release properties of bioadhesive polyethylene glycol gels. American Association of Pharmaceutical Scientist Pharmaceutical Science and Technology 2000; 1: 1-10.

39 Jung SW, Jeong Y, Kim Y, Kim SH. Self-assembled polymeric nanoparticles of poly(ethylene glycol) grafted pullulan acetate as a novel drug carrier. Archives Pharmacal Research 2004; 27: 562-569.

40 Shahrzad M, Reza F. A novel approach in the assessment of polymeric film formation and film adhesion on different pharmaceutical solid substrates. American Association of Pharmaceutical Scientist Pharmaceutical Science and Technology 2004;5: 1-8.

41 Kockisch S, Rees G, Young SA, Tsibouklis J, Smart JD. Polymeric microspheres for drug delivery to the oral cavity: an *in vitro* evaluation of mucoadhesive potential. Journal of Pharmaceutical Sciences 2003; 92: 1614-1623.

42 Meier MM, Kanis LA, Soldi V. Characterization and drug-permeation profiles of microporous and dense cellulose acetate membranes: influence of plasticizer and pore forming agent. International Journal of Pharmaceutics 2004; 278: 99-110.

43 Tarvainen M, Sutinen R, Somppi M, Paronen P, Poso A. Predicting plasicization efficiency from three-dimensional molecular structure of a polymer plasticizer. Pharmaceutical Research 2001; 18: 1760- 1766.

44 Calixto JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines: phototherapeutic agents. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 2000; 33: 179-189

45 Carey F. Química orgánica. 3ª ed, Madrid: Mc Graw Hill Interamericana, 2000: 945-950.

46 Nicolazzo JA, Reed BL, Finnin BC. Modification of buccal drug delivery following pretreatment with skin penetration enhancers. Journal of Pharmaceutical Sciences 2004; 93: 2054-2063.

47 Brinkmann I, Müller-Goymann C. Role of isopropyl myristate, isopropyl alcohol and a combination of both in hydrocortisone permeation across the human stratum corneum. Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology 2003; 16: 393- 404.

48 Shin SC, Kim JY. Enhanced permeation of triamcinolone acetonide through the buccal mucosa. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2000; 50: 217-220.

49 Cha BJ, Lee ED, Kim W, Chung SJ, Lee MH, Shim C. Enhanced skin permeation of a new capsaicin derivate (DA-5018) from a binary vehicle system composed of isopropyl myristate and ethoxydiglycol. Archives Pharmacal Research 2001; 24: 224-228.

50 Junginger HE, Hoogstraate JA, Coss VJ. Recent advances in buccal drug delivery and absorption - *in vitro* and *in vivo* studies. Journal of Controlled Release 1999; 62: 149-159.

51 Gennaro AR. Remington Farmacia. 20ª ed, México:Editorial Médica Panamericana, 2000: 975, 1321.

52 O'Neil M, Smith A, Heckelman P, comp. Index Merck 30ª ed, USA: Merck & Co Inc, 2001:112, 933, 1358-1359, 1791, 7777.

53 Minghetti P, Cilurzo F, Tosi L, Casiraghi A, Montanari L. Design of a new water-soluble pressure-sensitive adhesive for patch preparation. American Association of Pharmaceutical Scientist Pharmaceutical Science and Technology 2003; 4: 1-9.

54 Bankova VS, Castro SL, Marcucci MC, Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie 2000; 31: 3-14.

55 Melliou E, Chinou I. Chemical analysis and antimicrobial activity of Greek Propolis. Planta Medica 2004; 70: 515-519.

56 Farré R, Frasquet I, Sánchez A. El propolis y la salud. Ars Pharmaceutica 2004 45:1; 21-43.

57 Rhajaoui M, Oumzil H, Faid M, Lyagoubi M, Elyachioui M, Benjouad A. Antibacterial activity of a moroccan propolis extracts. Science Letters 2001; 3: 1-7.

58 Kuklinski C. Farmacognosia estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural, Barcelona: Ediciones Omega, 2003: 139.

59 González M, Guzmán B, Rudyk R, Romano E, Molina MA. Spectrophotometric determination of phenolic compounds in Propolis. Acta Farmacéutica Bonaerense 2003; 22: 243-248.

60 Pérez Capote MR, Rodríguez Torres CC, León Fernández OS, *et al.* Evaluación toxicológica de una tintura de Propóleos. Acta Farmacéutica Bonaerense 2003; 22: 61-64.

61 Song S, Park E, Jung KJ, Jin C. Inhibition of angiogenesis by Propolis. Archives Pharmacal Research 2002: 25; 500-504.

62 Sawaya AC, Palma AM, Caetano FM, *et al.* Comparative study of *in vitro* methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of Candida. Letters in Applied Microbiology 2002; 35: 203-207.

63 Tolosa L, Cañizares E.The collection, characterisation and evaluation of antimicrobial activity of propolis extracts from Campeche, Mexico. Ars Pharmaceutica 2002; 43:187-204.

64 Santos FA, Bastos EM, Maia AB, *et al.* Brazilian propolis: physicochemical properties, plant origin and antibacterial activity on periodonto-pathogens. Phytotherapy Research 2003; 17: 285-289.

65 Barrett B. Medicinal properties of *Echinacea*: a critical review. Phytomedicine 2003; 10: 66-86.

66 Cebrián J. Diccionario integral de plantas medicinales. Barcelona: RBA Libros, 2002: 405-406.

67 Schulz H, Pfeffer S, Quilitzsch R, Stever B, Reif K. Rapid and non-destructive determination of the echinacoside content in *Echinacea* roots by ATR-IR and NIR Spectroscopy. Planta Medica 2002; 68: 926-929.

68 Dietz B. Heilmann J, Bauer R. Absorption of dodeca-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraenoic acid isobutylamides after oral application of *Echinacea purpurea* tincture. Planta Medica 2001; 67: 863-864.

69 Wang HM, To K. Agrobacterium-mediated transformation in the high-value medicinal plant *Echinacea purpurea*. Plant Science 2004; 166: 1087-1096.

70 Binns SE, Purgina B, Bergeron C, *et al*. Light-mediated antifungal activity of *Echinacea* extracts. Planta Medica 2000; 66: 241-244.

71 Binns S, Hudson J, Merali S, Arnason T. Antiviral activity of characterized extracts from *Echinacea spp*. (Heliantheae: Asteraceae) against herpes simplex virus (HSV-I). Planta Medica 2002; 68: 780-783.

72 Raso MG, Pacilio M, Di Carlo G, Esposito E, Pinto L, Meli R. *In-vivo* and *in-vitro* anti-inflammatory effect of *Echinacea purpurea* and *Hypericum perforatum*. Journal of Pharmacy and Pharmacology 2002; 54: 1379-1383.

73 Bodinet C, Freudenstein J. Effects of an orally applied aqueous-ethanolic extract of a mixture of Thujae occidentalis herba, Baptisiae tinctoriae Radix, *Ehinaceae purpureae* radix and *Echinaceae pallidae* radix on antibody response against sheep red blood cells in mice. Planta Medica 1999; 65: 695-699.

74 Perry NB, van Klink JW, Burgess EJ, Parmenter GA. Alkamide Levels in *Echinacea purpurea*: effects of processing, drying and storage. Planta Medica 2000; 66: 54-56.

75 Laasonen M, Wennberg T, Harmia-Pulkkinen T, Vuorela H. Simultaneous analysis of alkamides and caffeic acid derivatives for the identification of *Echinacea purpurea*, *Echinacea angustifolia*, *Echinacea pallida* and *Parthenium integrifolium* Roots. Planta Medica 2002; 68: 512-574.

76 Pomponio R, Gotti R, Hudaib M, Cavrini V. Analysis of phenolic acids by micellar electrokinetic chromatography: application to *Echinacea purpurea* plant extracts. Journal of Chromatography A 2002; 945: 239-247.

77 Mentel R, Wegner U, Lindequist U, Teuschert E, Freudenstein J. Effect of oral application of an immunodulating plant extract on Influenza virus type A infection in mice. Planta Medica 2002; 68: 896-900.

78 Secretaría de Salud**.** Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 8ª ed. México: Secretaría de Salud, 2004: vol. 1: 24, 355-357, 374-376, 392-393,397, 417-422, 476-482, 487-497, 517-521, 542-543.

79 Hanson AW. Handbook of dissolution testing.2ª ed, USA: Aster Publishing Corporation, 1991: 53-65.

80 Banakar V. Pharmaceutical dissolution testing. USA: Marcel Dekker, 1992: 133-189.

81 Delgado MI, Cucala J, Obach R. Validation of an automated sampling system with Franz diffusion cells. Drug Development and Industrial Pharmacy 1994; 20: 2268-2283.

82 Naffe NA, Boraie NA, Ismail FA, Mortada LM. Design and characterization of mucoadhesive buccal patches containing cetylpyridinium chloride. Acta Pharmaceutica 2003; 53: 199-212.

83 Yoshida H, Tamura S, Toyoda T, Kado K, Ohnishi N, Ibuki R. *In vitro* release of tacrolimus from tacrolimus ointment and its speculated mechanism. International Journal of Pharmaceutics 2004; 270: 55-64.

84 Secretaría de Salud. Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. México: Secretaría de Salud, 2002: 34-38, 44-69.

85 Accili D, Menghi G, Bonacucina G, Di Martino P, Palmieri GF. Mucoadhesion dependence of pharmaceutical polymers on mucosa characteristics. European Journal of Pharmaceutical Sciences 2004; 22: 225-234.

86 Kahn A, Peh K, Ch'ng HS. Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science 2000; 3: 303-311.

87 Gerlach RW, Zhou X. Blanqueamiento vital con tiras blanqueadoras: Resumen de investigaciones clínicas sobre su eficacia y tolerabilidad. The Journal of Contemporary Dental Practice 2001; 3: 1-15.

88 Percival SS. Commentary: Use of Echinacea in Medicine. Biochemical Pharmacology 2000; 60: 155–158.

89 United States Pharmacopeia, 27th ed, USA: Mack Publishers, 2004: 1314:1317.

90 Oomah BD, Dumon D, Cardador-Martínez A,Godfrey DV. Characteristics of Echinacea seed oil. Food Chemistry 2005; 3: 1-9.

91 Pellati F, Benveniti S, Magro L, Melegari M, Soragni F. Analysis of phenolic compounds and radical scavenging activity of Echinacea spp.Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2004; 35: 289-301.

92 Bergeron C, Gafner S, Batcha LL. Stabilization of caffeic acid derivatives in *Echinacea purpurea* L. glycerin extract.Journal of Agricultural and Food Chemistry 2002; 14: 3967- 3970.

93 Pietta PG, Gardana C, Pietta AM. Analytical methods for quality control of propolis. Fitoterapia 2002; 73, S7- S20

94 Budhathoki U, Thapa P. Effect of chemical enhacers on in vitro release of salbutamol sulphate from transdermal patches. Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology 2005; 1: 1-8

95 Prošek M, Drusany I, Golc-Wondra A. Quantitative two-dimensional thin-layer chromatography. Journal of Chromatography A 1991; 553: 477-487

96 Gocana S, Cimpana G, Muresana L. Automated multiple development thin layer chromatography of some plant extracts. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 1996; 14: 1221-1227

97 Fitzgerald JE, Kurtz SM, Schardein JL, Kaump DH. Cutaneous and parenteral studies with vehicles containing isopropyl myristate and peanut oil. Toxicology and applied pharmacology 1968; 13: 448 – 453

98 Williams AC, Barry BW. Essential oils novel human skin penetration enhacers. International Journal of Pharmaceutics 1989; 57: R7 – R9

99 www. udea.edu.com

100 Brittain HG, Journal of Validation Technology 1997; 3: 275 – 279

101 Gohel M, Panchal MK, Jogani VV, Novel mathematical method for quantitative expression of deviation from the Higuchi model. American Association of Pharmaceutical Scientist Pharmaceutical Science and Technology 2000; 4: 1-6.