



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Elaboración y caracterización de laminillas
orodispersables con nanopartículas poliméricas
cargadas con gluconato de clorhexidina para el
tratamiento de enfermedades periodontales

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Licenciado en Farmacia

P R E S E N T A:

Luis Arturo Almonaci Ruiz

ASESORA:

Dra. Elizabeth Piñón Segundo

COASESOR:

Dr. David Quintanar Guerrero



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Elaboración y caracterización de laminillas orodispersables con nanopartículas poliméricas cargadas con gluconato de clorhexidina para el tratamiento de enfermedades periodontales.

Que presenta el pasante: Luis Arturo Almonaci Ruiz

Con número de cuenta: 308175659 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Farmacia

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 15 de Abril de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M.F.C. Ma. Eugenia R. Posada Galarza	
VOCAL	D.E.S.S. Rodolfo Cruz Rodríguez	
SECRETARIO	Dra. Elizabeth Pinón Segundo	
1er. SUPLENTE	Dr. Julio Cesar Botello Pozos	
2do. SUPLENTE	L.F. Miguel Angel Trejo Rodríguez	<u>Trejo Rodríguez Miguel A</u>

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/mmgm*



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Sistemas Farmacéuticos de Liberación Modificada (L-13) de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria ubicado en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México.

Investigación realizada gracias a los Programas:

- UNAM-DGPA-PAPIIT-IT 20614
- UNAM-DGPA-PAPIIT-IN 224111
- PIAPI C-05, FES-Cuautitlán
- CONACYT Ciencia Básica 128799

Se agradece el apoyo del Técnico Académico Rodolfo Robles, de la FES-Cuautitlán, en los estudios de microscopía electrónica de barrido.



AGRADECIMIENTOS

A mi madre, Azucena, por ser siempre mi amiga, mi maestra, mi confidente y mi pilar, por haberme enseñado que las metas se logran con esfuerzo y dedicación y por haberme apoyado incondicionalmente en todas y cada una de las etapas de mi vida. Te quiero agradecer especialmente por que me enseñaste a trabajar y a ganarme las oportunidades día con día, a ser sabio y a tomar decisiones, pero sobre todo por haberme dado el mejor de los regalos: mi formación profesional.

Madre, este trabajo y todo lo que soy son para ti.

A mi padre, Valentín, por haber formado en mí una persona de bien y por impulsarme a ser mejor a pesar de las adversidades. Te agradezco enormemente por tus valiosas lecciones y por ocuparte siempre en darme lo mejor.

A mi hermano, Adrián, por haber sido mi amigo de toda la vida y por haber compartido tantos buenos ratos desde nuestra niñez. Muchas gracias porque se muy bien que sin ti no hubiera sido posible la conclusión de este proceso.

A mi hermano, Jonathan, por haber estado conmigo desde que recuerdo y por haber compartido conmigo tantas y tan buenas vivencias. Te agradezco particularmente por que tu más que nadie creíste en mí desde el principio de este proyecto y me diste ánimos siempre que nada parecía tener solución. Muchas gracias por todo.

A mi hermana, Jaqueline, por los incontables ratos de risa y diversión y por ser siempre una persona tan ocurrente y divertida. Te quiero mucho y sabes que siempre puedes contar conmigo para lo que necesites.

A mis abuelos, tíos y primos, por el afecto recibido y el calor familiar.

A mi asesora, la Doctora Elizabeth Piñón Segundo, por ser una excelente profesionista y un modelo a seguir, pero sobretodo por aceptarme en su equipo de trabajo y apoyarme desde el inicio hasta las últimas etapas de este proyecto. Le agradezco enormemente por sus consejos y enseñanzas y por darme la inigualable oportunidad de defender este trabajo frente a profesionales de nuestro gremio. Sin lugar a dudas, me obsequió incontables enseñanzas y vivencias que difícilmente podré olvidar.

A mi coasesor, el Doctor David Quintanar Guerrero, por brindarme siempre su apoyo y acceso a las instalaciones del Laboratorio de Posgrado e Investigación en Tecnología Farmacéutica, hecho sin el cual definitivamente no hubiera sido posible culminar este trabajo.

A mis hermanos de la tercera generación de la Licenciatura en Farmacia: Moni, Miriam, Kari, Mafer, Andrés, Efrén, Carlos, Tania, Javi y Juan, por la vida que compartimos esos cuatro años y por toda la locura, diversión y aprendizajes que vivimos juntos. Por todo eso y lo que nos falta vivir, los quiero mucho.

Juan y Javi, estoy en deuda especial con ustedes.



A mis compañeros del Laboratorio de Sistemas Farmacéuticos de Liberación Modificada, Fabi, Ale, Tania, Juan y Javi (si, otra vez), por haber compartido conmigo esta etapa y por estar siempre ahí para apoyarme incluso cuando las cosas parecían hacerse más y más difíciles; muchas gracias por haberme ayudado a hacer mas llevadera la carga. Nunca voy a olvidar lo que vivimos juntos. Cinthia, gracias por brindarme tu amistad y vivir tantas locuras conmigo. Te quiero mucho.

Al Técnico Académico Rodolfo Robles, por su paciencia y apoyo en la obtención de las imágenes por Microscopía Electrónica de Barrido.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, pero especialmente a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, gracias a todos mis profesores y compañeros, por brindarme las bases de mi vida profesional y por sembrar en mí el amor por mi carrera. Les estoy endeudado de por vida.

Muchas gracias también a mis sinodales, por su paciencia en la revisión de este trabajo y por mejorarlo con sus observaciones.

ANGEL

I am your shadow

I am your rain

I am your longing

A little of your pain

I am red

I am blue

I am your angel

I am in you

Angel

I am your madness

I am your tears

I am your sadness

And I am your fears

I am restless

I am your dreams

I am the moments

In between

Angel



ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras	VI
Índice de tablas	VIII
Índice de gráficos	XI
Abreviaturas	XIII
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
III. OBJETIVOS	4
1. Objetivo general	4
2. Objetivos particulares	4
IV. HIPÓTESIS	4
V. MARCO TEÓRICO	5
1. Periodonto	5
1.1 Definición	5
1.2 Anatomía macroscópica del periodonto	5
1.2.1 Encía	5
1.2.2 Cemento	6
1.2.3 Hueso alveolar	7
1.2.4 Ligamento periodontal	8
1.3 Anatomía microscópica del periodonto	8
1.3.1 Mucosa oral	9
1.4 Flora oral normal	10
2. Enfermedades periodontales	10
2.1 Definición	10
2.2 Etiología	10
2.2.1 Tabaquismo	11
2.2.2 Factores genéticos	11
2.2.3 Enfermedades sistémicas	11
2.2.4 Factores psicosociales	11
2.2.5 Uso de fármacos	11
2.3 Clasificación de las enfermedades periodontales	12
2.3.1 Gingivitis	12
2.3.2 Periodontitis	13
2.4 Etiopatogenia de la enfermedad	14
2.4.1 Proceso inflamatorio y destrucción del tejido periodontal	15
2.5 Epidemiología de las enfermedades periodontales	16
3. Tratamiento de enfermedades periodontales	19
3.1 Procedimientos quirúrgicos	19
3.2 Procedimientos no quirúrgicos	19
3.3 Terapia antimicrobiana	20
3.3.1 Antibióticos	20
3.3.2 Antisépticos	21
3.3.2.1 Propiedades de los antisépticos bucales	21
3.3.2.2 Principales antisépticos utilizados en terapia periodontal	21
3.3.2.3 Clasificación de los antisépticos bucales	22
3.3.2.4 Clorhexidina	22
3.3.2.4.1 Propiedades fisicoquímicas	23
3.3.2.4.2 Mecanismo de acción	24
3.3.2.4.3 Actividad antimicrobiana	24
3.3.2.4.4 Reacciones adversas	25
3.3.3 Formas farmacéuticas empleadas en la terapia antimicrobiana	26
3.3.3.1 Formas farmacéuticas convencionales	26
3.3.3.2 Formas farmacéuticas de administración local	28



3.3.3.2.1 Nanotecnología aplicada al tratamiento de enfermedades periodontales	29
4. Nanopartículas poliméricas	31
4.1 Definición	31
4.2 Clasificación	31
4.3 Formulación de nanopartículas poliméricas	32
4.3.1 Polímeros	32
4.3.1.1 Polímeros biodegradables naturales	32
4.3.1.1.1 Quitosán	32
4.3.1.1.2 Alginatos	32
4.3.1.1.3 Pululano	33
4.3.1.2 Polímeros biodegradables sintéticos	33
4.3.1.2.1 Ácido poli-láctico (PLA)	33
4.3.1.2.2 Ácido poli-(láctico-co-glicólico) (PLGA)	34
4.3.1.2.3 Poli-(ϵ -caprolactona) (PCL)	35
4.4 Métodos de preparación de nanopartículas poliméricas	35
4.4.1 Emulsificación-evaporación	36
4.4.2 Doble emulsificación	37
4.4.3 Desplazamiento de solvente	37
4.4.4 Inmiscibilidad por soluciones salinas o “salting-out”	38
4.4.5 Emulsificación-difusión	39
4.4.6 Diálisis	39
4.4.7 Gelificación iónica	40
4.4.8 Tecnología de fluidos supercríticos	40
4.4.9 Secado por aspersion	40
4.5 Caracterización de nanopartículas poliméricas	41
4.5.1 Tamaño de partícula y morfología	41
4.5.2 Potencial zeta	41
4.5.3 Eficiencia de encapsulamiento	42
4.5.4 Porcentaje de estabilizante residual	42
4.5.5 Caracterización morfológica	42
4.5.6 Liberación <i>in vitro</i>	42
5. Laminillas orodispersables	43
5.1 Definición	43
5.2 Clasificación	43
5.3 Formulación	44
5.3.1 Principio activo	45
5.3.2 Filmógenos	46
5.3.3 Plastificantes	46
5.3.4 Surfactantes	46
5.3.5 Endulzantes	46
5.3.6 Agentes estimulantes de saliva	46
5.3.7 Saborizantes	46
5.3.8 Colorantes	47
5.3.9 Agentes mucoadhesivos	47
5.4 Métodos de preparación de laminillas orodispersables	47
5.4.1 Moldeo con disolvente	47
5.4.2 Moldeo con mezcla semisólida	48
5.4.3 Extrusión en caliente	48
5.4.4 Extrusión de dispersión sólida	49
5.4.5 Secado por aspersion	49
5.4.6 Moldeo con rodillos o “Rolling”	49
5.5 Caracterización de laminillas orodispersables	50
5.5.1 Propiedades organolépticas	50



	5.5.2 Propiedades mecánicas	50
	5.5.3 Contenido químico y uniformidad de contenido	52
	5.5.4 Caracterización morfológica	52
	5.5.5 Tiempo de desintegración	52
	5.5.6 Disolución <i>in vitro</i>	52
	5.5.7 pH	52
VI.	PARTE EXPERIMENTAL	53
	1. Materiales y equipos	53
	1.1 Materias primas	53
	1.2 Reactivos en general	53
	1.3 Material de cristalería en general	54
	1.4 Lista de equipos	54
	2. Procedimientos experimentales	55
	2.1 Sistemas analíticos	55
	2.1.1 Preparación de saliva simulada	55
	2.1.2 Espectros de absorción de gluconato de clorhexidina en agua desionizada y en saliva simulada	55
	2.1.3 Estudio de estabilidad del fármaco en presencia de luz	55
	2.1.4 Curva de calibración de gluconato de clorhexidina en saliva simulada	56
	2.1.5 Curva de calibración de alcohol polivinílico en agua desionizada	56
	2.1.6 Validación del sistema analítico para gluconato de clorhexidina	56
	2.1.6.1 Especificidad	56
	2.1.6.2 Linealidad	56
	2.1.6.3 Límites de detección y cuantificación	57
	2.1.6.4 Precisión	57
	2.1.6.5 Repetibilidad	57
	2.1.6.6 Exactitud	57
	2.1.7 Evaluación del sistema analítico colorímetro para cuantificar alcohol polivinílico	57
	2.1.7.1 Linealidad	57
	2.1.7.2 Límites de detección y cuantificación	57
	2.2 Desarrollo de laminillas orodispersables	58
	2.2.1 Preformulación y desarrollo del proceso	58
	2.3 Selección de las variables de proceso para laminillas orodispersables	61
	2.4 Caracterización de laminillas orodispersables	62
	2.4.1 Masa y uniformidad de masa	62
	2.4.2 Contenido químico y uniformidad de contenido	62
	2.4.3 Evaluación de pH laminillas de laminillas orodispersables	62
	2.4.4 Tiempo de desintegración	62
	2.4.5 Evaluación de laminillas orodispersables en colorímetro	63
	2.4.6 Microscopía electrónica de barrido	63
	2.4.7 Calorimetría diferencial de barrido	63
	2.5 Desarrollo de nanopartículas poliméricas	63
	2.5.1 Determinaciones previas	63
	2.5.1.1 Evaluación de la estabilidad para la emulsión de gluconato de clorhexidina en acetato de etilo con poli-(ε-caprolactona)	63
	2.5.1.1 Evaluación del efecto del ultrasonido en la estabilidad del principio activo	63



2.5.3 Preparación de suspensión de nanopartículas placebo y cargadas con gluconato de clorhexidina por los métodos de emulsificación-difusión y de doble emulsificación	64
2.5.4 Obtención de nanopartículas cargadas	65
2.6 Caracterización de nanopartículas poliméricas	65
2.6.1 Determinación de tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta	65
2.6.2 Cuantificación de alcohol polivinílico en nanopartículas poliméricas	66
2.6.3 Cuantificación de gluconato de clorhexidina en nanopartículas	66
2.7 Preparación de laminillas con nanopartículas	66
2.8 Perfiles de liberación <i>in vitro</i> del fármaco en solución, desde nanopartículas y desde laminillas con nanopartículas	67
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	68
1. Sistema analítico para gluconato de clorhexidina y sistema analítico para alcohol polivinílico	68
1.1 Prueba de estabilidad del principio activo expuesto a la luz	70
2. Desarrollo de laminillas orodispersables	72
2.1 Preformulación	72
2.2 Caracterización de laminillas orodispersables y selección de las condiciones de proceso	81
2.2.1 Contenido químico y uniformidad de contenido	81
2.2.2 Masa y uniformidad de masa	85
2.2.3 pH	87
2.2.4 Tiempo de desintegración	89
2.2.5 Análisis de laminillas orodispersables por colorimetría y microscopía electrónica de barrido	93
2.2.6 Análisis de laminillas orodispersables por calorimetría diferencial de barrido	97
3. Desarrollo de nanopartículas poliméricas	98
3.1 Determinaciones previas	98
3.1.1 Evaluación de la estabilidad para la emulsión de gluconato de clorhexidina en acetato de etilo con poli-(ε-caprolactona)	98
3.1.2 Evaluación de la estabilidad del gluconato de clorhexidina bajo aplicación de ultrasonido	102
3.2 Preparación de nanopartículas poliméricas	102
3.3 Caracterización de nanopartículas poliméricas	115
3.3.1 Porcentaje de estabilizante residual, eficiencia de encapsulamiento y eficiencia del proceso	115
3.3.2 Análisis de NPP por calorimetría diferencial de barrido	119
3.3.3 Liberación <i>in vitro</i> de gluconato de clorhexidina desde NPP	122
4. Incorporación de nanopartículas poliméricas en laminillas orodispersables	128
4.1 Determinación de tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta	128
4.2 Análisis de laminillas con nanopartículas por colorímetro	130
4.3 Liberación <i>in vitro</i> de gluconato de clorhexidina desde laminillas con nanopartículas	131
5. Comparación de las características de la forma farmacéutica obtenida con otras utilizadas en el tratamiento de enfermedades periodontales	137
VIII. CONCLUSIONES	141
IX. PERSPECTIVAS	142



X.	REFERENCIAS	143
XI.	ANEXOS	151
	Anexo A. Sistema analítico para cuantificar gluconato de clorhexidina y sistema analítico para cuantificar alcohol polivinílico	151
	Anexo B. Determinación de las condiciones de proceso para laminillas orodispersables	160
	Anexo C. Datos de la liberación <i>in vitro</i> de gluconato de clorhexidina desde diferentes sistemas	166



Índice de figuras

Figura 1. Estructura del periodonto	5
Figura 2. Partes de la encía	6
Figura 3. Estructuras del cemento periodontal y su localización	7
Figura 4. Hueso alveolar	7
Figura 5. Localización y orientación del ligamento periodontal	8
Figura 6. Tejidos presentes en el periodonto	9
Figura 7. Representación esquemática de las etapas de la enfermedad periodontal	13
Figura 8. Bolsas periodontales	13
Figura 9. Composición y estructura del <i>biofilm</i>	14
Figura 10. Proceso inflamatorio y destrucción del tejido periodontal	16
Figura 11. Raspado y alisado radicular	20
Figura 12. Estructura química de la clorhexidina	23
Figura 13. Estructuras químicas de las presentaciones de clorhexidina	23
Figura 14. Mecanismo de acción de la clorhexidina	24
Figura 15. Dispositivos aprobados por la FDA para el tratamiento de enfermedades periodontales	29
Figura 16. Esquema que representa la penetración de las nanopartículas poliméricas en el epitelio de unión de la encía	30
Figura 17. Aplicación de nanopartículas de PLGA-TCS en mandíbula de perro	30
Figura 18. Representación y microfotografías de: A) Nanocápsulas y B) Nanoesferas	31
Figura 19. Estructura química del quitosán	32
Figura 20. Estructura del ácido algínico y gelificación en presencia de iones calcio	33
Figura 21. Estructura química del pululano	33
Figura 22. Estructura química del PLA	34
Figura 23. Estructura química del PLGA	34
Figura 24. Hidrólisis del PLGA	34
Figura 25. Degradación de la PCL	35
Figura 26. Preparación de nanopartículas poliméricas por el método de emulsificación-evaporación	37
Figura 27. Preparación de nanopartículas poliméricas por el método de desplazamiento de solvente	38
Figura 28. Preparación de nanopartículas poliméricas por el método de “Salting-out”	39
Figura 29. Representación del potencial zeta de un coloide con carga superficial negativa	41
Figura 30. Métodos de preparación de OFDs	47
Figura 31. Proceso general para método de moldeo con disolvente	48
Figura 32. Proceso general para el método de moldeo con mezcla semisólida	48
Figura 33. Proceso general para el método de extrusión en caliente	49
Figura 34. Proceso general para el método de extrusión en dispersión sólida	49
Figura 35. Proceso general para el método de secado por aspersion	49
Figura 36. Proceso general para el método de moldeo con rodillos o “Rolling”	50
Figura 37. Moldeo del gel para laminillas	61
Figura 38. Adaptación de la canastilla de desintegración USP.	62
Figura 39. Dispersión de HPMC al 8% en glicerol-agua caliente.	72
Figura 40. Dispersión de HPMC al 10% en glicerol-agua caliente	73
Figura 41. Dispersión de HPMC al 12% en glicerol-agua caliente	73
Figura 42. Dispersión de HPMC en glicerol-agua fría, servido en Parafilm®	73
Figura 43. Dispersión de HPMC al 8% en glicerol-agua fría, servido en portaobjetos de 2.5 cm x 7.5 cm.	74
Figura 44. Dispersión de HPMC al 3% y Carbopol 9174 PNF al 0.5% en glicerol-propilenglicol-agua fría, servido en portaobjetos de 2.5 cm x 7.5 cm	74
Figura 45. Dispersión de Eudragit® RLPO C al 0.5 % y HPMC al 2% en etanol-trietanolamina-agua fría, servido en portaobjetos de 2.5 cm x 7.5 cm	74



Figura 46. Dispersión de Eudragit L 100 C al 0.5 % y HPMC al 2 % en etanol-trietanolamina-agua fría	75
Figura 47. Dispersión de Eudragit RLPO al 0.5 % y HPMC al 2% en etanol-trietanolamina-agua fría	75
Figura 48. Dispersión de HPMC al 3 % en glicerina-agua fría	75
Figura 49. Laminillas de HPMC al 3 % servidas en portaobjetos	75
Figura 50. Estructura del gel de carbómero antes y después de neutralizar	78
Figura 51. Resumen de compatibilidad del fármaco con diferentes filmógenos	79
Figura 52. Apariencia de las laminillas orodispersables del lote 1	94
Figura 53. Espacio CIE*a*b*	94
Figura 54. Microfotografías de laminillas orodispersables del lote 1 (Barra=1 μm)	96
Figura 55. Calorimetría diferencial de barrido para laminilla orodispersable	97
Figura 56. Fenómeno de cavitación	100
Figura 57. Mecanismos de estabilización de PVAL	107
Figura 58. Calorimetría diferencial de barrido para evaluar las NPP	120
Figura 59. Laminillas orodispersables con nanopartículas	130
Figura 60. Representación del nivel de disociación de las cadenas de polímero en una matriz hidrofílica	135
Figura 61. Ajuste de la liberación <i>in vitro</i> de gluconato de clorhexidina desde NPP a los modelos de: A) Orden 0, B) Orden 1, C) Higuchi, D) Hixson-Crowell, E) Korsmeyer-Peppas y F) Weibull.	172
Figura 62. Ajuste de la liberación <i>in vitro</i> de gluconato de clorhexidina desde laminillas con NPP a los modelos de: A) Orden 0, B) Orden 1, C) Higuchi, D) Hixson-Crowell, E) Korsmeyer-Peppas y F) Weibull.	173
Figura 63. Ajuste de la liberación <i>in vitro</i> de gluconato de clorhexidina desde laminillas con NPP a partir de los 25 minutos a los modelos de: A) Orden 0, B) Orden 1, C) Higuchi, D) Hixson-Crowell, E) Korsmeyer-Peppas y F) Weibull.	175



Índice de tablas

Tabla 1. Grados del Índice Comunitario Periodontal (ICP)	17
Tabla 2. Clasificación de los antisépticos bucales utilizados en terapia periodontal	22
Tabla 3. Comparación de la concentración mínima inhibitoria de tres antisépticos para diferentes microorganismos de acuerdo a Kobuger et al (2010)	25
Tabla 4. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y concentraciones mínimas bactericidas (CMB) para gluconato de clorhexidina	25
Tabla 5. Comparación de formas farmacéuticas tradicionales utilizadas en periodontal.	26
Tabla 6. Comparación entre terapia antimicrobiana sistémica y local	28
Tabla 7. Principales dispositivos de liberación local utilizados en terapia local para enfermedades periodontales	28
Tabla 8. Tipos de laminillas orodispersables y sus características	43
Tabla 9. Composición promedio de una laminilla dispersable	44
Tabla 10. Principios activos que han sido incorporados en laminillas dispersables	45
Tabla 11. Composición de la saliva simulada (Duffo, 2004)	55
Tabla 12. Desarrollo de laminillas orodispersables	58
Tabla 13. Formulación para optimización de laminillas dispersables	61
Tabla 14. Lotes preparados para la optimización de laminillas dispersables	61
Tabla 15. Preparación de soluciones de gluconato de clorhexidina y evaluación del efecto del ultrasonido en la estabilidad del fármaco	64
Tabla 16. Preparación de suspensión de nanopartículas	65
Tabla 17. Obtención de nanopartículas cargadas	65
Tabla 18. Coeficientes de absortividad de gluconato de clorhexidina en agua desionizada y en saliva simulada pH=6.89 a 231 y 254 nm	68
Tabla 19. Coeficientes de absortividad de gluconato de clorhexidina en agua desionizada y saliva simulada a 263 nm	70
Tabla 20. Concentración de gluconato de clorhexidina a diferentes tiempos expuesto a la luz	71
Tabla 21. Desarrollo de formulación y proceso para laminillas dispersables	72
Tabla 22. Cuantificación de gluconato de clorhexidina en laminillas preparadas con Pharmacoat® 615 y Carbopol 974 PNF	77
Tabla 23. Evaluación de laminillas dispersables del lote VIII	80
Tabla 24. Evaluación de cinco puntos de una laminilla del lote VIII	80
Tabla 25. Contenido químico de laminillas dispersables	81
Tabla 26. Uniformidad de contenido para laminillas dispersables	83
Tabla 27. Uniformidad de masa para laminillas dispersables	85
Tabla 28. Valores de pH para laminillas orodispersables	88
Tabla 29. Tiempo de desintegración de laminillas dispersables	89
Tabla 30. Análisis de varianza de dos factores (proporción de filmógeno y modo de secado) con varias muestras por grupo para tiempo de desintegración de laminillas	90
Tabla 31. Prueba de Tukey para el tiempo de desintegración de laminillas	91
Tabla 32. Prueba t de student para tiempo de desintegración de laminillas	92
Tabla 33. Evaluación de laminillas dispersables en colorímetro	95
Tabla 34. Caracterización de la primera emulsión del proceso de obtención de nanopartículas poliméricas	99
Tabla 35. Inspección visual de la primera emulsión del proceso de obtención de nanopartículas poliméricas a condiciones límite	101
Tabla 36. Evaluación del efecto de ultrasonido en la estabilidad del fármaco	102



Tabla 37. Tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta para lotes 1, 2 y 3	103
Tabla 38. Tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta para nanopartículas poliméricas eliminando la adición de agua (Lote 4)	108
Tabla 39. Prueba de t de student para tamaño de partícula de NPP obtenidas con y sin adición de agua	109
Tabla 40. Tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta para nanopartículas poliméricas del lote 4 después de liofilizar.	110
Tabla 41. Tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta de nanopartículas del lote 5 antes y después de liofilizar	112
Tabla 42. Prueba de t de student para tamaño de partícula antes y después de liofilizar	114
Tabla 43. Porcentaje de estabilizante residual, porcentaje de fármaco cargado, eficiencia de encapsulamiento y eficiencia del proceso	116
Tabla 44. Métodos de obtención de clorhexidina base a partir de sus sales reportados por Sánchez et al (2013)	118
Tabla 45. Prueba de t de student para fracción porcentual de fármaco liberado (Mt/M_∞*100) para solución y NPP a los 40 minutos	123
Tabla 46. Mecanismos de transporte desde sistemas matriciales de acuerdo al modelo Korsmeyer-Peppas	125
Tabla 47. Tipo de liberación de acuerdo al mecanismo de transporte de acuerdo al modelo Korsmeyer-Peppas	127
Tabla 48. Tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta de NPP en laminillas dispersables	128
Tabla 49. Evaluación de laminillas con NPP en colorímetro	130
Tabla 50. Análisis de varianza para el porcentaje de fármaco liberado a los 40 minutos para solución, nanopartículas y laminillas con nanopartículas	133
Tabla 51. Prueba de Tukey para cantidad de fármaco liberado desde solución, nanopartículas y laminillas con nanopartículas	134
Tabla 52. Ajuste de la liberación <i>in vitro</i> a modelos cinéticos para liberación desde laminillas con nanopartículas	134
Tabla 53. Ajuste a modelos cinéticos eliminando a partir de los 25 minutos	136
Tabla 54. Aproximación de la concentración de gluconato de clorhexidina sobre el volumen de fluído gingival crevicular supuesto obtenida desde la forma farmacéutica preparada	138
Tabla 55. Coeficientes de absortividad de gluconato de clorhexidina en agua desionizada y en saliva simulada pH=6.89 a 231 y 254 nm	151
Tabla 56. Coeficientes de absortividad de gluconato de clorhexidina en agua desionizada y saliva simulada a 263 nm.	152
Tabla 57. Curva de calibración de gluconato de clorhexidina en saliva simulada pH=6.89 (λ=263 nm)	153
Tabla 58. Parámetros de la regresión de gluconato de clorhexidina	154
Tabla 59. Análisis de varianza de un factor para evaluar la linealidad del sistema de gluconato de clorhexidina	154
Tabla 60. Prueba del intercepto para curva de calibración de gluconato de clorhexidina	154
Tabla 61. Tres niveles de concentración por triplicado (λ=263 nm) para gluconato de clorhexidina	155
Tabla 62. Parámetros de la regresión	155
Tabla 63. Límite de cuantificación y detección para gluconato de clorhexidina	156
Tabla 64. Precisión del sistema para gluconato de clorhexidina	156
Tabla 65. Repetibilidad del sistema para gluconato de clorhexidina	156
Tabla 66. Exactitud del sistema analítico para gluconato de clorhexidina	156



Tabla 67. Curva de calibración de alcohol polivinílico en agua desionizada ($\lambda=640$ nm).	157
Tabla 68. Parámetros de la curva de calibración para alcohol polivinílico	158
Tabla 69. Análisis de varianza para curva de calibración de alcohol polivinílico	159
Tabla 70. Prueba del intercepto para curva de calibración de alcohol polivinílico	159
Tabla 71. Límites de detección y cuantificación para alcohol polivinílico	160
Tabla 72. Evaluación del lote 1-3 % p/v-Secado en estufa	160
Tabla 73. Evaluación del lote 2-4 % p/v-Secado en estufa	161
Tabla 74. Evaluación del lote 3-5 % p/v-Secado en estufa	161
Tabla 75. Evaluación del lote 4-3 % p/v-Secado en desecador	162
Tabla 76. Evaluación del lote 5-4 % p/v-Secado en desecador	162
Tabla 77. Evaluación del lote 6-5 % p/V-Secado en desecador	163
Tabla 78. Prueba de t de student para tiempo de desintegración de Lote 1 (3 % p/v-Estufa) y lote 4 (3 % p/v-Desecador).	163
Tabla 79. Prueba de t de student para tiempo de desintegración de Lote 2 (4 % p/v-Estufa) y lote 5 (4 % p/v-Desecador)	164
Tabla 80. Prueba de t de student para tiempo de desintegración de lote 2 (5 % p/v-Estufa) y lote 6 (5 % p/v-Desecador).	165
Tabla 81. Liberación <i>in vitro</i> desde nanopartículas, 1	166
Tabla 82. Liberación <i>in vitro</i> desde nanopartículas, 2	167
Tabla 83. Liberación <i>in vitro</i> desde nanopartículas, 3	168
Tabla 84. Liberación <i>in vitro</i> desde laminilla con nanopartículas, 1	169
Tabla 85. Liberación <i>in vitro</i> desde laminilla con nanopartículas, 2	170
Tabla 86. Liberación <i>in vitro</i> desde laminilla con nanopartículas, 3	171



Índice de gráficos

Gráfico 1. Índice Comunitario Periodontal (ICP) máximo en población de 35 a 44 años por región de acuerdo a la OMS	17
Gráfico 2. Distribución del índice Periodóntico Comunitario (IPC) en niños y adolescentes por grupo de edad	18
Gráfico 3. Porcentaje del índice Periodóntico Comunitario por grupo de edad en usuarios de los Servicios de Salud	19
Gráfico 4. Espectro de absorción de gluconato de clorhexidina en agua desionizada y saliva simulada	68
Gráfico 5. Comparación de los espectros de absorción de gluconato de clorhexidina, saliva simulada y cada componente de la saliva simulada	69
Gráfico 6. Espectro de absorción de gluconato de clorhexidina en agua desionizada pH=6.85 (20 µg/mL) de 0 a 25 horas expuesto a la luz	71
Gráfico 7. Dosis de gluconato de clorhexidina en laminillas orodispersables (mg fármaco/cm ²)	82
Gráfico 8. Cantidad de gluconato de clorhexidina por laminilla dispersable	82
Gráfico 9. Contenido químico de laminillas orodispersables	83
Gráfico 10. Uniformidad de contenido para laminillas orodispersables	84
Gráfico 11. Masa de laminillas orodispersables	86
Gráfico 12. Uniformidad de masa para laminillas orodispersables	87
Gráfico 13. pH de laminillas orodispersables	88
Gráfico 14. Tiempo de desintegración de laminillas	90
Gráfico 15. Parámetros del CIE para laminillas orodispersables	95
Gráfico 16. Distribución de tamaño de partícula NPP lote 1	104
Gráfico 17. Distribución de potencial zeta de NPP lote 1	104
Gráfico 18. Distribución de tamaño de partícula de NPP lote 2	104
Gráfico 19. Distribución de potencial zeta de NPP lote 2	105
Gráfico 20. Distribución de tamaño de partícula de NPP lote 3	105
Gráfico 21. Distribución de potencial zeta de NPP lote 3	105
Gráfico 22. Identificación de gluconato de clorhexidina en el solvente extraído del proceso de preparación de las nanopartículas-Lote 3	107
Gráfico 23. Distribución de tamaño de partícula de NPP lote 4	108
Gráfico 24. Distribución de potencial zeta de NPP lote 4	109
Gráfico 25. Distribución de tamaño de partícula de NPP lote 4 después de liofilizar	111
Gráfico 26. Distribución de potencial zeta de NPP lote 4 después de liofilizar	111
Gráfico 27. Distribución de tamaño de partícula de NPP del lote 5 antes de liofilizar	113
Gráfico 28. Distribución de potencial zeta de NPP del lote 5 antes de liofilizar	113
Gráfico 29. Distribución de tamaño de partícula de NPP del lote 5 antes de liofilizar	113
Gráfico 30. Distribución de potencial zeta de NPP del lote 5 antes de liofilizar	114
Gráfico 31. Liberación <i>in vitro</i> de gluconato de clorhexidina en saliva simulada desde NPP	122
Gráfico 32. Liberación <i>in vitro</i> de gluconato de clorhexidina en saliva simulada desde NPP y desde solución	123
Gráfico 33. Distribución de tamaño de partícula para NPP en gel	129
Gráfico 34. Distribución de potencial zeta de NP en gel	129
Gráfico 35. Parámetros del CIE para laminillas orodispersables	131
Gráfico 36. Liberación <i>in vitro</i> de gluconato de clorhexidina desde laminillas con NPP	132
Gráfico 37. Liberación <i>in vitro</i> de gluconato de clorhexidina desde solución, nanopartículas y laminillas con nanopartículas	133



Gráfico 38. Concentración aproximada de gluconato de clorhexidina sobre el volumen de fluido gingival crevicular supuesto obtenida desde la forma farmacéutica preparada	139
Gráfico 39. Espectro de absorción de gluconato de clorhexidina en agua desionizada y en saliva simulada pH=6.89 (20 µg/mL)	151
Gráfico 40. Comparación de los espectros de absorción de gluconato de clorhexidina, saliva simulada y cada componente de la saliva simulada	151
Gráfico 41. Comparación del espectro de absorción de gluconato de clorhexidina con excipientes y saliva simulada	152
Gráfico 42. Curva de calibración de gluconato de clorhexidina en saliva simulada pH=6.89	153
Gráfico 43. Espectro de absorción de alcohol polivinílico en agua desionizada	157
Gráfico 44. Curva de calibración de alcohol polivinílico en agua desionizada	158



Abreviaturas

AAC	Cemento acelular no fibroso
AEC	Cemento extrínseco fibroso
ANADEVA	Análisis de varianza
AV	Valor de aceptación
CCP	Cloruro de cetilpiridinio
CDB	Calorimetría diferencial de barrido
CHX	Clorhexidina
CIC	Cemento intrínseco fibroso no celular
CIE	Commission Internationale de l'Éclairage
CMB	Concentración mínima bactericida
CMC	Cemento mixto fibroso celular
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CV	Coefficiente de variación
DESVEST	Desviación estándar
EA	Encía adherida
EL	Encía libre o marginal
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulosa
ICP	Índice Comunitario Periotonal
IL	Intterleucina
MEB	Microscopía Electrónica de Barrido
NPP	Nanopartículas poliméricas
OFDs	Orally Fast Dissolving forms
P. eb.	Punto de ebullición
P.f.	Punto de fusión
PCL	Poli-(ε -caprolactona)
IPD	Índice de polidispersión
LPD	Ligamento Periodontal
PHB	Poli-hidroxibutirato
PLA	Ácido poli-(láctico)
PLGA	Ácido poli-(láctico-co-glicólico)
PVAL	Alcohol polivinílico
Tg°	Temperatura de transición vítrea
TLRs	Receptores celulares tipo Toll
%DER	Desviación estándar relativa
r ²	Coefficiente de determinación



FEUM Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
USP United States Pharmacopeia



I. RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue desarrollar una forma farmacéutica que pudiera ser aplicada para resolver las dificultades propias de la terapia periodontal, proponiendo como principio activo al gluconato de clorhexidina, el cual es reconocido ampliamente como el de mayor efectividad en el tratamiento de enfermedades periodontales.

En la primera etapa, se desarrolló un sistema analítico por espectrofotometría UV-VIS para cuantificar al fármaco en saliva simulada, evaluando su especificidad, linealidad, límites de detección y cuantificación, exactitud, precisión y repetibilidad. Además, se evaluó también el efecto de la exposición a la luz en la estabilidad del principio activo en medio acuoso, encontrando que este factor presenta un efecto significativo por lo que se determinó que era necesario proteger las muestras analíticas y realizar las determinaciones antes de dos horas. Así mismo, se utilizó un sistema analítico colorimétrico para cuantificar alcohol polivinilo residual, encontrando que era específico, lineal y se calculó su límite de detección y límite de cuantificación.

Posteriormente, se desarrollaron laminillas orodispersables por el método de moldeo con disolvente realizando en primer lugar pruebas de preformulación con Eudragit®RS 100, Eudragit® RLPO, Eudragit® E100, Carboximetilcelulosa sódica, Pharmacoat® 615 y Carbopol 974 NF, encontrando que Pharmacoat® no presentaba incompatibilidades con el principio activo. Con este polímero, se evaluaron tres concentraciones para el gel de moldeo: 3% p/v, 4% p/v y 5% p/v, así como secado en estufa y en desecador. Se encontraron las mejores condiciones con 3% p/v y secado en estufa para contenido químico y uniformidad de contenido (% gluconato de clorhexidina: 97.75 ± 5.037 ; %DER=5.153, AV=12.84), masa y uniformidad de masa (masa= 84.86 ± 6.749 ; %DER=8.187, AV=19.650), pH=7.24±0.04, tiempo de desintegración (30.33 ± 3.55), colorimetría (*L=12.186, *a=-0.036, *b=-0.035), microscopía electrónica de barrido, donde se observó una superficie homogénea y libre de cristales y calorimetría diferencial de barrido, en donde no se observó el pico de fusión del principio activo en la laminilla, lo que indica una dispersión molecular en la matriz de polímero.

Para la siguiente etapa, se desarrollaron nanopartículas poliméricas por los métodos de doble emulsificación (W/O/W) y doble emulsificación-difusión (W/O/W), empleando ultrasonido para la emulsión primaria y dispersor de alto rendimiento para la emulsión secundaria. Se encontró que la emulsificación a 150 W de potencia, amplitud de 80 % y 7 minutos de sonicación permitían obtener un sistema estable por 15 minutos. Se empleó poli-(ε-caprolactona) al 1% p/v en la fase orgánica como polímero formador de partículas y alcohol polivinílico al 0.5% p/v como estabilizante de la emulsión secundaria, reportando que ambos métodos permitían obtener partículas menores a 500 nm, por lo que se decidió emplear eliminar la fase de difusión para el proceso. Para el proceso de liofilización se encontró que era necesario agregar manitol al 10 % p/v como agente crioprotector para evitar la agregación de las partículas.

Para la caracterización de las nanopartículas se obtuvo una proporción de estabilizante residual del 3.25 %, eficiencia de encapsulamiento de 10.989 %, eficiencia del proceso de 72.826 % y se demostró por calorimetría diferencial de barrido que el fármaco se encontraba disperso y/o disuelto a nivel molecular en la matriz polimérica. Por estudios de liberación *in vitro* se demostró una prolongación del tiempo de liberación del fármaco de hasta 3 horas, ajustándose a los modelos de Higuchi, Korsmeyer-Peppas y Weibull para sistemas matriciales.

En la última etapa del trabajo se incorporaron las nanopartículas poliméricas en las laminillas orodispersables. Se encontró que las partículas no aumentaban su tamaño en más de 600 nm una vez que se disolvían desde las laminillas. Se encontró un efecto Tyndall evaluado por



colorimetría. Finalmente, se demostró una prolongación del tiempo de liberación de hasta 7 horas, demostrando un efecto *burst* antes de los 25 minutos y ajustándose a los modelos de Higuchi, Korsmeyer-Peppas y Weibull.

Se demostró que la cantidad de fármaco liberada permitía obtener concentraciones de $365 \pm 194.719 \mu\text{g/mL}$ a $11846 \pm 565.56 \mu\text{g/mL}$ suponiendo que la liberación se da en las bolsas periodontales de 5 piezas dentales con signos de gingivitis y periodontitis.



II. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades periodontales constituyen uno de los padecimientos bucales más importantes en el grupo de enfermedades crónicas; son altamente prevalentes en todo el mundo y, por lo tanto, representan un problema mayor de salud pública para todos los países. Junto con la caries dental, son la mayor causa en pérdida de piezas dentales, afectando la calidad de vida de la población en términos de capacidad funcional, autoestima y relaciones interpersonales (Petersen y Ogawa, 2012). Para la población adulta, aproximadamente el 59.6 % presenta algún signo de enfermedad periodontal, un poco más de la quinta parte tiene gingivitis (20.3 %), 4.7 % tiene algún signo de enfermedad periodontal leve (bolsas periodontales superficiales) y 1.3 % tiene signos de enfermedad periodontal avanzada (bolsas periodontales profundas) (Mejía, González y Lomelí, 2014).

A pesar de que los tratamientos mecánicos permiten remover los agentes etiológicos que causan las enfermedades periodontales, el uso de estas estrategias mecánicas solas no puede combatir algunos tipos de periodontopatógenos, haciendo difícil obtener o regenerar la salud periodontal (Vicentini, 2013). Por eso, varios estudios han demostrado que el uso de fármaco antimicrobianos junto con el tratamiento mecánico periodontal representa una estrategia terapéutica importante en el tratamiento de enfermedades periodontales (FDA, 2015). Con un sistema de liberación local de estos fármacos, la concentración del activo en el tejido blanco puede ser mejorada (Dodwad, 2012), además de que se evitan las reacciones adversas presentes con su administración sistémica.

Las nanopartículas poliméricas representan sistemas farmacéuticos que tienen la capacidad de suministrar una amplia gama de compuestos para las diferentes vías de administración por periodos de tiempo sostenidos (Llabot, Palma y Allemandi, 2008). Las nanopartículas poliméricas representan una fuerte promesa para la liberación de fármacos debido a que funcionan como un acarreador para liberar los principios activos en un sitio específico. A su vez, son efectivas para administrar fármacos, proteínas e incluso fragmentos de ADN, direccionándolos a células y órganos específicos (Nagavarma et al, 2012). Por si fuera poco, debido a su tamaño, las nanopartículas permiten penetrar en regiones que son inaccesibles para otro tipo de sistemas (Dodwad, 2012).

Las laminillas orodispersables consisten en películas delgadas de aplicación oral que deben ser colocadas en la lengua del paciente o sobre cualquier otra mucosa, la cual cuando se moja con la saliva se desintegra rápidamente y se adhiere al sitio de aplicación (Saraswathi y Sai, 2015). Existen tres tipos de laminillas: laminillas de liberación inmediata, laminillas mucoadhesivas de dispersión por disolución y laminillas mucoadhesivas de liberación sostenida (Bala et al, 2013). Una de las grandes ventajas de esta forma farmacéutica es que no se necesita de agua para la liberación del principio activo, además de que ofrece una aplicación cómoda para el paciente.

La posibilidad de combinar las ventajas de las laminillas bucales con las nanopartículas poliméricas, así como su facilidad para generar una distribución homogénea del fármaco, protegerlo de la degradación del medio biológico y controlar su liberación en una sola forma farmacéutica representa una estrategia interesante para el tratamiento de enfermedades periodontales (Mazzarino, Borsali y Lemos-Senna, 2014).



III. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Preparar nanopartículas poliméricas cargadas con gluconato de clorhexidina elaboradas por el método de doble emulsificación e incluirlas en laminillas orodispersables obtenidas por el método de moldeo con disolvente para que puedan ser utilizadas en el tratamiento de enfermedades periodontales.

2. Objetivos particulares

- 2.1 Desarrollar un sistema analítico por espectrofotometría UV-Visible para cuantificar gluconato de clorhexidina en solución de saliva simulada mediante la evaluación de su especificidad, linealidad, límites de detección y cuantificación, exactitud, precisión y repetibilidad.
- 2.2 Evaluar la linealidad de un sistema analítico colorimétrico para cuantificar alcohol polivinílico residual en las nanopartículas poliméricas.
- 2.3 Desarrollar laminillas orodispersables por el método de moldeo con disolvente mediante pruebas de preformulación y ajuste de las variables preparativas del proceso para determinar las mejores condiciones de preparación de acuerdo a su uniformidad de masa, uniformidad de contenido químico, pH, tiempo de desintegración y transparencia.
- 2.4 Preparar nanopartículas poliméricas con gluconato de clorhexidina por los métodos de emulsificación-difusión y doble emulsificación para determinar el método que permite obtener mejores resultados.
- 2.5 Caracterizar las nanopartículas poliméricas preparadas de acuerdo a su tamaño de partícula, potencial zeta, eficiencia de encapsulamiento, eficiencia del proceso, porcentaje de estabilizante residual y estudios de liberación *in vitro* utilizando la técnica de diálisis.
- 2.6 Incluir las nanopartículas obtenidas en laminillas orodispersables preparadas por el método de moldeo con disolvente y caracterizar la forma farmacéutica elaborada mediante estudios de disolución *in vitro* utilizando la técnica de diálisis.
- 2.7 Determinar con respecto a lo reportado en la literatura si la cantidad liberada desde la forma farmacéutica preparada permite obtener concentraciones efectivas a lo largo del proceso.

IV. HIPÓTESIS

Si las nanopartículas poliméricas cargadas con gluconato de clorhexidina incluidas en laminillas orodispersables facilitan la aplicación del fármaco en las bolsas periodontales, así como la liberación controlada del mismo entonces esta forma farmacéutica puede ser utilizada para mejorar el tratamiento convencional de la gingivitis y periodontitis.

V. MARCO TEÓRICO

1. Periodonto

1.1 Definición

Se conoce como periodonto a aquellos tejidos que rodean o envuelven los dientes y que incluyen a las encías, el cemento (cubierta de la raíz del diente), ligamento periodontal, hueso alveolar (o de soporte) y la mucosa alveolar (Scheild y Rickne, 2012). Estos tejidos se pueden observar detalladamente en la figura 1.

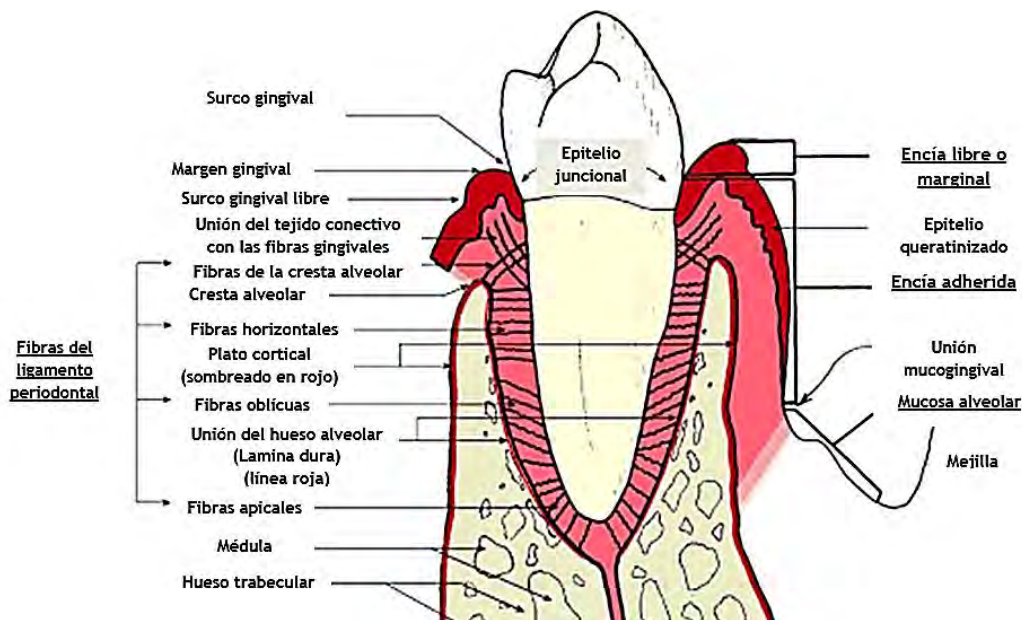


Figura 1. Estructura del periodonto (Modificada de Scheild y Rickne, 2012).

1.2 Anatomía macroscópica del periodonto

El periodonto está compuesto de las encías, el cemento, el ligamento periodontal, la mucosa alveolar y el hueso alveolar. Estos componentes sirven para soportar a los dientes en el hueso alveolar (Palumbo, 2011).

1.2.1 Encía

La encía es la parte de la mucosa masticatoria que cubre el proceso alveolar y rodea la porción cervical del diente. Es el principal componente periférico del periodonto. Comienza en la línea mucogingival, cubre al aspecto coronal del proceso alveolar y termina en la parte cervical de cada diente, lo rodea y forma ahí la unión epitelial a través de un anillo de tejido epitelial especializado. Después, la encía provee de continuidad del revestimiento epitelial (Wolf y Hassell, 2006).

Se pueden diferenciar dos partes de la encía: la encía libre o marginal (EL) y la encía adherida (EA), presentadas en la figura 2. La encía marginal es rosa, tiene una superficie mate y consistencia firme. Comprende el tejido gingival en la parte lingual/palatal de los dientes además de la *encía interdental* o *papila interdental*. En la parte vestibular y lingual del diente, la encía libre se extiende del margen gingival en dirección apical hacia el *surco de la encía libre* que está posicionado a nivel de la *unión cemento-esmalte (UCE)*. La encía asociada está delimitada por la unión mucogingival (UMG).

En dirección coronaria, la encía asociada está delimitada por el surco de la encía libre o, si dicho surco no está presente, por un plano horizontal al nivel de la conjunción cemento-esmalte. En dirección apical, la encía asociada se extiende hacia la conjunción mucogingival donde se convierte en continua con la mucosa de revestimiento. En esta parte se encuentran pequeñas depresiones con una superficie punteada que da la apariencia de piel de naranja. La encía asociada está fuertemente unida a la parte inferior del hueso alveolar y el cemento por fibras de tejido conectivo (Lindhe, Lang y Araújo, 2008). La encía presenta un elemento importante en el estudio de las enfermedades periodontales llamado surco gingival, el cual de acuerdo a Romero et al (2011) se define como un espacio virtual poco profundo formado por la parte interna de la encía marginal y la superficie del diente (esmalte o cemento). Se inicia en el margen de la encía libre y termina apicalmente en el epitelio de unión. De acuerdo a estos mismos autores, su profundidad es de 2.4 ± 0.8 mm en niños y de 2.9 ± 0.44 mm en adultos. Ferro y Gómez (2007) mencionan medidas de 1 a 2 mm en la parte vestibular y de 2.1 mm en la parte interproximal, con un rango de 0.5 a 4.6 mm.

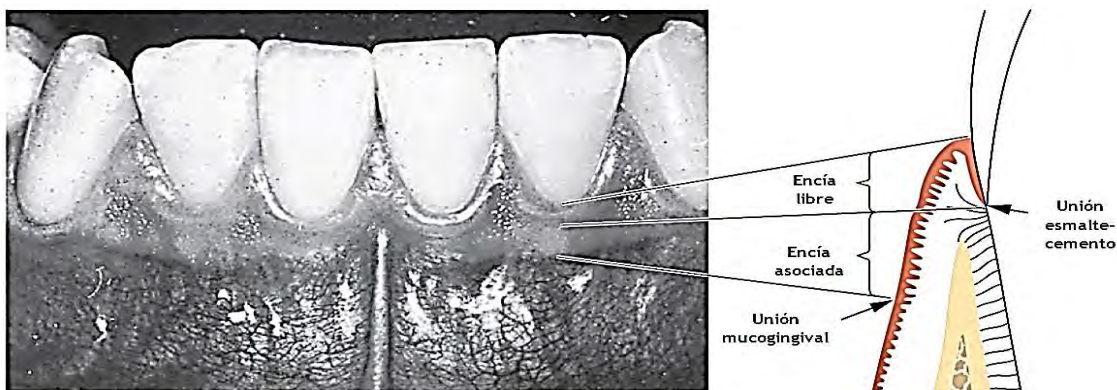


Figura 2. Partes de la encía (Modificada de Lindhe, Lang y Araújo, 2008).

1.2.2 Cemento

Es un tejido especializado mineralizado que cubre la raíz de los dientes y, ocasionalmente, porciones de la corona del diente (figura 3). Comparte ciertas características con el tejido óseo. Sin embargo, el cemento no contiene vasos sanguíneos o linfáticos, no sufre reabsorción fisiológica o remodelación, pero se caracteriza por presentar deposición durante toda la vida. Como otros tejidos mineralizados, contiene fibras de colágeno embebidas en una matriz orgánica. Su contenido mineral, que es principalmente hidroxapatita, contiene alrededor del 65 % en peso; un poco más que el hueso (60 %). El cemento presenta diferentes funciones tales como: sujetar el ligamento periodontal a la raíz y contribuir al proceso de reparación después de un daño a la raíz. Wolf y Hassel (2006) describieron cuatro diferentes tipos de cemento:

- 1) Cemento acelular no fibroso (AAC): se encuentra en el límite del esmalte y es secretado por los cementoblastos.
- 2) Cemento extrínseco fibroso (AEC): es secretado por los fibroblastos. En las porciones apicales de la raíz, comprende una porción del cemento fibroso mixto.
- 3) Cemento intrínseco fibroso celular (CIC): es sintetizado por los cementoblastos pero no contiene fibras de colágeno.
- 4) Cemento mixto fibroso celular (CMC): está formado por cementoblastos y fibroblastos; es una combinación de fibras intrínsecas celulares y fibras extrínsecas.

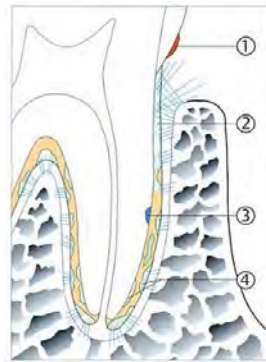


Figura 3. Estructuras del cemento periodontal y su localización: 1) Cemento acelular no fibroso (AAC), 2) Cemento extrínseco fibroso (AEC), 3) Cemento intrínseco fibroso celular (CIC) y 4) Cemento mixto fibroso celular (CMC) Modificada de Wolf y Hassel, 2006).

1.2.3 Hueso alveolar

Se define como la parte de la mandíbula que forma y soporta las uniones de los dientes. Junto con el cemento radicular y la membrana periodontal constituye la unión de los dientes y su principal función es distribuir y reabsorber las fuerzas generadas por ejemplo por la masticación (Lindhe, Lang y Araújo, 2008).

El hueso es propiamente cribiforme en apariencia y esto sigue con una conexión con las estructuras neurovasculares (figura 4.A). Está constituido por osteoblastos durante su desarrollo y es constantemente remodelado a través de su vida por la relación osteoblasto/osteoclasto. Los osteoblastos producen colágeno, glicoproteínas y proteoglicanos para generar la matriz del hueso que es entonces mineralizada con calcio y fosfato. El mineral principal es la hidroxiapatita y su contenido es de aproximadamente 60 %. Cuando los osteoblastos quedan atrapados bajo el tejido óseo se denominan osteocitos. Los osteocitos residen en lagunas y se comunican entre sí por canalículos, como se muestra en la figura 4.B. Los osteocitos rodean los grupos de nervios y forman los llamados osteones. Un osteón es la unidad fundamental del hueso compacto y son unidades cilíndricas. Los osteoclastos son derivados de monocitos y reabsorben el hueso por un rasgo llamado superficie bordeada (Palumbo, 2011).

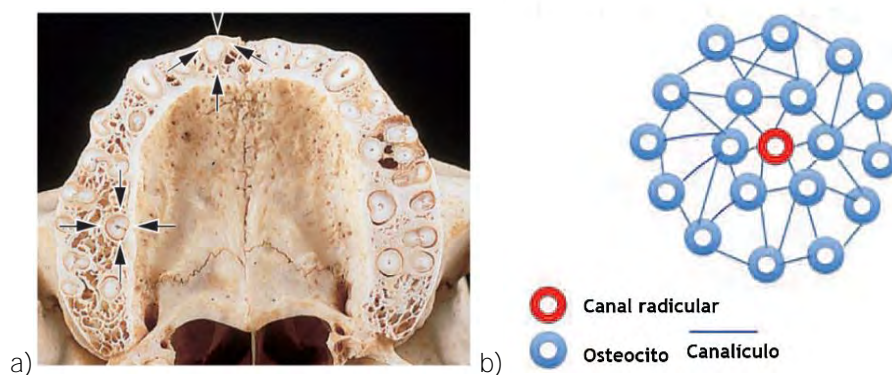


Figura 4. Hueso alveolar: a) Corte transversal, indicando los orificios por donde llegan al periodonto elementos nerviosos y vasculares (Tomada de Lindhe, Lang y Araújo, 2008); b) Configuración microscópica del hueso alveolar (Modificada de Palumbo, 2011).

1.2.4 Ligamento periodontal

El ligamento periodontal (PDL, por sus siglas en inglés) ocupa el espacio entre la superficie radicular y la superficie del hueso alveolar. El PDL consiste en fibras de tejido conectivo, células, vasculatura, nervios y matriz gingival. Forma parte del tejido conectivo de la encía junto con las fibras gingivales.

Las fibras gingivales están formadas de colágena y se presentan en el área supra-alveolar de donde se propagan en todas direcciones. Estabilizan a la encía, proveen resistencia y la unen con la superficie del diente subyacente al epitelio de unión. Las fibras periosteogingivales unen la encía con el hueso alveolar en las siguientes direcciones: 1-Dentogingival: coronal, horizontal y apical; 2-alveogingival; 3-interpapilar; 4-transgingival; 5-circular, semicircular; 6-alveogingival; 7-transeptal; 8-periosteogingival; 9-intercircular; 10-intergingival; 11-crestal; 12-horizontal; 13-oblicua; 14-interradicular y 15-apical. En las figuras 5.A y 5.B se muestran estas direcciones.

El bloque fundamental de la estructura consiste en fibras de colágeno de 40 a 70 nm y se combinan para formar un haz que penetra en el hueso alveolar por un extremo y en el cemento por el otro. La mayoría de las células son fibroblastos con forma de huso con un núcleo oval y varios componentes citoplasmáticos. Estas células son responsables por la síntesis y destrucción del colágeno (rotación). El ligamento periodontal está altamente vascularizado e innervado (Wolf y Hassel, 2006).

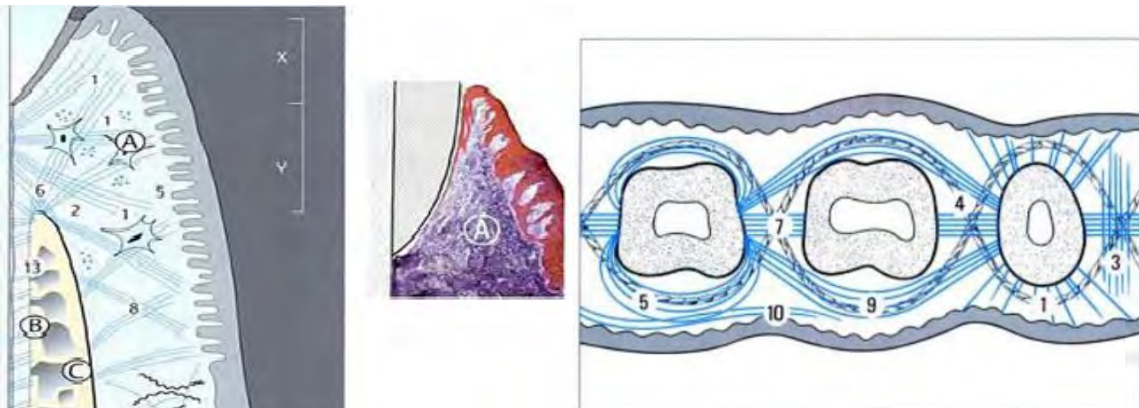


Figura 5: A. Localización y orientación del ligamento periodontal y fibras periodontales desde el plano lateral (A-Fibras gingivales; B-Fibras del ligamento periodontal; C-Hueso alveolar; Y- Tejido conectivo de unión; X+Y-Espacio biológico periotonal); B. Fibras periodontales desde el plano superior (Modificada de Wolf y Hassel, 2006).

1.3 Anatomía microscópica del periodonto

La encía consiste en epitelio y tejido conectivo. El epitelio gingival, de acuerdo a su localización y características histológicas se puede dividir en tres porciones: a) epitelio oral, b) epitelio sulcular y c) epitelio de unión (figura 6).

- a) Epitelio oral: cubre las superficies de la cavidad oral. Es ancho, estratificado, queratinizado o no queratinizado con elongaciones. El epitelio está unido con el tejido conectivo inferior por la lámina propia.

El tejido conectivo de la encía se compone principalmente por fibroblastos, fibras de colágeno y elastina y células nerviosas y vasculares. Otras células presentes incluyen células mesenquimales y del sistema inmunológico como monocitos, macrófagos, neutrófilos, linfocitos y células plasmáticas. Las fibras de colágena del tejido conectivo gingival están dispersas al azar y organizadas en bucles. De acuerdo a su orientación estas fibras se denominan horizontales, apicales, interradiculares, descendientes y oblicuas ascendentes.

- b) Epitelio sulcular: es un epitelio no queratinizado con uniones poco profundas que delimita el surco y conecta con el diente. Esta estructura estratificada es parecida al epitelio oral con excepción de que presenta una completa queratinización. Continúa con el epitelio de unión, que es el epitelio unido al diente (esmalte, cemento o dentina) y localizado al fondo del surco.
- c) Epitelio de unión: Es una estructura no queratinizada de 1 a 3 mm de longitud con sólo dos capas de grosor y con dirección apical con respecto al final de la corona del diente, en la base del surco. El tejido conectivo debajo del epitelio de unión está altamente vascularizado. En condiciones clínicas saludables, células inflamatorias pueden observarse en este tejido (Lindhe, Lang y Araújo, 2008).

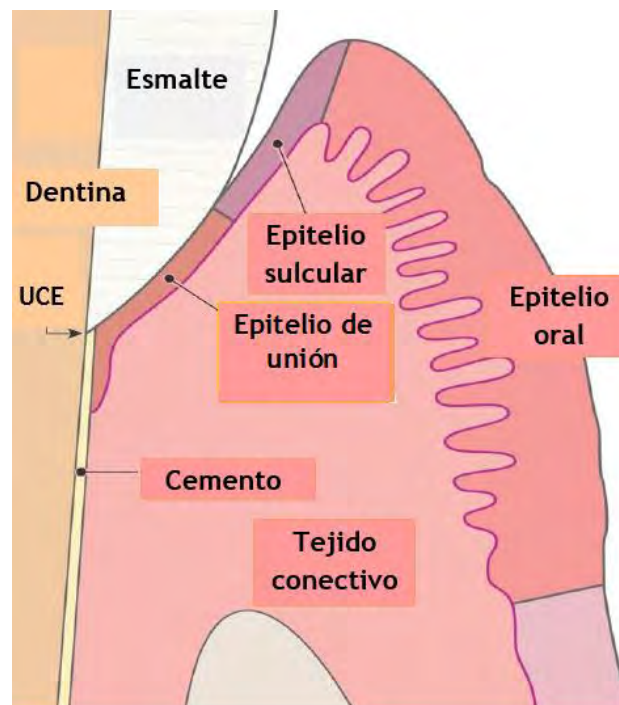


Figura 6. Tejidos presentes en el periodonto: UCE-Unión cemento-esmalte (Modificada de Lindhe, Lang y Araújo, 2008).

1.3.1 Mucosa oral. La mucosa oral presenta tres regiones: mucosa masticatoria, mucosa especializada y mucosa de revestimiento.

- La mucosa masticatoria cubre aquellas áreas que están implicadas en procesos mecánicos, tales como la masticación o el habla, e incluye la encía y el paladar duro. Esta región



masticatoria es estratificada y tiene una capa queratinizada en su superficie, similar a la estructura que se encuentra en la epidermis, y cubre alrededor del 25% de la cavidad oral.

- La mucosa especializada cubre alrededor del 15%, correspondiente al dorso de la lengua, y es un tejido estratificado con dominios queratinizados y no queratinizados.
- la mucosa de revestimiento cubre el restante 60% de la cavidad oral, que consta de las mejillas interiores, piso de la boca, y la parte inferior de la lengua. Este epitelio de revestimiento es estratificado y no queratinizado en su superficie (Repka, Chen y Chan, 2011).

1.4 Flora oral normal

Las superficies orales son constantemente bañadas por dos fluidos fisiológicos importantes: la saliva y el fluido gingival-crevicular, ambos esenciales para el mantenimiento de los ecosistemas orales al proveer agua, nutrientes, adherencia y factores antimicrobianos. Los epitelios superficiales de los labios, mejillas, paladar y lengua son bañados por saliva y proveen ambientes relativamente aerobios. El *Streptococcus* spp. (*S. salivarius* y *S. mitis*) y *Veillonella* spp son las especies predominantes de la lengua; otros miembros mayores de la lengua incluyen bacterias filamentosas Gram-positivas como *Actinomyces* spp. Obligatoria y bacterias anaerobias se encuentran en esta zona incluyendo *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Prevotella intermedia*.

El ambiente supragingival y subgingival difieren en que están predominantemente colonizados por bacterias Gram-positivas facultativas, por ejemplo, *Actinomyces* spp y estreptococos mientras que el fluido gingival-crevicular es esencialmente anaerobio y se encuentra colonizado por bacterias Gram-negativas incluyendo *Fusobacterium* spp, *Treponema* spp. y un pequeño número de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

En las fisuras y surcos gingivales, donde tanto comida como bacterias pueden quedar atrapadas, se presenta una colonización por bacterias ácido-tolerantes tales como estreptococos *mutans*. Las áreas adyacentes al diente y la crevícula gingival ofrecen protección a condiciones adversas y permiten poblaciones de microorganismos anaerobios (Percival, 2009).

2. Enfermedades periodontales

2.1 Definición

De acuerdo a Botero y Bedoya (2010), la enfermedad periodontal es una enfermedad infecciosa-inflamatoria que, de acuerdo al grado de compromiso, puede llevar a la pérdida total de los tejidos de soporte del diente. Zamora et al (2009) afirmaron que la enfermedad periodontal es una infección debido a su etiología microbiana, al establecimiento de una respuesta inmune y a la subsecuente destrucción tisular.

2.2 Etiología

La enfermedad periodontal es el resultado de la respuesta inflamatoria crónica a la acumulación de placa en los márgenes de la encía. Por lo tanto, el crecimiento y maduración de la placa se considera como el principal factor etiológico en la iniciación, persistencia y progresión de esta condición. Sin embargo, los mayores determinantes de susceptibilidad para la periodontitis progresiva son un grupo de factores que incluyen el tabaco, factores genéticos, algunas enfermedades sistémicas, la presencia de bacterias específicas en la placa microbiana, así como factores psicosociales (Hughes, 2015).



2.2.1 Tabaquismo

El tabaco es reconocido como uno de los principales factores para el desarrollo de enfermedades periodontales. Sus efectos son acumulativos y dosis-dependientes. Los efectos del tabaquismo parecen estar mediados sistemáticamente por la supresión de ciertas respuestas del huésped como la migración de neutrófilos. Clínicamente, la periodontitis asociada al tabaquismo se caracteriza por inflamación reducida, pero con sangrado gingival. El tabaquismo es conocido también por representar un factor adverso para los tratamientos periodontales.

2.2.2 Factores genéticos

Algunos estudios han sugerido la aparición de enfermedades periodontales a un número de polimorfismos en ciertos genes, incluidos aquellos encargados **de sintetizar la interleucina 1 α (IL-1 α), la IL.1 β , IL-6** y los receptores de tipo Toll (TLRs por sus siglas en inglés), proteínas encargadas de mediar numerosas respuestas inflamatorias.

2.2.3 Enfermedades sistémicas

Varias condiciones sistémicas pueden marcadamente afectar la susceptibilidad a periodontitis. Por ejemplo, aquellas que afectan la función de los neutrófilos casi invariablemente están asociadas con la aparición de periodontitis. Sin embargo, por mucho la enfermedad más común que propicia la aparición de periodontitis es la diabetes *mellitus* (DM), tanto del tipo I como del tipo II.

La asociación entre enfermedades periodontales y enfermedades cardiovasculares incluyen algunos de los siguientes mecanismos: altas concentraciones de colesterol y la acción de las bacterias orales en los procesos de arterioesclerosis o la participación de proteínas de la fase aguda que pueden incrementarse en la periodontitis crónica.

La obesidad también puede asociarse a estas enfermedades. Algunas de las explicaciones para este fenómeno radican en los diferentes patrones alimenticios de los adultos y los jóvenes. Las tendencias alimenticias en adolescentes de entre 11 y 18 años revelan un significativo decremento en la ingesta de vitamina C. Además, los adolescentes han disminuido su ingesta de calcio, así como un incremento en el consumo de refrescos (AlJehani, 2014).

2.2.4 Factores psicosociales

Ahora existe evidencia considerable de que los factores psicosociales influyen en la susceptibilidad a las enfermedades periodontales. Un número de constructos psicosociales como el estrés y una mala alimentación producto del ritmo de vida actual se han asociado con el incremento de estos padecimientos. Además, los factores psicosociales influyen en las conductas que afectan la higiene oral tales como el tabaquismo, pero también parecen actuar directamente sobre la susceptibilidad del sistema inmunológico (Hughes, 2015).

2.2.5 Uso de fármacos

Algunos medicamentos disminuyen significativamente el flujo de saliva. Estos incluyen antihipertensivos, analgésicos narcóticos, algunos tranquilizantes y sedantes y antihistamínicos. Otros fármacos, particularmente aquellos en forma líquida o masticable que contienen azúcar añadido alteran el pH y por consiguiente la composición de la placa dentobacteriana, haciéndolas más aptas para adherirse a las superficies del diente. Algunos anticonvulsivos, bloqueadores de los



canales de calcio y ciclosporinas pueden inducir una inflamación de las encías (AlJehani, 2014). La fenitoína fue el primer fármaco reportado en el que se encontró este efecto (Ciancio, 1996).

2.3 Clasificación de las enfermedades periodontales

De acuerdo al grado de afectación de los tejidos, las enfermedades periodontales se han clasificado en gingivitis, limitadas a las encías, y periodontitis, extendidas a tejidos más profundos (Highfield, 2009).

2.3.1 Gingivitis

La gingivitis puede definirse como una inflamación inducida por placa confinada a los tejidos gingivales superficiales. Clínicamente, los signos de la gingivitis incluyen sangrado gingival provocado por un trauma menor (típicamente por cepillado dental o examen dental, pero a veces también por masticación), enrojecimiento del margen gingival e hinchamiento de las encías. Normalmente se presenta sin dolor, y aunque a veces el enrojecimiento e hinchazón son evidentes, los cambios observados en esta condición son sutiles y no son identificados por el individuo (Hughes, 2015). De acuerdo a su etiología, la gingivitis puede clasificarse de la siguiente manera:

- I. Gingivitis inducida por placa. Es una inflamación de la encía debida a la localización de bacterias en el margen gingival y que posteriormente se puede extender a toda la unidad gingival. Algunas bacterias específicas de estos padecimientos son *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum* y *Streptococcus* spp. Clínicamente se manifiestan como ulceraciones edematosas dolorosas, máculas mucosas o encías muy inflamadas.
- II. Gingivitis de origen viral. Este tipo de enfermedades presentan la formación de múltiples vesículas que se rompen fácilmente dando lugar a la aparición de úlceras dolorosas. Las más importantes son las asociadas al virus del Herpes simple (VHS) tipo 1 y 2 y al virus varicela-zóster.
- III. Gingivitis de origen fúngico. Incluyen aspergilosis, blastomicosis, candidiasis, coccidioidomicosis, criptococcosis, histoplasmosis, mucormicosis y paracoccidioidomicosis, siendo las más frecuentes la candidiasis y la histoplasmosis. La primera, producida sobre todo por *Candida albicans*.
- IV. Gingivitis asociada a cambios hormonales. En esta clasificación se puede incluir a su vez a tres subtipos:
 - a) Gingivitis asociada a la pubertad. Se caracteriza por inflamación gingival en presencia de cantidades pequeñas de placa bacteriana la cual se debe a la elevación de los niveles de hormonas esteroideas en la sangre.
 - b) Gingivitis asociada al ciclo menstrual. Se caracteriza por inflamación moderada de la encía previa a la fase de ovulación con un incremento del 20 % del exudado gingival debido a la elevación de las hormonas luteinizantes (>25 mU/mL en sangre) y/o de estradiol (>200 pg/mL en sangre).
 - c) Gingivitis asociada al embarazo. Se caracteriza por un amplio infiltrado inflamatorio celular. Los primeros síntomas aparecen en el segundo mes de embarazo y continúan hasta el octavo, momento a partir del cual se observa una cierta mejoría (Highfield, 2009).

2.3.2 Periodontitis

Las características que definen a la periodontitis son la infiltración crónica inflamatoria a los tejidos periodontales profundos lo cual resulta en la destrucción irreversible del hueso alveolar, pérdida de las estructuras del ligamento periodontal y la migración apical del epitelio de unión (figura 7).

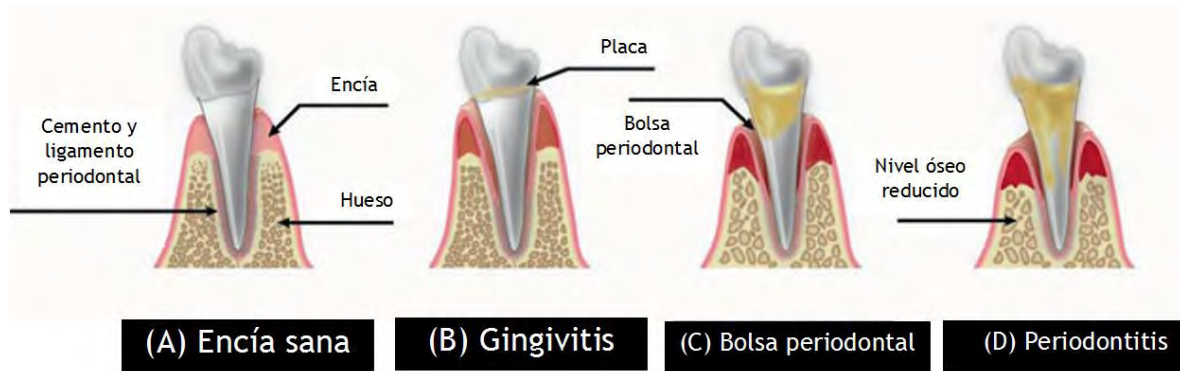


Figura 7. Representación esquemática de las etapas de la enfermedad periodontal. (A) Tejido gingival sano, diente anclado y estructuras periodontales. (B) Formación de placa (biofilm). (C) Formación de bolsa periodontal. (D) Periodontitis, destrucción de la encía y hueso que soporta al diente. (Modificada de Piñón-Segundo et al, 2013).

Juntas, Estas características se conocen como la “pérdida de las estructuras de soporte del diente”. Las características parecen ocurrir de manera coordinada, tal que la pérdida de altura en el hueso alveolar es igual a la distancia de la migración apical del epitelio de unión (Hughes, 2015). Esto generalmente desemboca en la formación de la bolsa periodontal, la cual puede ser definida como un surco gingival profundizado que se forma entre la encía y el diente. Clínicamente un surco gingival inferior a 3 mm se considera normal mientras que si su profundidad es mayor a los 3 mm ya se considera como bolsa periodontal. Dependiendo de la relación con el hueso las bolsas periodontales pueden clasificarse en bolsas supraeóseas y bolsas infraeóseas (Reddy, 2008), las cuales se muestran en la figura 8.

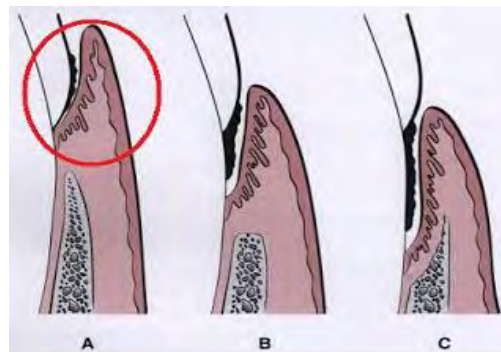


Figura 8. Bolsas periodontales: A) bolsa periodontal normal; B) Bolsa supraeósea; C) bolsa infraeósea (Modificada de Reddy, 2008).

La bolsa es una de las características más importantes de la enfermedad periodontal; la formación progresiva de bolsas conduce a la destrucción del tejido periodontal de soporte, movilidad y pérdida de piezas.

2.4 Etiopatogenia de la enfermedad

Las enfermedades periodontales son un buen ejemplo de enfermedades crónicas inflamatorias con inflamación persistente ocurriendo concurrentemente con los intentos del organismo por reparar el daño. Su cronicidad es resultado de un estímulo inflamatorio persistente, la placa dentobacteriana o *biofilm* y la infiltración inflamatoria crónica en los tejidos periodontales marginales en respuesta (Hughes, 2015).

Las bacterias de la placa subgingival forman una estructura compleja y que se adhiere al diente llamada *biofilm*. De acuerdo a Frías (2014) la acumulación de placa dental, es decir, la formación del *biofilm* es el principal agente etiológico de la gingivitis así como el primer estadio en el desarrollo de la periodontitis. Éste se define como una comunidad microbiana caracterizada por células que están irreversiblemente unidas a un sustrato o interfase, que se encuentran embebidas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares producidas por ellas mismas y que exhiben un fenotipo alterado con respecto a la transcripción génica (figura 9).

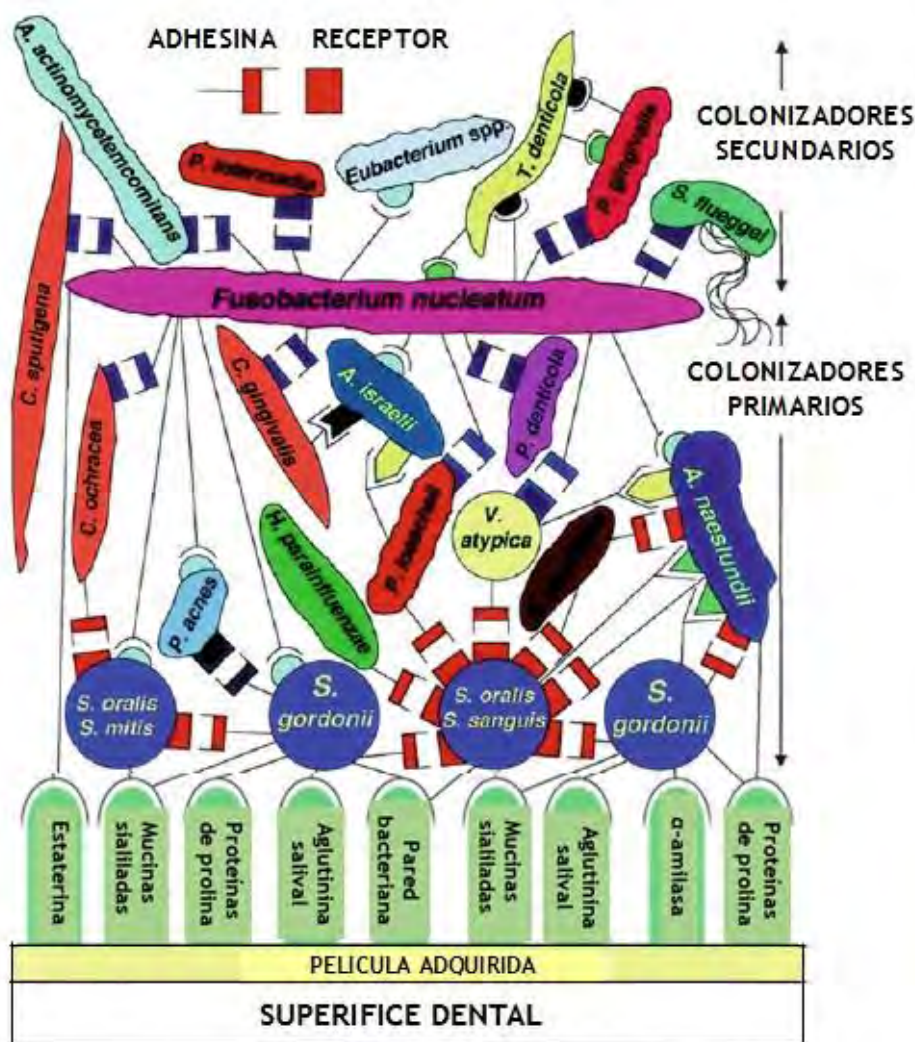


Figura 9. Composición y estructura del biofilm. Se muestra la formación desde el fondo por estreptococos a la superficie por bacterias gram-negativas. (Modificada de Frías, 2014).



Estudios sobre el ecosistema de la placa han descrito diferentes grupos de bacterias asociados con diferentes estados en la salud periodontal. Los grupos mayormente asociados con las enfermedades periodontales se conocen como el *complejo rojo* y el *complejo anaranjado*. Las bacterias del complejo rojo, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannaerella forsythus*, y *Treponema denticolum* se han asociado fuertemente con el estado final de la formación de placa subgingival y el desarrollo de periodontitis. Las bacterias del complejo anaranjado incluyen organismos como *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* y *Campylobacter rectus* (Hughes, 2015).

2.4.1 Proceso inflamatorio y destrucción del tejido periodontal

El proceso de la patogénesis comienza cuando las bacterias del biofilm producen factores de virulencia, tales como el ácido lipoprotéico (LPS), y que conforman los llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés). Los PAMPs interactúan con los receptores celulares superficiales conocidos como receptores de reconocimiento, tales como los receptores tipo Toll (TLRs, por sus siglas en inglés), presentes en las células del huésped lo cual resulta en la activación de las respuestas inmunológicas innatas y adquiridas.

Como parte de estas respuestas, el tejido conectivo gingival es reemplazado casi completamente por un infiltrado inflamatorio crónico que contiene un denso paquete de células plasmáticas, como linfocitos T y macrófagos. Los neutrófilos migran extensivamente a través del epitelio hacia la bolsa periodontal en respuesta a citosinas tanto proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-17 y TNF α) como antiinflamatorias (IL-10), lo cual desencadenará en su degranulación en el surco gingival, liberando consigo reactivos del oxígeno (ROIs) y enzimas como catepsina G, lactoferrina, defensinas, mieloperoxidasa, metaloproteinasas (MMP-8) y serin-proteasas. Si bien todos estos reactivos biológicos son nocivos para las bacterias, también generan una extensiva destrucción de fibras de colágeno lo cual desemboca en una hiperplasia del tejido periodontal y micro-ulceraciones con sangrado.

Después de estimulada la respuesta inmune innata, desencadena la respuesta inmune adquirida y aparecen en el tejido conectivo linfocitos T CD4 y linfocitos B, ayudando a resolver el proceso inflamatorio. La estimulación de linfocitos toma entre 5 y 7 días en alcanzar su mayor activación. Por lo tanto, una buena respuesta innata es fundamental para mantener la salud periodontal. Los linfocitos T CD4 producen citoquinas (IFN, IL-2) que promueven una mejor actividad de macrófagos y co-estimulan a los linfocitos B a producir anticuerpos tipo IgG e IgA neutralizantes.

A medida que progresa el proceso inflamatorio, éste se vuelve crónico y comienza la degradación de los tejidos de soporte, como el hueso alveolar. Esta última fase de la destrucción del tejido periodontal está controlada por el sistema RANK-RANKL-OPG (receptor activador del ligando nuclear factor-kappaB (RANKL)/RANK/osteoprotegerina). El RANKL de une al receptor del RANK lo cual se expresa en la producción de células monocíticas, induciendo la producción de osteoclastos multinucleados, lo que provoca la destrucción del hueso alveolar. Adicionalmente al daño al tejido, la red de citocinas impide la reparación de fibroblastos lo que desencadena en la fibrosis final. Como resultado de la destrucción tisular, aparece del llamado Telopéptido C del colágeno tipo I (ICTP por sus siglas en inglés) el cual representa un importante biomarcador en las enfermedades periodontales avanzadas (Hughes, 2015).

El proceso completo se presenta en la figura 10.

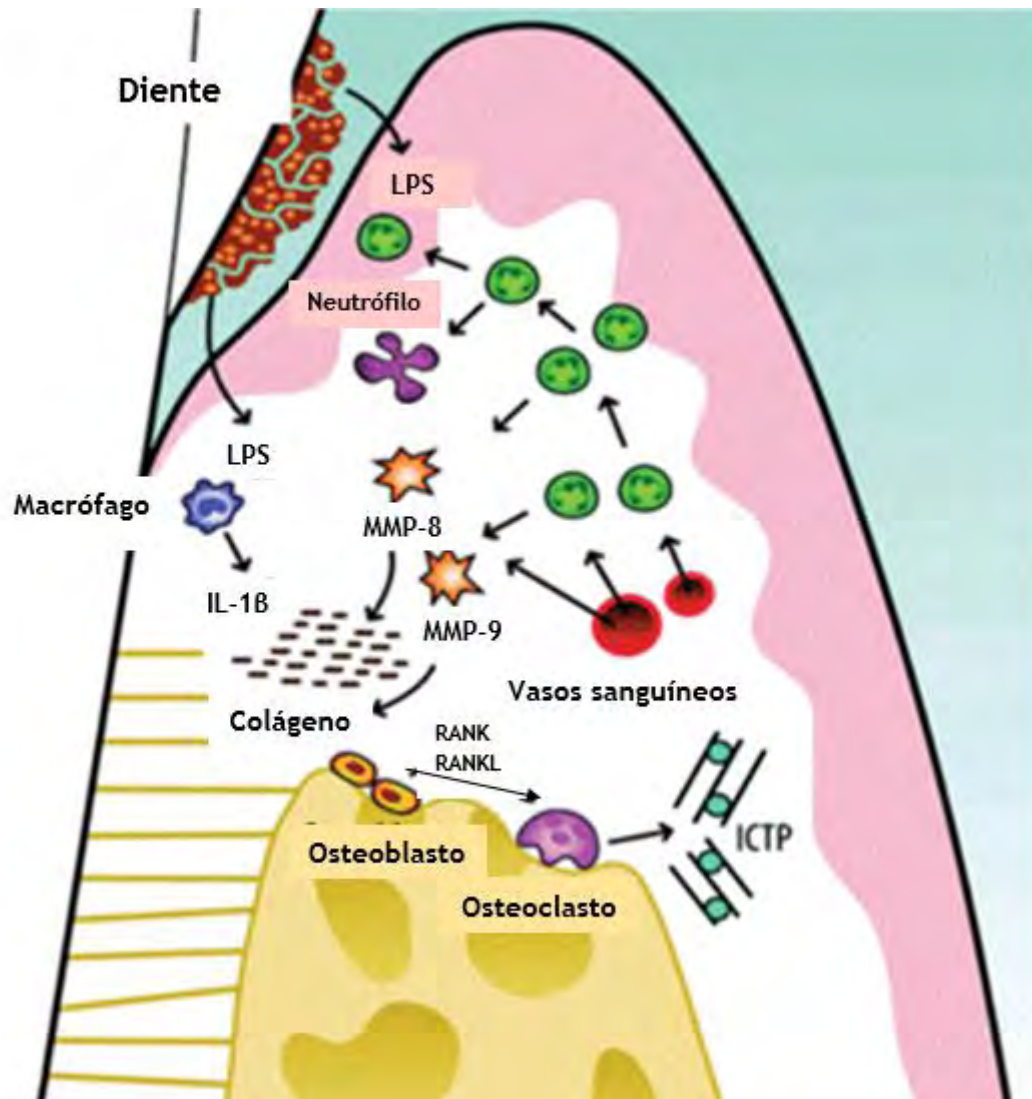


Figura 10. Proceso inflamatorio y destrucción de los tejidos en enfermedades periodontales: LPS-ácido lipoprotéico; IL-1 β -interleucina 1 β ; MMP-metaloproteinasas; RANK/RANKL- receptor activador del ligando nuclear factor- κ B; ICTP-Telopéptido C del colágeno tipo I (Modificada de Hughes, 2015).

2.5 Epidemiología de las enfermedades periodontales

Las enfermedades periodontales son altamente prevalentes a nivel mundial. Junto con la caries dental severa, son una de las mayores causas de pérdida de piezas dentales, lo cual afecta directamente la calidad de vida de la población en términos de la reducción de su capacidad funcional, autoestima y relaciones interpersonales. En la encuesta realizada por la OMS en 2010 se indicó que el 35 % de la población de entre 65 y 74 años había sufrido algún grado de pérdida de piezas dentales (Petersen y Ogawa, 2012). Hau et al (2014) señalan que a nivel mundial el 47% de los adultos mayores de 30 años presentaban signos de periodontitis.

La prevalencia y severidad de las enfermedades periodontales se ha medido en las poblaciones de diferentes maneras. Sin embargo, el Índice Comunitario Periodontal (ICP) fue introducido por la



OMS como una medida del estado de salud periodontal, así como un determinante del plan de intervención a seguir. Los parámetros del ICP son el porcentaje de personas por su mayor puntaje de ICP (prevalencia) y el número promedio de sextantes afectados (severidad) con ciertos grados de ICP:

Tabla 1. Grados del Índice Comunitario Periodontal (ICP).

Grado	Descripción	Plan de tratamiento
0	Condiciones periodontales saludables	Mantener las medidas de prevención
1	Sangrado gingival	Medidas de higiene bucal, remoción de placa bacteriana supra y subgingival, aplicación de fluoruros
2	Sangrado y cálculo gingival	Medidas de higiene bucal, remoción de placa bacteriana supra y subgingival, corrección de márgenes gingivales, aplicación de fluoruros
3	Bolsas periodontales poco profundas (4-5 mm)	Valoración de bolsas, movilidad dentaria, recesiones gingivales y examen radiográfico. Raspado y alisado radicular.
4	Bolsas periodontales profundas (≥ 6 mm)	Tratamiento periodontal complejo que incluye raspado profundo, y cirugía periodontal.
9	Utilizado para indicar movilidad dentaria, retracciones gingivales superiores a 3 mm y problemas mucogingivales	Cirugía periodontal
X	No registrado o no distinguible	No registrado o no distinguible

El banco de datos del IPC se actualiza continuamente y los datos disponibles de acuerdo a la OMS se muestran en el gráfico 1 de acuerdo a su región; la Región Africana (AFRO), la Región de las Américas (AMRO), la Región Este del Mediterráneo (EMRO), la Región Europea (EURO), la Región Sureste de Asia (SEARO) y la Región del Pacífico Oeste (WPRO) (Petersen y Ogawa, 2012).

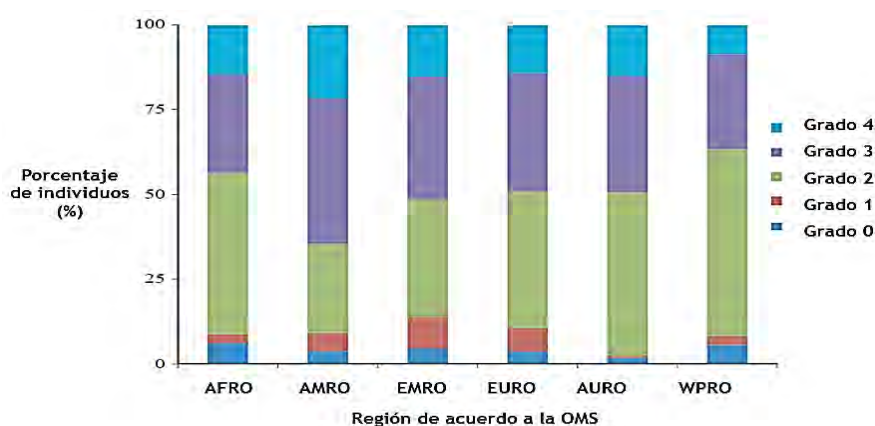


Gráfico 1. Índice Comunitario Periodontal (ICP) máximo en población de 35 a 44 años por región de acuerdo a la OMS (Modificada de Petersen y Ogawa, 2012).



En el caso de México, la Secretaría de Salud presentó en 2014 el informe del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales (SIVEPAB) en donde indicó que de las cincuentas enfermedades más prevalentes no mortales pero incapacitantes, tres son del ámbito de la salud bucal: caries dental, enfermedad periodontal y pérdida de piezas dentales. El estudio se realizó en 413 unidades que pertenecen al Sector Salud incluyendo programas del IMSS-Oportunidades, ISSSTE, SEDENA, SEMAR, PEMEX y DIF. La población se dividió en niños y adolescentes de 2 a 19 años y adultos de 20 a 99 años.

Con respecto a niños y adolescentes, se reportó que un gran porcentaje que acuden a los servicios de salud tenían un periodonto sano (74.3 %), el 13.7 % de ellos presentaba sangrado gingival y el 11.15 % cálculo dental por lo menos en un sextante. Para los adolescentes de 15 a 19 años la presencia de bolsas periodontales superficiales fue del 1% y menos de 0.1 % resultaron ser bolsas periodontales profundas. Los resultados se presentan en el gráfico 2.

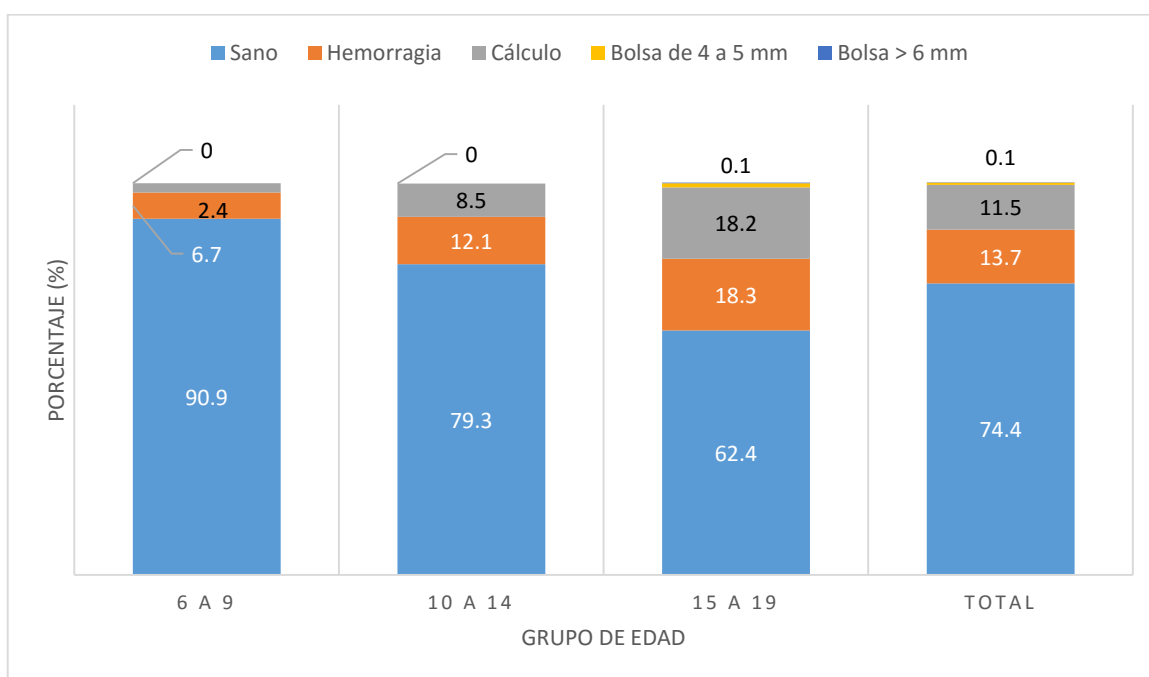


Gráfico 2. Distribución del Índice Comunitario Periodontal (ICP) en niños y adolescentes por grupo de edad (Mejía, González y Lomelí, 2014).

Para la población adulta, aproximadamente el 59.6 % tenía algún signo de enfermedad periodontal, un poco más de la quinta parte (20.3%) tenía gingivitis, 4.7 % tenían signos de enfermedad periodontal leve (bolsas periodontales superficiales) y 1.3 % tenía signos de enfermedad periodontal avanzada (bolsas periodontales profundas). El porcentaje de pacientes con un periodonto sano (código 0) disminuye con la edad, para el grupo de edad de 20 a 24 años es de 53.2 %, en los de 40 a 44 años es de 37.7 % y sólo un 30.2 % en adultos de 80 años y más. A partir de los 45 años la categoría con mayor peso es la del código 2, así en el grupo de 45 a 49 años un poco más de la tercera parte (37.4 %) presenta cálculo dental (Mejía, González y Lomelí, 2014). Los resultados se muestran en el gráfico 3:

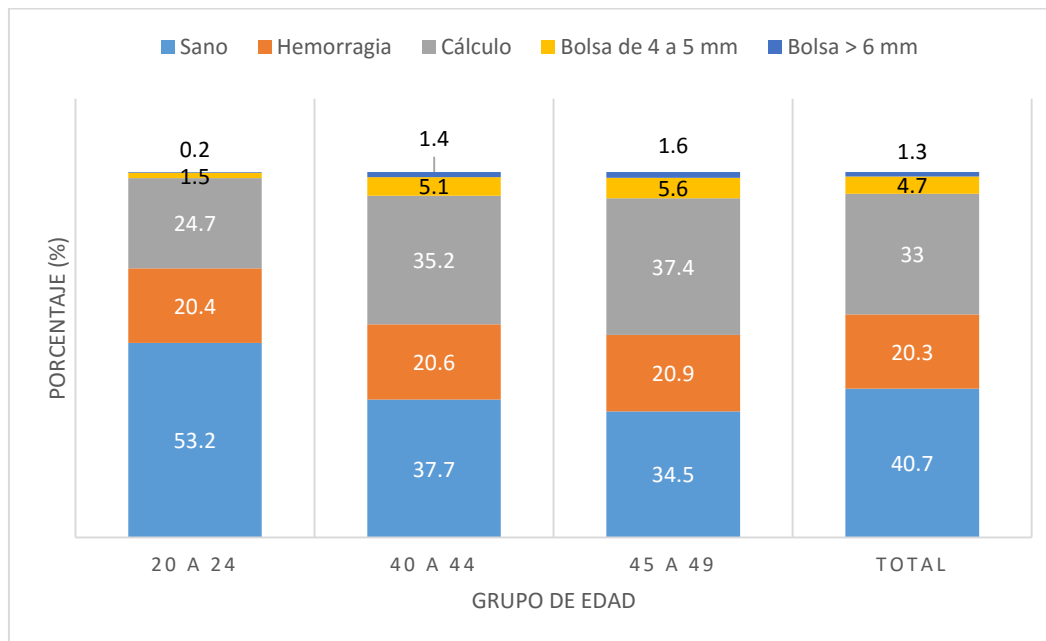


Gráfico 3. Porcentaje del Índice Comunitario Periodontal (ICP) por grupo de edad en usuarios de los Servicios de Salud (Mejía, González y Lomelí, 2014).

3. Tratamiento de las enfermedades periodontales

Los principios actuales del manejo de las enfermedades periodontales están basados en el control de los factores etiológicos, principalmente la placa bacteriana. Los objetivos del tratamiento periodontal son eliminar la inflamación existente, reducir las bolsas periodontales a un nivel manejable (normalmente menor a 5 mm) para prevenir una futura ruptura de los tejidos y, en últimas instancias, la pérdida de piezas dentales. Así, los tratamientos para enfermedades periodontales se pueden clasificar en tratamientos quirúrgicos y no quirúrgicos.

3.1 Procedimientos quirúrgicos

Son aquellos que involucran la participación del profesional dental para eliminar cualquier riesgo patológico de las superficies subgingivales. Se han empleado varias técnicas quirúrgicas para el manejo de las bolsas periodontales. Estas se pueden dividir en *métodos correctivos* y *métodos resectivos*. En los métodos correctivos se hace un corte en el tejido gingival inflamado y, después de eliminados los depósitos patogénicos, se vuelve a suturar. Con los métodos resectivos los defectos óseos subyacentes se ajustan para eliminar áreas infraóseas y el tejido gingival se sustituye entonces apicalmente a fin de eliminar quirúrgicamente la bolsa (Hughes, 2015).

3.2 Procedimientos no quirúrgicos

Comprenden el raspado y el alisado radicular (figura 11). El raspado es un procedimiento dental en el cual la placa y los cálculos bacterianos son removidos de la superficie dental tanto supragingival como subgingival, mientras que el alisado radicular es el procedimiento mecánico en el que se remueven las irregularidades en la superficie dental con la finalidad de que los tejidos adyacentes en la bolsa periodontal puedan sanar (Leonardi y Walsh, 2010).

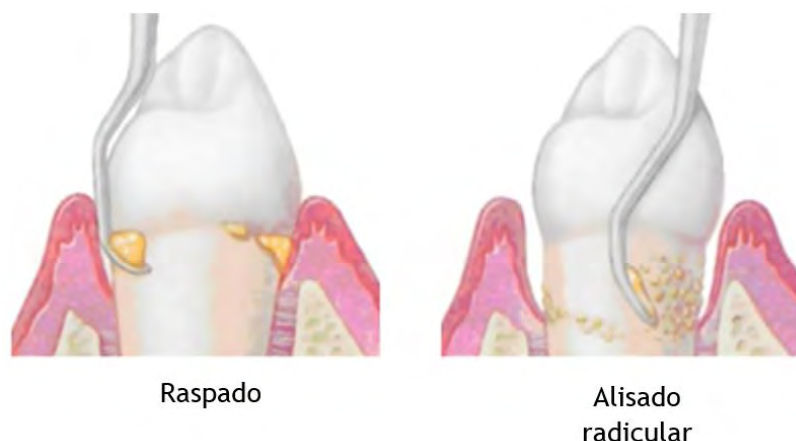


Figura 11. Raspado y alisado radicular (Modificado de Leonardi y Walsh, 2010).

3.3 Terapia antimicrobiana

A pesar que los tratamientos mecánicos permiten remover los agentes etiológicos que causan las enfermedades periodontales, el uso de estas terapias mecánicas solas puede no combatir algunos tipos de periodontopatógenos, haciendo difícil obtener o regenerar la salud periodontal, además que alteran la microbiota gingival, permitiendo el establecimiento de una gran cantidad de bacterias relacionadas con estas enfermedades (Vicentini, 2013).

Por eso, varios estudios han demostrado que el uso de los fármacos antimicrobianos junto con el tratamiento mecánico periodontal representa una estrategia terapéutica importante en el tratamiento de enfermedades periodontales. Se conoce como fármacos antimicrobianos a todas aquellas sustancias químicas que tienen un efecto en contra de una gran variedad de microorganismos, tales como bacterias, virus, hongos y parásitos (FDA, 2015).

3.3.1 Antibióticos

Se denomina antibiótico a cualquier sustancia química producida por microorganismos vivos (bacterias u hongos) que suprimen el crecimiento de otros microorganismos vivos (principalmente bacterias) (Lorenzo et al, 2008). La FDA (2015) definió a los antibióticos como fármacos que son efectivos contra bacterias. Además, señaló que todos los antibióticos son antimicrobianos, pero no todos los antimicrobianos son antibióticos con el fin de dilucidar la diferencia entre los dos conceptos.

En el caso de la terapia periodontal, los antibióticos se han administrado tradicionalmente de manera sistémica, de tal manera que es frecuente encontrarlos en la literatura con el nombre de antibióticos sistémicos. Slots (2002) los definió como sustancias naturales o sintéticas que en bajas concentraciones pueden matar o inhibir microorganismos específicos. De acuerdo al mismo autor, los antibióticos sistémicos penetran en la bolsa periodontal por el suero sanguíneo y pueden afectar a los microorganismos de ese sitio además de que atacan a los patógenos presentes en la lengua u otras superficies bucales. Sin embargo, existen también dispositivos que permiten la administración de antibióticos de manera local.

De acuerdo a Ramu y Padmanabhan (2012), la terapia con antibióticos sistémicos incluye monoterapia **basada en el uso de β -lactamas** (como la amoxicilina y el ácido clavulánico),



metronidazol, tetraciclinas (tetraciclina, doxiciclina, minociclina), clindamicina y cirpofloxacin. Adicionalmente a los efectos de la terapia con antibióticos sistémicos con un fármaco en específico, las asociaciones de algunos de estos fármacos han mostrado también resultados clínica y microbiológicamente prometedores.

Sin embargo, un punto relevante del uso correcto de los antibióticos sistémicos está basado en la posibilidad de efectos adversos de estos medicamentos y, particularmente, la posibilidad del desarrollo de resistencia de ciertos organismos. Las reacciones adversas pueden variar desde una simple náusea o dolor de cabeza hasta el desarrollo de colitis pseudomembranosa la cual, si no es tratada correctamente, puede resultar en la muerte del paciente. Adicionalmente, la resistencia bacteriana es el factor negativo más importante en el uso indiscriminado de los antibióticos sistémicos (Vicentini et al, 2013).

3.3.2 Antisépticos

Se definen como fármacos que, cuando se aplican sobre superficies del cuerpo o en tejidos expuestos, destruyen los microorganismos residentes en la piel, mucosas, quemaduras y heridas abiertas, anulando su potencial infeccioso; por ello, también se les denomina germicidas de superficie (Lorenzo et al, 2008). De acuerdo a Dumitrescu (2014) los antisépticos se definen como aquellas sustancias que pueden inhibir el crecimiento y desarrollo de microorganismos (sin necesariamente matarlos) en tejidos vivos. Junto con los antibióticos sistémicos, constituyen las dos principales opciones en el tratamiento de enfermedades periodontales.

Con el fin de contrastar su uso con respecto a los antibióticos, Slots (2002) mencionó que los antisépticos tienen un espectro de actividad considerablemente más amplio y normalmente tienen múltiples objetivos intracelulares para la destrucción del microorganismo lo que reduce la probabilidad de resistencia bacteriana.

3.3.2.1 Propiedades de los antisépticos bucales

Bascones y Morante (2006) mencionaron que este tipo de fármacos poseen cuatro características que deben ser tomadas en cuenta antes de elegir alguno de ellos para utilizarse en el tratamiento de enfermedades periodontales:

- a) Especificidad: el control de placa debe evitar en la medida de lo posible el uso de antibióticos, siendo reservados para infecciones graves.
- b) Eficacia: la pauta terapéutica viene determinada por la concentración mínima inhibitoria para las bacterias asociadas a patologías dentales.
- c) Sustantividad: Cualidad que mide el tiempo de contacto entre una sustancia y un sustrato en un medio dado. Al tratar infecciones dentales ésta es una cualidad muy importante ya que el agente antimicrobiano necesita cierto tiempo de contacto con el microorganismo para inhibirlo o eliminarlo.
- d) Seguridad: Viene dada por la permeabilidad y su potencial de toxicidad. Es la primera característica que debe evaluarse para asegurar que el fármaco no se absorba y pueda generar un efecto local.

3.3.2.2 Principales antisépticos bucales utilizados en terapia periodontal

De acuerdo a Dumitrescu (2014), los antisépticos más utilizados en salud periodontal incluyen los siguientes compuestos:



- a) Bisguanidas: clorhexidina.
- b) Compuestos cuaternarios de amonio: cloruro de cetilpiridinio (CCP), Cloruro y bromuro de bencetonio.
- c) Detergentes: lauril sulfato de sodio (LSS).
- d) Aceites esenciales: timol, eucaliptol, mentol y salicilato de metilo.
- e) Compuestos fenólicos: triclosán.
- f) Sales metálicas: compuestos de cobre, zinc y estaño.
- g) Enzimas: removedores de placa (dextranasa, mutanasa y varias proteasas) y estimulantes de la respuesta del huésped (glucosa-oxidasa y aminoglucosidasa).
- h) Productos naturales: sanguinaria y propóleo.
- i) Agentes oxidantes: peróxido de hidrógeno, bicarbonato de sodio, tiocianatos y peróxido de carbamida.
- j) Fluoruros: fluoruro de sodio, fluoruro de estaño.
- k) Aminoalcoholes: delmopinol.
- l) Yodo: povidona.
- m) Compuestos clorados: hipoclorito de sodio, cloramina.
- n) Otros antisépticos: hexetidina, salifluor.

3.3.2.3 Clasificación de los antisépticos bucales

Dumitrescu (2014) clasifica a los antisépticos bucales en tres principales grupos con base a sus propiedades antiplaca y sustantividad. Las características de esta clasificación se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Clasificación de los antisépticos bucales utilizados en terapia periodontal.

Grupo	Características	Ejemplos
A	Se describe como agentes antiplaca e impiden la colonización de bacterias y formación del biofilm. Estos antisépticos pueden inhibir la formación de placa dental de tal forma que previenen el desarrollo de gingivitis y periodontitis. Poseen alta sustantividad.	Clorhexidina, fluoruros, compuestos fenólicos, amins cloradas.
B	Poseen baja sustantividad cuando se usan solos y son predominantemente inhibidores de la placa.	Cloruro de cetilpiridinio, aceites esenciales y triclosán.
C	Poseen actividad de baja a moderada. Son agentes con bajo efecto antiplaca y poseen prácticamente un efecto cosmético, tal como frescura.	Plantas como la sanguinaria, agentes oxidantes y productos que contienen primidina o hexetidina.

3.3.2.4 Clorhexidina

La clorhexidina es el más estudiado y, ciertamente, el más efectivo antimicrobiano utilizado en salud bucal. Es una bisguanida que, a pH fisiológico, consiste en una molécula dicatiónica (1, 6-diclorofenil-diguanido)-hexano, con las cargas positivas distribuidas sobre los átomos de nitrógeno a ambos lados del puente de hexametileno. Por lo tanto, la clorhexidina tiene la habilidad de adsorberse sobre las superficies cargadas negativamente, tales como paredes bacterianas y compuestos de fosfato. Además, se une a los fosfolípidos de la membrana bacteriana, la

hidroxiapatita del diente, la película adquirida y las proteínas salivales (Dumitrescu, 2014). Su estructura química se presenta en la figura 12.

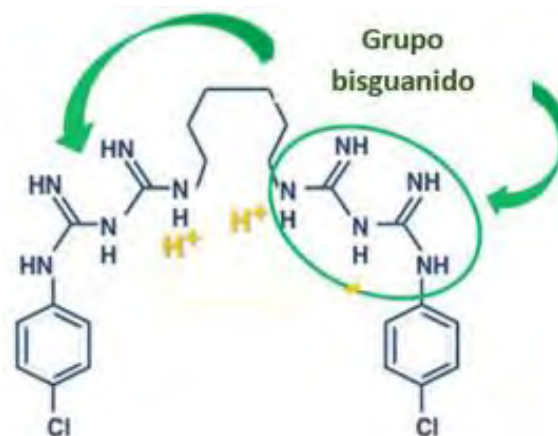


Figura 12. Estructura química de la clorhexidina, indicando los sitios donde se alojan los protones que le confieren la carga positiva (Modificada de Dumitrescu, 2014).

3.3.2.4.1 Propiedades fisicoquímicas

La clorhexidina por sí sola es una base fuerte, prácticamente insoluble en agua (0.008% p/v a 20°C) que reacciona con ácidos para formar sales del tipo RX_2 . Debido a su bajo perfil de solubilidad, se encuentra normalmente como acetato, gluconato o clorhidrato (Rowe et al, 2009). Las estructuras químicas se muestran en la figura 13.

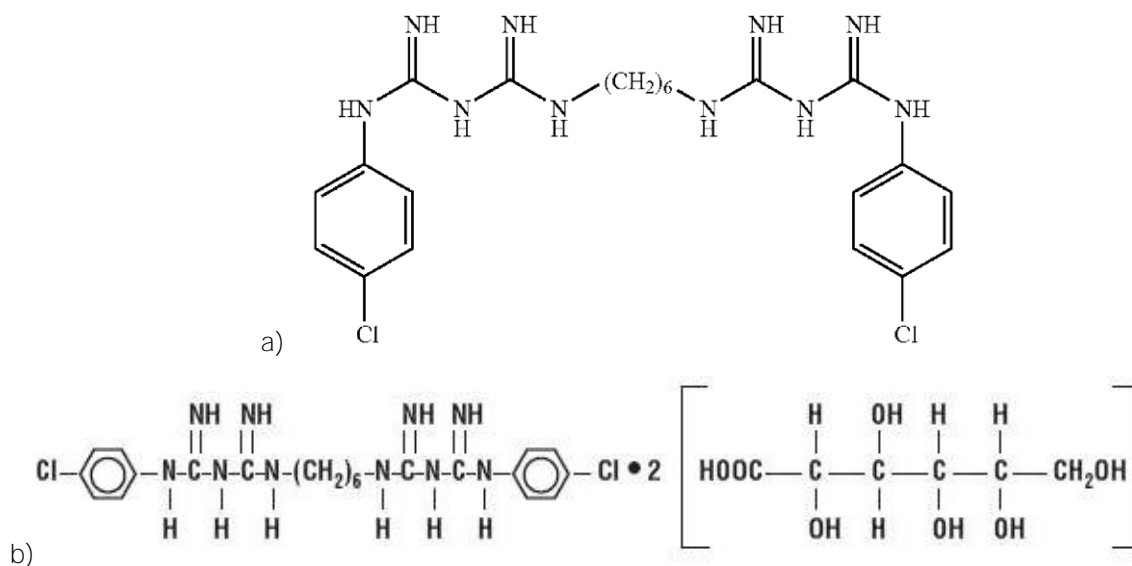


Figura 13. Estructura química de las presentaciones de clorhexidina: a) base; b) gluconato (Tomada de Rowe et al, 2009)

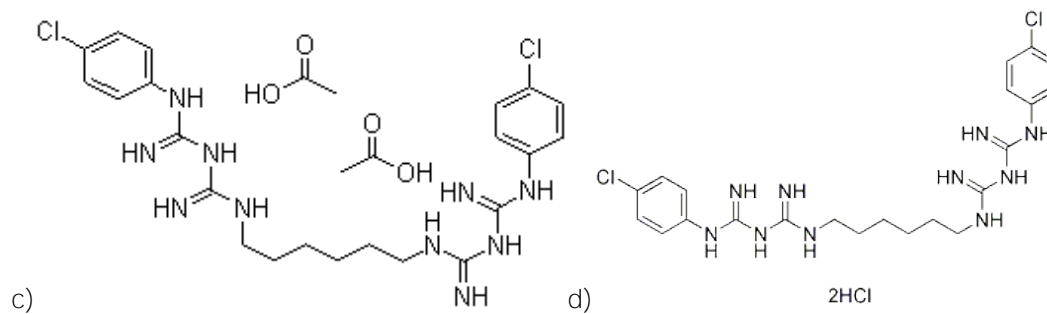


Figura 13. Estructura química de las presentaciones de clorhexidina (continuación): c) acetato; d) clorhidrato (Tomada de Rowe et al, 2009)

3.3.2.4.2 Mecanismo de acción

Se une fuertemente a la membrana celular bacteriana; una vez adsorbida en las proteínas ricas en fosfato de la pared bacteriana, penetra y rompe la membrana celular provocando una unión con los componentes citoplasmáticos. A altas concentraciones ejerce una acción bactericida mediante la formación de precipitados con el adenosín-trifosfato (ATP) y los ácidos nucleicos (Baruch, 2012). La figura 14 esquematiza este mecanismo.

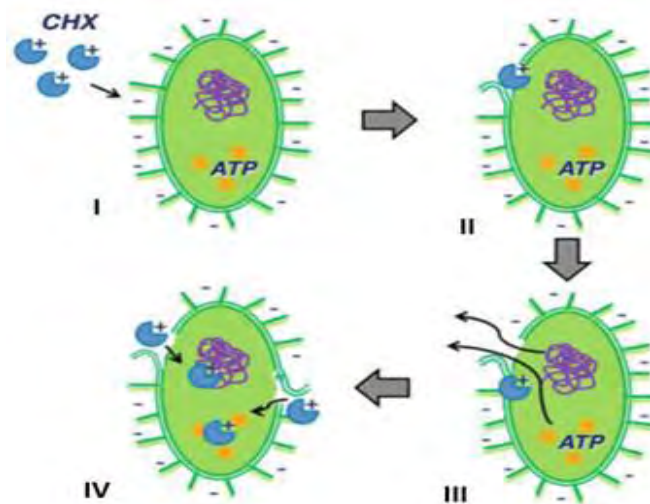


Figura 14. Mecanismo de acción de la clorhexidina: I. Los grupos biguanido fuertemente catiónicos se unen a la membrana bacteriana; b) II. Se produce la pérdida de la integridad de la membrana; b) III. A altas concentraciones, la clorhexidina penetra en la bacteria y se une irreversiblemente al ADN y el ATP; b) IV. Se produce la lisis celular. CHX: clorhexidina, ATP: Adenosín trifosfato (modificada de Dumitrescu, 2014).

3.3.2.4.3 Actividad antimicrobiana

La clorhexidina tiene un amplio espectro de actividad comprendiendo bacterias gram-positivas y bacterias gram-negativas, levaduras, dermatofitos y algunos virus (Dumitrescu, 2014). Cabe mencionar que una de las características más importantes de la clorhexidina es su actividad *in vitro* contra virus encapsulados, tales como el herpes simple, el VIH, el de la influenza y el virus sincital respiratorio, aunque presenta menos actividad contra virus no encapsulados (Maya et al, 2011).



Una de sus grandes ventajas con respecto a otros antimicrobianos es su alta sustantividad. Debido a sus propiedades catiónicas se une a la hidroxiapatita del esmalte, a la película adquirida y a las proteínas salivales. La clorhexidina absorbida se libera gradualmente en un periodo de tiempo de 12 a 24 h después de su administración lo cual evita la colonización bacteriana en ese tiempo (Baruch, 2012).

En 2010, Koburger et al compararon la eficacia de diversos antisépticos bucales contra de algunos microorganismos responsables de infecciones en piel, tejidos y mucosas en donde los resultados mostraron que el gluconato de clorhexidina fue el que ofreció los mejores resultados. Los resultados se muestran en la tabla 3:

Tabla 3. Comparación de la concentración mínima inhibitoria de tres antisépticos para diferentes microorganismos de acuerdo a Koburger et al (2010).

Microorganismo	Concentración mínima inhibitoria (µg/mL)		
	Gluconato de clorhexidina	Triclosán	Povidona
<i>S. aureus</i>	8	512	0.125
<i>E. fecalis</i>	16	≥1024	16
<i>S.pneumoniae</i>	4	>1024	8
<i>E. coli</i>	8	1024	2
<i>P.aeuruginosa</i>	32	1024	>512
<i>C.perfringens</i>	32	1024	256
<i>H. influenzae</i>	8	512	32
<i>C. albicans</i>	4	256	8
Valor máximo	32	>1024	>512

Por su parte, Solmaz y Korachi (2013) realizaron un estudio sobre la capacidad de inhibición y propiedades de ruptura de las principales especies bacterianas formadoras del biofilm dental. Los resultados que obtuvieron se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y concentraciones mínimas bactericidas (CMB) para gluconato de clorhexidina.

Microorganismo	Concentración mínima inhibitoria (µg/mL)	Concentración mínima bactericida (µg/mL)
<i>S. mutans</i>	1.5	3
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	3	6
<i>F. nucleatum</i>	6	6
<i>P. gingivalis</i>	6	6
Mezcla de bacterias	6	6

3.3.2.5.4 Reacciones adversas

Los efectos adversos reportados para la clorhexidina incluyen manchas en los dientes (una de las más comunes y reportadas por los pacientes), alteraciones del gusto, erosión de la mucosa oral y, raramente, hipertrofia de la glándula parótida. Se han propuesto diversos mecanismos para explicar la tinción de los dientes y mucosas por el uso de clorhexidina:



- a) Degradación de la molécula de clorhexidina y liberación de *p*-cloroanilina;
- b) Reacción de Maillard (glicosilación de compuestos nitrogenados para formar melanoidinas);
- c) Desnaturalización de proteínas con formación de sulfuros metálicos;
- d) Precipitación de cromógenos de la dieta (terpenos presentes en bebidas como el café).

La hipoglosia (habilidad reducida para percibir los sabores) se presenta normalmente con sabores amargo y salado manteniendo intacta la percepción de los sabores dulces o ácidos. Esta reacción se presenta incluso algunos días después de retirada la administración del fármaco. La disguesia (distorsión del gusto) parece no estar relacionada con la concentración de clorhexidina (Dumitrescu, 2014).

3.3.3 Formas farmacéuticas empleadas en la terapia antimicrobiana

3.3.3.1 Formas farmacéuticas convencionales

Las principales vías de administración para los agentes antiplaca, así como de control de la inflamación comprenden formas farmacéuticas como: enjuague bucal, gel, pasta dental, gomas de mascar, barnices, hilos dentales y dispositivos interdenciales y soluciones de irrigación. En la tabla 5 se describe cada una de ellas (Dumitrescu, 2014).

Tabla 5. Comparación de formas farmacéuticas tradicionales utilizadas en terapia periodontal.

Forma farmacéutica	Ventajas	Desventajas
Enjuague bucal	<ul style="list-style-type: none">-Representa un complemento al cepillado diario.-Ayuda a prevenir la caries y gingivitis.-Apoya en la higiene bucal para pacientes física o mentalmente incapacitados.	<ul style="list-style-type: none">-Ofrece poca penetración del fármaco en las encías.-El tiempo de contacto del principio activo y las encías es muy poco, así como su concentración.-Presenta problemas asociados a ciertos fármacos: leucoplaquia asociada con sanguinaria, erosión del esmalte por aceites esenciales y hexetidina.-Toxicidad sistémica y fluorosis por fluoruros.-Irritación de las superficies bucales por etanol.-Tinción de dientes y mucosas por clorhexidina así como descamación de la lengua y alteraciones del gusto.



Tabla 5. Comparación de formas farmacéuticas tradicionales utilizadas en terapia periodontal (continuación).

Forma farmacéutica	Ventajas	Desventajas
Gel	-Debido a su alta viscosidad, ofrece mayor tiempo de retención con el sitio de acción con respecto al enjuague.	-Ha demostrado ser poco efectivo cuando el raspado y alisado radicular no fueron eficientes debido a su limitado acceso al sitio de acción. -En caso de clorhexidina, no elimina la tinción y erosión de mucosas.
Pasta dental	-Minimiza la formación de placa y caries. -Contiene excipientes como abrasivos, surfactantes, humectantes, saborizantes, blanqueadores, refrescantes.	-Presenta baja penetración en la encía, aproximadamente de 0.9 mm. -Pueden desgastar el esmalte de los dientes y los tejidos gingivales gracias a sus abrasivos. -Pueden propiciar la formación de cálculo supragingival.
Gomas de mascar	-Permite la incorporación de numerosos principios activos. -El tiempo de contacto es mayor con respecto al de los enjuagues bucales.	-No elimina los efectos adversos de ciertos fármacos sobre el esmalte y los tejidos gingivales.
Barnices	-Permite una liberación lenta en comparación con otras formas farmacéuticas. -Se puede aplicar fácilmente y directamente sobre el sitio de acción.	-No enmascara efectos adversos del principio activo.
Hilos dentales y dispositivos interdentes	-Facilitan la penetración de otras formas farmacéuticas como enjuagues bucales, geles y pastas dentales.	-Son utilizados por periodos de tiempo limitados lo que limita el tiempo de contacto del fármaco con el sitio de acción. -Ofrecen sólo un soporte mecánico.
Soluciones de irrigación	-Pueden minimizar las acciones de algunas bacterias como auxiliares de otros tratamientos.	-Necesitan administraciones frecuentes para mantener concentraciones efectivas del fármaco. -No permiten ejercer un efecto antiplaca.



3.3.3.2 Formas farmacéuticas de administración local

Con base en los efectos adversos observados con la terapia sistémica, desde la década de 1970 se acordó que estas desventajas podrían ser superadas si los agentes antimicrobianos fueran aplicados localmente, evitando además el hecho de que, como algunos estudios han reportado, se obtienen pobres resultados con antimicrobianos sistémicos porque el principio activo no puede alcanzar una concentración adecuada en el sitio de acción debido a su incapacidad de ser retenido por un periodo prolongado de tiempo. Con un sistema de liberación local, la concentración del fármaco en el tejido blanco puede ser mejorada (Dodwad et al, 2012). Mombelli (2012) reúne las características de la administración sistémica y local de agentes antimicrobianos, las cuales se presentan en la tabla 6:

Tabla 6. Comparación entre terapia antimicrobiana sistémica y local.

Característica	Administración sistémica	Administración local
Distribución del fármaco	Amplia	Limitada a una zona específica
Concentración del fármaco	Niveles variables en diferentes compartimentos corporales	Dosis alta en el sitio de administración, niveles bajos en otras zonas
Potencial terapéutico	Puede actuar contra microorganismos distribuidos en diferentes zonas	Actúa mejor sobre el biofilm bacteriano
Problemas	Efectos sistémicos secundarios	Re-infección de zonas no tratadas
Limitaciones clínicas	Requiere de aceptación por parte del paciente	Requiere que la infección esté limitada a la zona a tratar

Se ha observado que la administración local de antimicrobianos puede aumentar de 1 a 100 veces su concentración con respecto a la administración con formas farmacéuticas convencionales. Esto reduce la dosis de fármaco a administrar, así como la posibilidad de resistencia microbiana en otras partes del organismo.

Se han investigado varios antimicrobianos para la liberación local en el tratamiento de enfermedades periodontales. Estos dispositivos deben poseer una liberación sostenida (mayor a 24 horas) o liberación controlada (más de 24 horas). Los dispositivos más importantes desarrollados en las últimas décadas se muestran en la tabla 7 y la figura 15.

Tabla 7. Principales dispositivos de liberación local utilizados en terapia local para enfermedades periodontales.

Forma farmacéutica	Tipo de liberación	Productos disponibles	Forma farmacéutica
Gel dental de metronidazol	Sostenida	Elyzol® (5%)	Gel biodegradable
Minociclina	Sostenida	Gel de Dentomicina (2%) Arestin® (2%)	Gel biodegradable Mezcla biodegradable en jeringa
Fibra de tetraciclina	Controlada	Actisite® (25% p/v, de clorhidrato de tetraciclina Periodontal plus AB®)	Fibra no reabsorbible Fibra reabsorbible

Tabla 7. Principales dispositivos de liberación local utilizados en terapia local para enfermedades periodontales (continuación).

Forma farmacéutica	Tipo de liberación	Productos disponibles	Forma farmacéutica
Chip de clorhexidina	Controlada	Periochip (2.5 mg)	Dispositivo reabsorbible
		Pericol (2.5 mg)	Gel biodegradable
Polímero de doxiciclina	Controlada	Chlosite (1.5 % CHX)	Gel biodegradable
		Atridox® (10 %)	Polvo biodegradable en jeringa

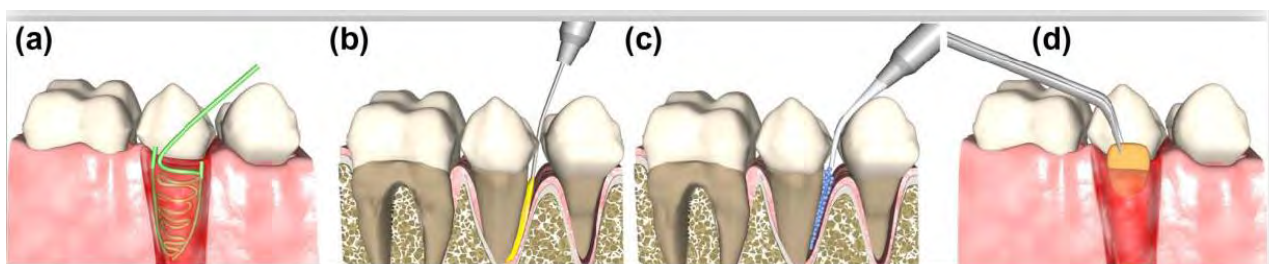


Figura 15. Dispositivos aprobados por la FDA para el tratamiento de enfermedades periodontales a) Actisite® fibras; b) Atridox® gel; c) Arestin™ nanocápsulas y d) PerioChip® chip de gelatina (Tomada de Tabary, 2014).

Sin embargo, un problema que se presenta con éstos dispositivos es la dificultad que existe para colocarlos dentro de las bolsas periodontales. Falta de destreza, poco o nulo conocimiento de la anatomía periodontal y bajo cumplimiento de la terapia por parte de los pacientes son factores que impiden su manejo de manera autónoma por lo que necesitan de la participación del profesional odontólogo para su aplicación (Dodwad et al, 2012).

3.3.3.2.1 Nanotecnología aplicada al tratamiento de enfermedades periodontales

De acuerdo a Dodwad et al (2012), los nanoacarreadores coloidales, como micelas, emulsiones, liposomas y nanopartículas permiten incrementar la especificidad del tratamiento hacia las células y tejidos, incrementando la concentración del fármaco en el sitio de acción y protegiéndolo del ambiente biológico.

Debido a su tamaño, las nanopartículas penetran en regiones que son inaccesibles para otros sistemas farmacéuticos. Además, reducen la frecuencia de administración y ofrecen una distribución uniforme del agente en un periodo largo de tiempo. Desde 1997, Ganem-Quintanar, utilizando microscopía de barrido con focal, establecieron que las nanopartículas biodegradables, cuando son aplicadas en el espacio gingival sulcular porcino, son capaces de penetrar dentro del epitelio de unión entre la encía y el diente (figura 16).

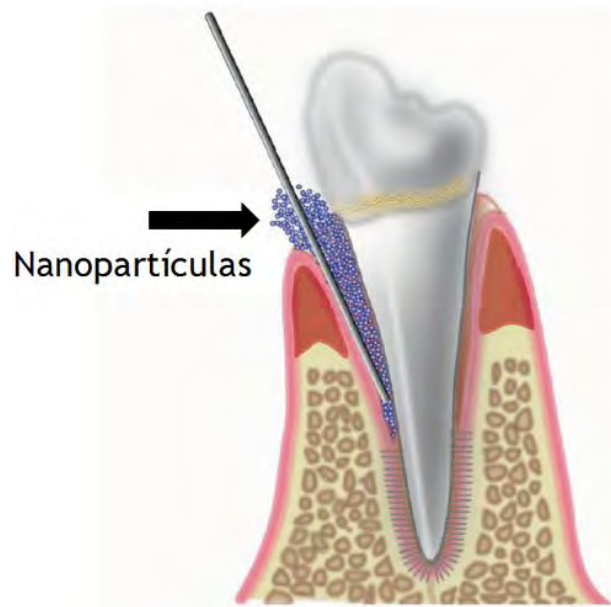


Figura 16. Esquema que representa la penetración de las nanopartículas poliméricas en el epitelio de unión de la encía (Tomada de Piñón-Segundo et al, 2013).

En 2004, Piñón-Segundo llevó a cabo un estudio preliminar *in vivo* en donde se administraron nanopartículas poliméricas de ácido poli-(láctico-co-glicólico) (PLGA) cargadas con triclosán en mandíbula de perro en donde, después de 15 días de la aplicación disminuyeron significativamente los síntomas como inflamación. Las observaciones se presentan en la figura 17.

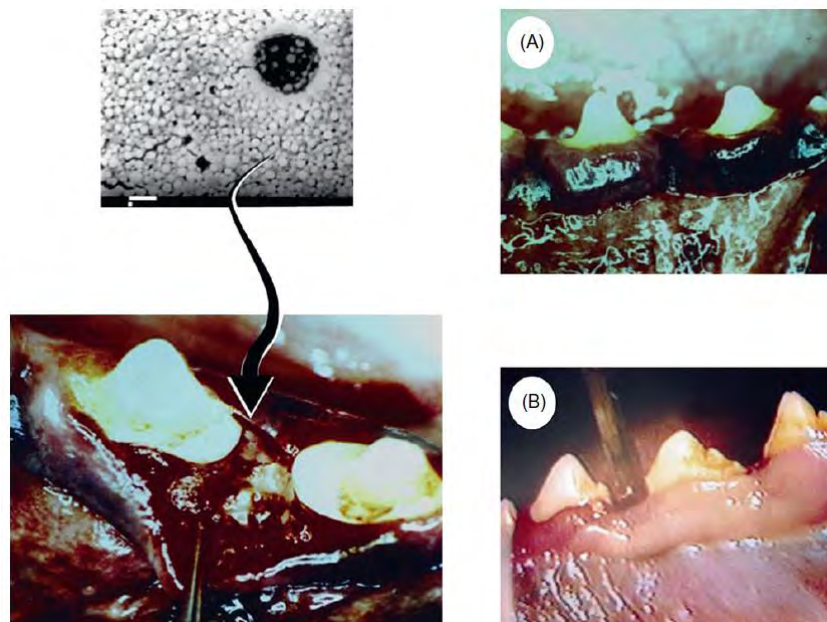


Figura 17. Aplicación de nanopartículas de PLGA-TCS en mandíbula de perro: A) Aspecto después de 8 días; B) Aspecto después de 15 días (Tomada de Piñón-Segundo et al, 2013).

4. Nanopartículas poliméricas

4.1 Definición

De acuerdo a Quintanar-Guerrero (1998) son partículas coloidales sólidas que contienen un principio activo y que son producidas por procedimientos químicos o mecánicos. En términos de tamaño, el límite inferior es de 5-10 nm y el límite superior es de **aproximadamente 1000 nm (1 μ m)**, aunque el rango generalmente obtenido es de 100 a 500 nm.

Fattal y Vauthier (2006) las definieron como partículas coloidales hechas de polímeros biodegradables y no-biodegradables cuyo diámetro es generalmente de alrededor de 200 nm.

Las nanopartículas poliméricas representan una promesa para la liberación de fármacos debido a que funcionan como un acarreador para liberar los principios activos a un sitio específico. Este tipo de sistemas son efectivos para administrar fármacos, proteínas e incluso fragmentos de ADN, direccionándolos a células y órganos específicos. Su tamaño nanométrico promueve la permeación del fármaco a través de las membranas celulares, incrementando la biodisponibilidad del mismo. Algunas más de las ventajas de estos sistemas son:

- Incrementan la estabilidad de cualquier principio activo volátil, además de que se pueden producir fácilmente a gran escala.
- Incrementan significativamente la eficacia y eficiencia de la administración con respecto a vías tradicionales, como la oral e intravenosa.
- Liberan una alta cantidad de fármaco al sitio deseado.
- La selección del polímero y su habilidad para modificar la liberación del fármaco han convertido a estos sistemas en los ideales para terapias para el cáncer, liberación de vacunas, anticonceptivos y liberación direccionada de antibióticos (Nagavarma et al, 2012).

4.2 Clasificación

El término nanopartículas puede usarse como nombre colectivo para describir nanoesferas y nanocápsulas las cuales difieren en su morfología y estructura. Las nanoesferas están formadas por una matriz polimérica densa, mientras que las nanocápsulas se componen de una capa oleosa rodeada de una membrana polimérica (Piñón-Segundo et al, 2013). La figura 18 presenta los dos tipos de partículas.

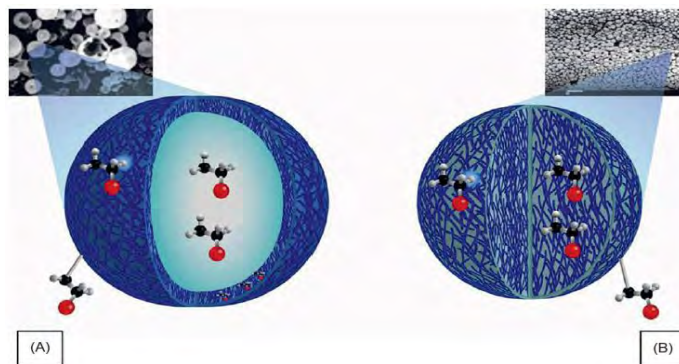


Figura 18. Representación y microfotografías de: A) Nanocápsulas y B) Nanoesferas (Tomada de Piñón-Segundo et al, 2013).

4.3 Formulación de nanopartículas poliméricas

Aunque depende del método de preparación utilizado, comúnmente los elementos empleados en la fabricación de nanopartículas poliméricas por los métodos convencionales incluyen al principio activo, un polímero natural o sintético, estabilizante y solvente orgánico.

4.3.1 Polímeros

En las últimas décadas, los polímeros han sido ampliamente utilizados en la fabricación de nanopartículas farmacéuticas debido a sus propiedades favorables como biocompatibilidad, fácil diseño y preparación, una variedad de estructuras y su comportamiento biomimético en el organismo. Las estructuras poliméricas protegen al principio activo del medio biológico y le proporcionan la posibilidad de direccionamiento así como un aumento en su eficacia y liberación controlada. Existen acarreadores poliméricos de materiales naturales, semi-sintéticos y sintéticos; normalmente se utilizan co-polímeros di-bloque, tri-bloque, multibloque o compuestos ramificados. Así mismo, los polímeros pueden ser clasificados como biodegradables o no biodegradables (Devasier and Sanghyko, 2014).

4.3.1.1 Polímeros biodegradables naturales

Los polímeros biodegradables naturales más comúnmente utilizados en la preparación de nanopartículas poliméricas son:

4.3.1.1.1 Quitosán. **Es un copolímero lineal de β -(1, 4)-D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina** cuya estructura molecular comprende un esqueleto lineal unido a través de enlaces glucosídicos. El grupo amino de éste polisacárido está protonado y con carga positiva en la mayoría de los fluidos biológicos. El quitosán puede encapsular fármacos por diferentes mecanismos incluido entrecruzamiento químico, entrecruzamiento iónico y formación de complejos. El potencial del quitosán en la producción de nano acarreadores ha sido aprovechado para aplicaciones que incluyen inmunización, administración ocular/dérmica, absorción transmucosal oral/nasal de péptidos, liberación de fármacos anti-cáncer, formulación de fármacos de aplicación cerebral y para terapia génica (García-Fuentes y Alonso, 2012). La estructura química de este polímero se presenta en la figura 19.

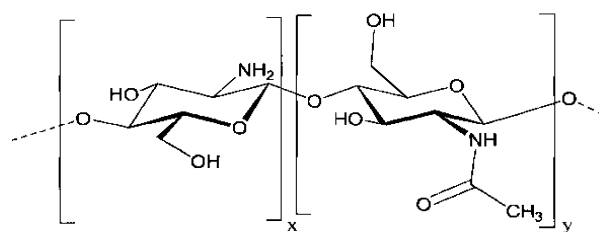


Figura 19. Estructura química del quitosán.

4.3.1.1.2 Alginatos. Son polisacáridos lineales compuestos de cadenas de ácido gulurónico y manurónico. Gracias a las condiciones favorables durante su producción, los acarreadores de estos materiales son ideales para oligonucleótidos, péptidos, proteínas, fármacos hidrofílicos o fármacos que se degradan con solventes orgánicos. Las nanopartículas de alginato se preparan por extrusión de una solución acuosa de alginato de sodio dentro de una solución de un agente catiónico como iones calcio, quitosán o poli-lisina. La figura 20 presenta la estructura de este polímero.

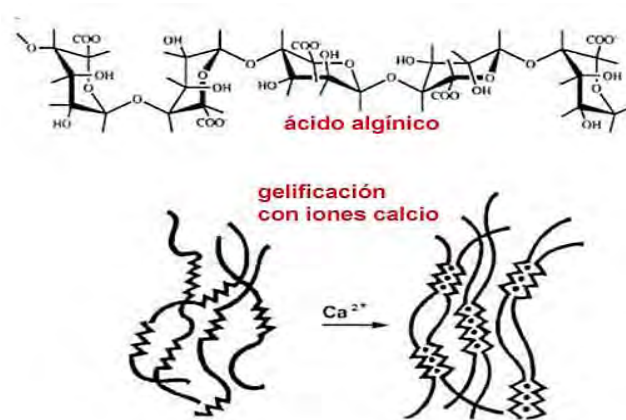


Figura 20. Estructura del ácido alginico y gelificación en presencia de iones calcio.

4.3.1.1.3 Pululano. Similarmente a la dextrosa y celulosa, los glicanos en el pululano son poliscáridos lineales hidrosolubles que consisten en tres moléculas de glucosa unidas por enlaces α -1,4 **polimerizadas por enlaces α -1,6** en la glucosa terminal. Cuando se modifican por acetilación y se convierten en materiales hidrofóbicos, se autoasocian formando nanopartículas con una capa hidrofóbica que permite encapsular fármacos hidrofóbicos (Chakravarthi y Robinson, 2007). Su estructura química se presenta en la figura 21.

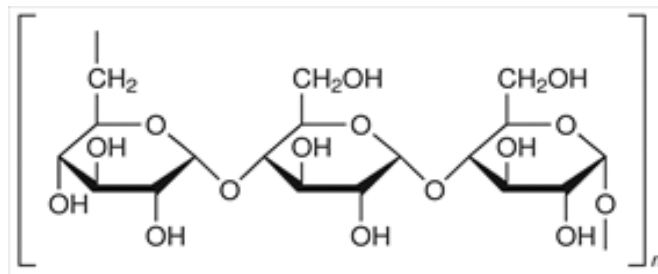


Figura 21. Estructura química del pululano.

4.3.1.2 Polímeros biodegradables sintéticos

Incluyen materiales hidrófobos como los α -hidroxiácidos, los polianhídros, las poliaprolactonas y los policianoacrilatos. Estos polímeros son conocidos también como poliésteres. Los polímeros biodegradables se definen como materiales naturales o sintéticos que pueden degradarse in vivo, a través de enzimas, sin ellas o de ambas maneras para generar productos biocompatibles, toxicológicamente seguros y que pueden ser eliminados por rutas metabólicas normales (Makadia y Siegel, 2011). La importancia de su uso radica en que su degradación genera productos que pueden ser absorbidos por las células de los tejidos sin riesgos para la salud.

Algunos de los polímeros sintéticos biodegradables más utilizados para preparar nanopartículas poliméricas son los siguientes:

4.3.1.2.1 Ácido poli-láctico (PLA). Es un polímero de ácido láctico biocompatible y biodegradable que sufre escisión por hidrólisis en el organismo para formar monómeros de ácido

láctico como intermediario natural del metabolismo de los carbohidratos (Kumar, Kumari y Yadav, 2010). En la figura 22 se muestra la estructura química de este polímero.

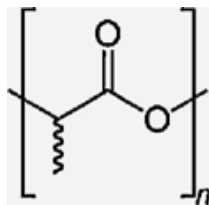


Figura 22. Estructura del ácido poli-láctico.

4.3.1.2.2 Ácido poli-(láctico-co-glicólico) (PLGA). Es un poliéster copolímero de ácido poli-láctico (PLA) y ácido poli-glicólico (PGA). Es el mejor biomaterial disponible para la liberación de fármacos gracias a su desempeño. El ácido poli-láctico **contiene un átomo de carbono α** asimétrico el cual es típicamente descrito como D o L en términos de estereoquímica clásica o como R o S. Sus enantiómeros son el ácido-D-poli-láctico (PDLA) y el ácido-L-poli-láctico. PLGA es generalmente un acrónimo para el ácido-D, L-láctico-co-glicólico donde las formas D y L están en igual proporción (figura 23).

El ácido poli(láctico-co-glicólico) es uno de los polímeros biodegradables más exitosos gracias a que por hidrólisis se descompone en dos monómeros, ácido láctico y ácido glicólico (figura 24). Gracias a que estos dos metabolitos son endógenos y fácilmente metabolizados por el ciclo de Krebs, existe una mínima toxicidad asociada al uso de PLGA (Makadia y Siegel, 2011; Kumar, Kumari y Yadav, 2010).

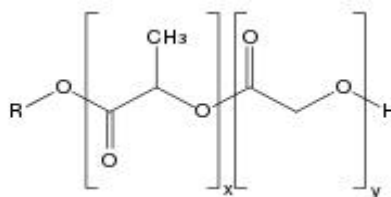


Figura 23. Estructura del PLGA. “x” representa las unidades de ácido láctico y “y” las de ácido glicólico (Tomada de Makadia y Siegel, 2011).

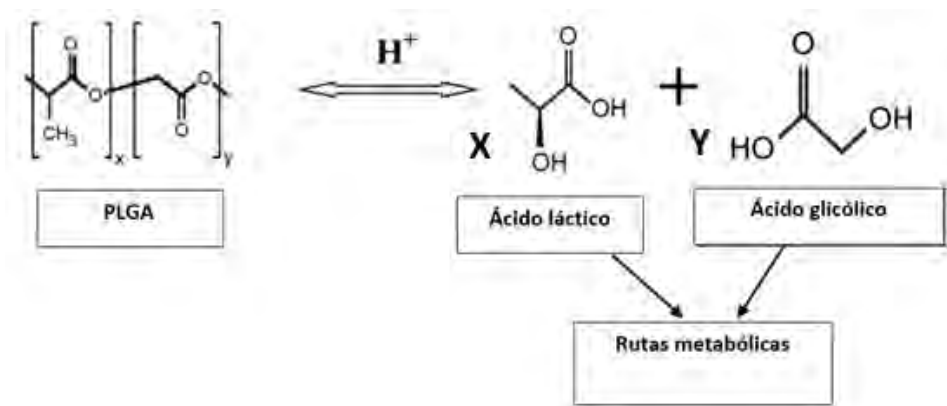


Figura 24. Hidrólisis del PLGA (Modificada de Kumar, Kumari y Yadav, 2010).

4.3.1.2.3 Poli-(ϵ -caprolactona) (PCL). Es un poliéster simple, lineal y alifático **formado por la apertura del anillo de la ϵ -caprolactona**. Como polímero tiene una estructura regular y es cristizable, La PCL cristaliza en aproximadamente un 50% de esferulitos.

La PCL es degradada por hidrólisis de su enlace éster en condiciones fisiológicas y ha recibido por lo tanto especial atención para la preparación de dispositivos de larga duración debido a que su degradación es más lenta que la del PLGA. De los estudios de degradación se ha concluido que la degradación de éste polímero presenta dos etapas: primera, la hidrólisis no enzimática de los grupos éster y la segunda, que sucede bajo degradación intracelular en fagosomas, macrófagos o fibroblastos (figura 25). En el organismo, el ciclo de vida del polímero se ha definido en cinco etapas: hidratación, hidratación-degradación, degradación con pérdida de masa, reabsorción y metabolización. Lo anterior permite decir que se trata también de un material reabsorbible (Ann y Werner, 2010).

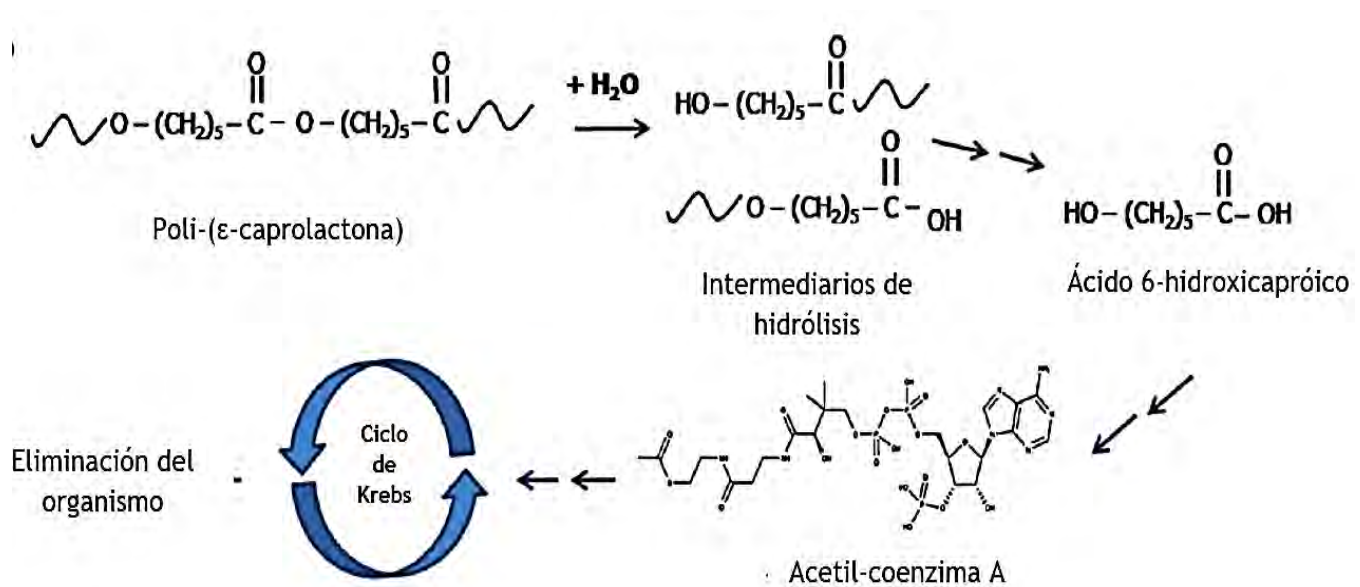


Figura 25. Degradación de la PCL: vía hidrólisis con intermediarios ácido-6-hidroxicapróico y acetil coenzima A (Modificada de Ann y Werner, 2010).

4.4 Métodos de preparación de nanopartículas poliméricas

Existen numerosos métodos para fabricar nanopartículas poliméricas y la selección de uno de estos depende de las propiedades físicas y químicas tanto del polímero como del o los fármacos a encapsular. La mayoría de las técnicas involucran diferentes aspectos como el uso de solventes orgánicos, modificación de la temperatura, ultrasonificación y agitación mecánica. Para la formación de las partículas, generalmente se pueden emplear técnicas que incluyen polimerización o su obtención a partir de polímeros preformados (Devasier y Sanghyo, 2014; Nagavarma et al, 2012).

Con respecto a los métodos de polimerización, se deben seleccionar las condiciones adecuadas para la formación del polímero, tales como los iniciadores, catalizadores y monómeros de tal manera que las partículas cumplan con las características deseadas. Los principales métodos que involucran polimerización se indican a continuación:



- a) Emulsión
- b) Miniemulsión
- c) Microemulsión
- d) Polimerización interfacial
- e) Polimerización controlada/en tiempo real por radicales (Controlled/Living Radical Polymerization, C/LRP) (Nagavarma et al, 2012).

Sin embargo, existen varias desventajas en estas técnicas las cuales incluyen factores nocivos como productos tóxicos, residuos reactivos, monómeros sin reaccionar y la formación de oligómeros. Por esto, se prefiere emplear técnicas basadas en polímeros preformados, para los cuales se opta por los biodegradables (Devasier y Sanghyo, 2014).

Las técnicas más utilizadas para elaborar nanopartículas poliméricas obtenidas a partir de polímeros preformados se enlistan a continuación:

- a) Emulsificación- evaporación
- b) Doble emulsificación
- c) Desplazamiento de solvente
- d) **Inmiscibilidad por soluciones salinas (“Salting out”)**
- e) Emulsificación-difusión
- f) Diálisis
- g) Gelificación iónica
- h) Tecnología de fluidos supercríticos
- i) Secado por aspersión

4.4.1 Emulsificación- evaporación

Fue el primer método utilizado en la preparación de nanopartículas poliméricas. En éste método, las soluciones poliméricas se preparan en solventes volátiles e inmiscibles con agua y se forman emulsiones. Anteriormente, el diclorometano y cloroformo eran los solventes más utilizados pero ahora se han desarrollado técnicas remplazándolos por acetato de etilo el cual tiene un perfil toxicológico más aceptable.

El método de emulsificación- evaporación involucra dos pasos: el primero implica la emulsificación de una solución orgánica que contiene el fármaco y el polímero en una fase acuosa que contiene un estabilizante mientras que en el segundo se induce la precipitación del polímero en forma de nanoesferas debido a la evaporación del solvente. En este método se utiliza homogeneización a altas velocidades seguidas de evaporación del solvente ya sea por agitación continua o a presión reducida (figura 26). Al finalizar el proceso, las nanopartículas se colectan por centrifugación y son lavadas con agua desionizada para eliminar los residuos de estabilizante para después someterse a liofilización.

El tamaño de partícula puede controlarse ajustando la velocidad de agitación, tipo y cantidad de agente dispersante, viscosidad de la fase orgánica y la fase acuosa y la temperatura. Sin embargo, éste método puede ser aplicado para el encapsulamiento de fármacos liposolubles y una de sus limitaciones es el escalamiento. Los polímeros utilizados son el ácido poli-(láctico) (PLA), ácido poli-(láctico-co-glicólico) (PLGA), acetato-ftalato de celulosa (CAP), poli-(ϵ -caprolactona) (PCL) y poli-(β -hidroxibutirato) (PHB) (Nagavarma et al, 2012; Lal Pal et al, 2011).

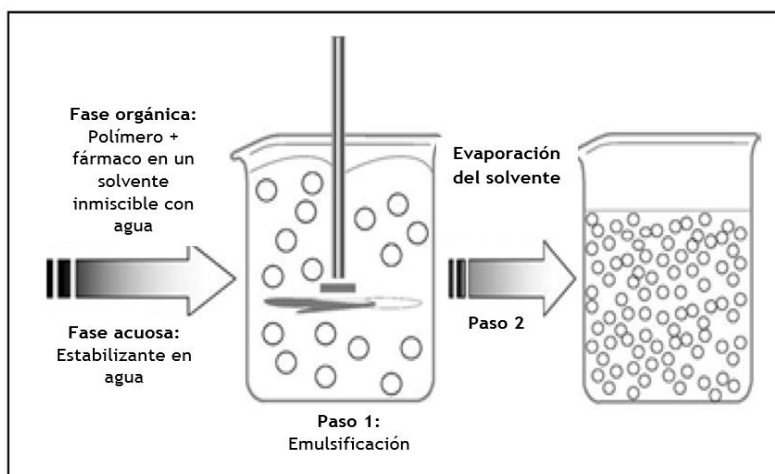


Figura 26. Preparación de nanopartículas poliméricas por el método de emulsificación-evaporación (Modificada de Nagavarma et al, 2012).

4.4.2 Doble emulsificación

El método de emulsificación-evaporación presenta la limitante del bajo encapsulamiento de fármacos hidrofílicos. Por lo tanto, para encapsular este tipo de fármacos se utiliza la técnica de doble emulsión la cual involucra la adición de soluciones acuosas de fármaco a la solución orgánica de polímero bajo agitación vigorosa para formar emulsiones agua en aceite (W/O). Esta primera emulsión es entonces añadida en una segunda fase acuosa con agitación continua para formar la emulsión agua/aceite/agua (W/O/W). La emulsión se somete entonces a la eliminación del solvente orgánico bajo evaporación y las nanopartículas pueden ser aisladas por centrifugación a altas velocidades. En éste método, la cantidad de fármaco hidrofílico a incorporar, la proporción de polímero y el volumen de fase acuosa son variables que pueden afectar la caracterización de las nanopartículas (Lal Pal et al, 2011).

Pattnaik et al (2012) señalaron que para la emulsión primaria, la fase orgánica puede ser total o parcialmente soluble en agua y que puede contener además un surfactante agua en aceite (W/O). Además, se ha señalado que el encapsulamiento y el tamaño de partícula se ven afectados por cambios en el tipo y concentración tanto del agente surfactante y el estabilizante.

4.4.3 Desplazamiento de solvente

Este método involucra la precipitación del polímero preformado desde una solución orgánica y la difusión del solvente orgánico en un medio acuoso en presencia de un estabilizante. El polímero, el fármaco y/o un surfactante lipofílico se disuelven en un solvente semipolar y miscible con agua como acetona o etanol. La solución es entonces inyectada en la solución acuosa que contiene el estabilizante bajo agitación mecánica. Las nanopartículas se forman instantáneamente debido a la rápida difusión del solvente. El solvente es entonces eliminado a presión reducida (La Pal et al, 2011). El proceso se muestra en la figura 27.

Nagavarma et al (2012) indican que la técnica de desplazamiento de solvente permite la preparación de nanocápsulas cuando se incorpora un pequeño volumen de un aceite no tóxico en la fase orgánica. Considerando el núcleo oleoso de las nanocápsulas, se han reportado altas eficiencias de encapsulamiento para fármacos lipofílicos.

El uso de ésta técnica simple en comparación con las otras reportadas está limitada a solventes miscibles con agua, con los cuales la velocidad de difusión es suficiente para producir emulsificación espontánea. Además, éste método es básicamente aplicable a fármacos lipofílicos debido a la miscibilidad del solvente con la fase acuosa y no es eficaz para encapsular fármacos hidrofílicos. Se han empleado polímeros como PLGA, PLA, PCL y poli-(metil vinil anhídrido éter-co-maléico) (PVM/MA) (Nagavarma et al, 2012).

García (2011) indicó que debido a que el encapsulamiento se limita a fármacos muy solubles en solventes polares pero ligeramente solubles en agua una de las principales limitantes es la difícil selección del sistema polímero/fármaco/solvente, lo cual debe optimizarse para lograr buenas eficiencias de encapsulamiento así como rendimientos del proceso.

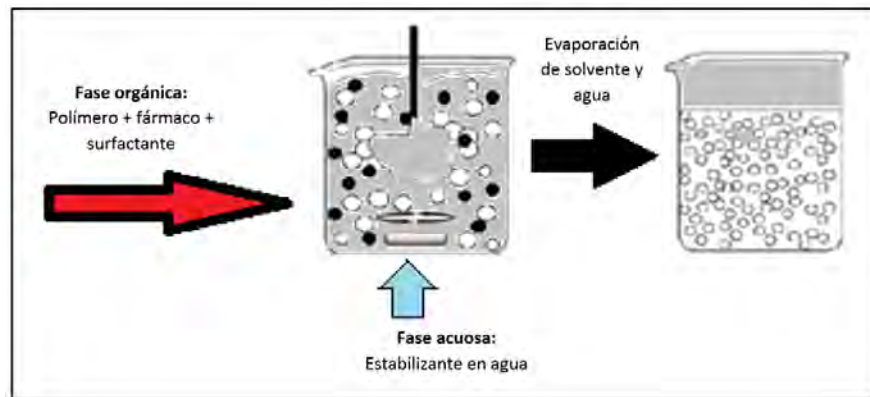


Figura 27. Preparación de nanopartículas poliméricas por el método de desplazamiento de solvente (Modificada de Nagavarma et al, 2012).

4.4.4 Inmiscibilidad por soluciones salinas o “salting-out”

La mayoría de los métodos basados en emulsificación requieren del uso de solventes orgánicos, los cuales pueden considerarse peligrosos para el medio ambiente y para los sistemas biológicos cuando están presentes en ciertas concentraciones. Para superar ésta desventaja, Bindschaelder et al fueron los primeros en proponer una versión modificada en donde la emulsificación incluye una etapa de precipitación debida a inmiscibilidad por soluciones salinas, la cual evita el uso de surfactantes y solventes clorados (Prasad y Geckeler, 2011).

De acuerdo a Nagavarma et al (2012), éste método está basado en la separación de un solvente **miscible con agua gracias al efecto “salting-out”**. El polímero y el fármaco se disuelven inicialmente en un solvente como acetona, el cual es emulsificado en un gel acuoso que contiene el agente **“salting-out” que puede ser un electrolito como cloruro de magnesio, cloruro de calcio acetato de magnesio o un no-electrolito como sucrosa**; el gel contiene además un estabilizante como polivinipirrolidona o hidroxietilcelulosa. Esta emulsión aceite en agua se diluye con suficiente volumen de agua para asegurar la difusión del solvente en la fase acuosa lo cual induce la precipitación de las nanoesferas (figura 28).

La selección del agente **“salting-out”** es un factor crítico del proceso ya que éste puede jugar un papel vital en la eficiencia de encapsulamiento. Su principal ventaja es que éste proceso minimiza el estrés en el encapsulamiento de proteínas. Además, éste método no requiere de un aumento de temperatura en el proceso lo cual beneficia el encapsulamiento de sustancias termolábiles.

Sus grandes desventajas son que es un método aplicable únicamente para encapsular fármacos lipofílicos e involucra numerosos pasos de lavado para remover los agentes “salting-out”.

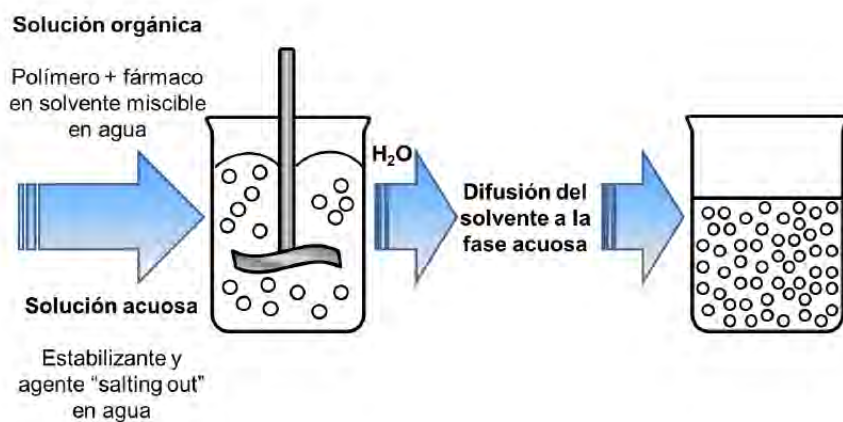


Figura 28. **Preparación de nanopartículas poliméricas por el método de “Salting-out”**
(Modificada de Nagavarma et al, 2012).

4.4.5 Emulsificación-difusión

Nagavarma et al (2012) mencionan a éste método como una modificación del de emulsificación- evaporación en donde se pueden utilizar solventes orgánicos parcialmente miscibles con agua pertenecientes a la clase 3 de la guía ICH. García (2011) indica que podría considerarse también **como una modificación al método de “salting-out” pero suprimiendo el uso de sales y por lo tanto evitando prolongadas etapas de purificación.**

En éste método, se saturan mutuamente la fase orgánica y la acuosa para asegurar el equilibrio termodinámico de ambos líquidos. Posteriormente, el polímero formador de nanopartículas junto con el fármaco se disuelve en la fase orgánica saturada para ser emulsificada a altas velocidades en la fase acuosa que contiene el estabilizante. Para producir la precipitación del polímero con la consecuente formación de las nanopartículas es necesario promover la difusión del solvente orgánico por dilución con un exceso de agua, provocando la difusión del solvente orgánico a la fase externa formando nanocápsulas o nanoesferas, de acuerdo a la proporción del polímero en la fase oleosa. Finalmente, el solvente es evaporado.

Ésta técnica presente varias ventajas tales como altas eficiencias de encapsulamiento (generalmente, mayores al 70%), reproducibilidad lote a lote, facilidad de escalamiento, simplicidad y distribución de tamaño de partícula uniforme. Sus desventajas son que, como otros métodos de preparación, sólo es eficiente para encapsular fármacos hidrofóbicos así como el hecho de que se requieren grandes volúmenes de agua lo cual implica mucho tiempo invertido en su eliminación (Nagavarma et al, 2012).

4.4.6 Diálisis

En éste método el polímero es disuelto en un solvente orgánico y colocado dentro de un tubo de diálisis con un apropiado peso molecular. La diálisis se lleva a cabo contra el flujo de un líquido inmisible con el solvente orgánico. El desplazamiento del solvente dentro de la membrana es



seguido por una progresiva agregación del polímero debido a la pérdida de solubilidad y la formación de una suspensión homogénea de nanopartículas (Nagavarma et al, 2012).

4.4.7 Gelificación iónica

La obtención de nanopartículas desde una solución polimérica a través de un proceso de gelificación ha sido descrita en función de la formación de un gel por ciertas interacciones físicas. Los polímeros utilizados en éste método son normalmente polisacáridos con carga electrostática disueltos en bajas concentraciones en un solvente acuoso. La adición de una pequeña molécula conduce a la formación de nanopartículas de gel a través de una gelificación iónica. La poli-lisina fue utilizada como polímero en los primeros desarrollos aunque recientemente el quitosán está presente en numerosos estudios. Así mismo se ha utilizado el alginato de sodio con iones calcio encapsulando oligonucleótidos lo cual protege al fármaco de las nucleasas (Vauthier y Kawthar, 2011).

4.4.8 Tecnología de fluidos supercríticos

La mayoría de los métodos tradicionales involucran el uso de solventes orgánicos y la necesidad de desarrollar procesos más seguros para el medio ambiente ha motivado la investigación de los fluidos supercríticos con solventes compatibles con el medio ambiente con el potencial de desarrollar nanopartículas con alta pureza y con ninguna traza de solvente. El uso de fluidos supercríticos y gases de alta densidad ofrecen una mejora en las técnicas tradicionales. Se han desarrollado dos principales procesos para la producción de nanopartículas por éstos métodos:

- Expansión rápida de solución supercrítica (RESS): en éste método, el polímero se disuelve en una gas como CO_2 a temperatura ambiente para ser calentado isobáricamente a la temperatura de pre-expansión. La solución supercrítica se libera por una boquilla a la presión ambiental.
- Expansión rápida de una solución supercrítica en un solvente líquido: la modificación de éste método con respecto al anterior consiste en la expansión de la solución supercrítica en un líquido en vez de aire. El polímero se disuelve normalmente en CO_2 y la solución supercrítica se expande en agua (Prasad y Geckeler, 2011).

4.4.9 Secado por aspersion

El secado por aspersion es una técnica basada en la transformación de un fluido a un mediante atomización en un gas de secado caliente que es generalmente aire. El proceso consiste en cuatro etapas: i) atomización del líquido, ii) introducción del aerosol dentro del aire de secado, iii) formación de las partículas sólidas y iv) separación y recolección del producto seco. Los fluidos que se introducen en el proceso pueden ser soluciones, suspensiones, emulsiones, pastas o extrusiones.

De manera general, ésta técnica es atractiva a nivel laboratorio como nivel industrial ya que es rápida, continua, reproducible, de una sola etapa y, por lo tanto, escalable sin mayores modificaciones. Otra de sus ventajas es que permite formular fármacos termosensibles sin provocar degradación. Las variables que afectan las características del producto y pueden ser modificadas son i) los parámetros de proceso, ii) las propiedades del líquido de alimentación y iii) el diseño del equipo (Sosnik y Seremeta, 2015).

4.5 Caracterización de nanopartículas poliméricas

La importancia de las técnicas de caracterización de nanopartículas poliméricas radica en la necesidad de adecuar la formulación a una aplicación terapéutica específica. El tamaño de partícula y su distribución, la morfología, las propiedades de superficie, la eficiencia de encapsulamiento, el contenido de principio activo y el perfil de liberación del fármaco encapsulado son los principales parámetros que deben ser caracterizados una vez obtenidas las nanopartículas (Rocha et al, 2009).

4.5.1 Tamaño de partícula y morfología

La distribución de tamaño de partícula y su morfología son los parámetros más importantes de la caracterización de nanopartículas. El tamaño puede ser determinado por diferentes técnicas, de acuerdo con el diámetro aproximado de las nanopartículas. La dispersión de luz dinámica es ampliamente usada para determinar el tamaño de las nanopartículas con base a su movimiento browniano en suspensiones coloidales en el rango nanométrico. Colocando luz monocromática (láser) dentro de una solución de partículas esféricas con movimiento browniano causa un efecto Doppler cuando la luz choca con la partícula en movimiento, cambiando la longitud de onda de la luz entrante. Este cambio está relacionado con el tamaño de la partícula (Nagavarma et al, 2012).

En particular, la microscopía electrónica de barrido (MEB), además de confirmar el tamaño, permite estudiar la morfología de las nanopartículas a la vez que da una idea de la distribución del principio activo incluido en el sistema submicrónico.

4.5.2 Potencial zeta

La naturaleza e intensidad de la carga superficial de las nanopartículas es muy importante ya que determina su interacción con el entorno biológico así como su interacción electrostática con compuestos biológicamente activos. La estabilidad coloidal se analiza a través del potencial zeta, el cual es a menudo el único parámetro disponible para la caracterización de las propiedades de la doble capa (Honary y Zahir, 2013). En la figura 29 se representa este fenómeno.

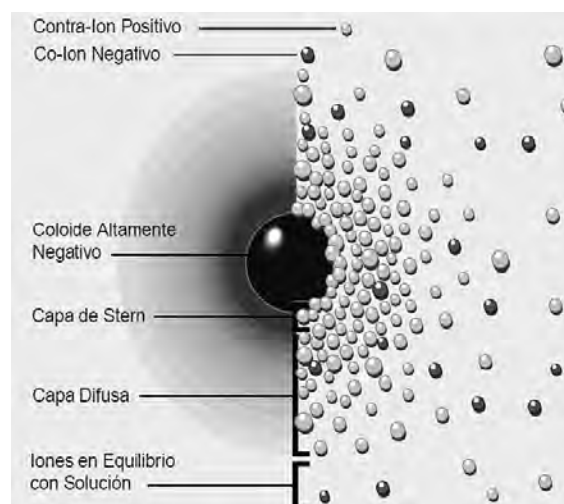


Figura 29. Representación del potencial zeta de un coloide con carga superficial negativa (Modificada de Honary y Zahir, 2013).



En general, valores de potencial zeta por encima de 30 mV (positivos o negativos) permiten una mayor estabilidad de la nanosuspensión debido a que la repulsión entre partículas previene la agregación. El potencial zeta puede ser también utilizado como indicativo de si el fármaco se encuentra encapsulado en el centro de la nanopartícula o adsorbido en la superficie. (Kharia et al, 2014).

4.5.3 Eficiencia de encapsulamiento

La eficiencia de encapsulamiento (expresada normalmente en porcentaje, %) es la relación entre la cantidad encapsulada de fármaco y la cantidad total del mismo añadido en la preparación. El contenido de principio activo revela la cantidad real del fármaco encapsulado por unidad de masa del polímero o de la mezcla polimérica empleada en la formulación. Los procedimientos empleados para la determinación de la eficiencia de encapsulamiento y del contenido de principio activo dependerán del polímero utilizado y del fármaco encapsulado. En general, el contenido de principio activo de determina tras la disolución de las nanopartículas en un disolvente apropiado seguido de ultra centrifugación o ultrafiltración de las mismas. El fármaco se cuantifica empelando distintos métodos analíticos, dependiendo de su naturaleza (Rocha et al, 2009).

4.5.4 Porcentaje de estabilizante residual

El estabilizante residual se refiere a la cantidad de estabilizante que permanece asociado a las nanopartículas incluso después del proceso de purificación (Galindo-Rodríguez et al, 2004). La importancia de cuantificarlo radica en que, debido a que se adsorbe sobre la superficie de las nanopartículas durante el proceso de obtención se requiere introducir el factor de corrección $1/(1 - \text{fracción de PVAL residual})$ para evitar una sobreestimación de la eficiencia de encapsulamiento (García, 2011).

4.5.5 Caracterización morfológica

El análisis por calorimetría diferencial de barrido permite investigar el estado físico del fármaco dentro de las nanopartículas y una posible interacción entre fármaco-polímero ya que estos aspectos pueden influir en las características de liberación del fármaco. Ésta técnica permite analizar modificaciones en algunas propiedades del polímero empleado en la formulación así como del fármaco tales como su temperatura de transición vítrea (T_g), punto de fusión o cambios polimórficos. Así mismo, se proporcionan datos cuantitativos precisos de temperaturas y flujos de calor asociados con las transiciones de fases de la materia como cristalización, fusión y evaporación, o reacciones químicas como hidrólisis y oxidación.

Los resultados obtenidos por DSC y su interpretación pueden ser corroborados por el análisis de la forma (cristalina o amorfa) y del grado de cristalinidad del polímero y del fármaco en capsulado mediante técnicas de difracción de rayos X (Azevedo y Ricci-Junior, 2011; Rocha et al, 2009).

4.5.6 Liberación *in vitro*

Como todos los sistemas farmacéuticos, la calidad y desempeño de las nanopartículas poliméricas debe ser evaluada a través de varios métodos *in vivo* e *in vitro*. Al respecto, la cinética de liberación provee información crítica acerca de la dosificación y es un parámetro clave usado para asegurar la seguridad del producto y su eficacia. Actualmente, la liberación *in vitro* se utiliza comúnmente



como un predictor del comportamiento *in vivo*, además de que permite establecer el comportamiento del producto durante las diferentes etapas de desarrollo y su ciclo de vida.

A pesar de los avances en el desarrollo de sistemas nanoparticulados, no existe un parámetro regulatorio o de compendio para las pruebas de liberación *in vitro* de estos sistemas. Sin embargo, en la mayoría de los trabajos se han utilizado principalmente la técnica de muestreo y separación, flujo continuo y el método de diálisis (D´Souza, 2014).

5. Laminillas orodispersables

5.1 Definición

De acuerdo a la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (2009), una laminilla es una película constituida de polímeros naturales o sintéticos, que contiene el o los fármacos y aditivos, destinada a ser disuelta en la boca.

Saraswathi y Sai (2015) indican que las laminillas orodispersables consisten en una película delgada de aplicación oral, que debe ser colocada en la lengua del paciente o sobre cualquier otra mucosa, la cual cuando se moja con la saliva se desintegra rápidamente y se adhiere al sitio de aplicación.

Prasanna et al (2013) indicaron también que una laminilla orodispersable de aplicación bucal consiste en una forma farmacéutica sólida que se disuelve o desintegra rápidamente en la cavidad oral, resultando en una solución o suspensión de fármaco sin necesidad de la administración de agua.

5.2 Clasificación

Bala et al (2013) mencionan que existen tres tipos de laminillas orodispersables:

- a) Laminillas de liberación inmediata
- b) Laminillas mucoadhesivas de dispersión por disolución
- c) Laminillas mucoadhesivas de liberación sostenida

En la tabla 8 se dan las características más importantes de cada tipo.

Tabla 8. Tipos de laminillas orodispersables y sus características.

Propiedades	Laminillas de liberación inmediata	Laminillas mucoadhesivas de dispersión por disolución	Laminillas mucoadhesivas de liberación sostenida
Área (cm ²)	2-8	2-7	2-4
Espesor (µm)	20-70	50-500	50-250
Estructura	Monocapa	Monocapa o multicapa	Sistema multicapa



Tabla 8. Tipos de laminillas orodispersables y sus características (continuación).

Propiedades	Laminillas de liberación inmediata	Laminillas mucoadhesivas de dispersión por disolución	Laminillas mucoadhesivas de liberación sostenida
Excipientes	Polímeros hidrofílicos hidrosolubles	Polímeros hidrofílicos hidrosolubles	Polímeros de baja o nula solubilidad en agua
Estado físico del fármaco	Solución sólida	Solución sólida o fármaco suspendido	Suspensión y/o solución sólida
Zona de aplicación	Lengua (paladar superior)	Región gingival o bucal	Región gingival
Tiempo de disolución	60 s	En pocos minutos, formando un gel	Máximo de 8 a 10 horas
Tipo de efecto	Sistémico o local	Sistémico o local	Sistémico o local

5.3 Formulación

Las laminillas orodispersables consisten en películas con un área de 1 a 20 cm² (dependiendo de la dosis y el fármaco cargado) que contiene al fármaco. Los fármacos pueden ser cargados en una dosis por encima de una dosis unitaria de 30 mg. En la siguiente tabla se enlista la composición estándar de una laminilla dispersable junto con varios excipientes utilizados en su formulación.

Tabla 9. Composición promedio de una laminilla orodispersable.

Ingrediente	Proporción	Ejemplos
Fármaco	5-30 % p/p	Antialérgicos, antieméticos, antiepilépticos, antisépticos, etc.
Filmógeno	45 % p/p	HPMC E3, E5 y E15 y K-3, Metilcelulosa A-3, A-6 y A-15, Pululano, carboximetilcelulosa cokol 30, polivinilpirrolidona PVP K-90, pectina, gelatina, alginato de sodio, hidroxipropilcelulosa, alcohol polivinílico, maltodextrinas



Tabla 9. Composición promedio de una laminilla orodispersable (continuación).

Ingrediente	Proporción	Ejemplos
Plastificantes	0-20 % p/p	Glicerol, ftalato de dibutilo, polietilenglicol, propilenglicol, etc.
Surfactantes	Cuanto se requiera	Lauril sulfato de sodio, cloruro de benzalconio, polisorbatos, etc.
Endulzantes	3-6 % p/p	Sacarina, ciclamato y aspartame.
Agentes estimulantes de saliva	2-6 % p/p	Ácido cítrico, ácido málico, y ácido ascórbico
Espesantes, colorantes, saborizantes	Cuanto se requiera	Sustancias aprobadas por la FDA

A continuación, se presenta una breve descripción de los ingredientes presentes en la formulación de una laminilla.

5.3.1 Principio activo

Varias clases de fármacos pueden ser incorporadas en laminillas orodispersables, por ejemplo, antihistamínicos, antidiarreicos, antidepresivos, vasodilatadores, antiasmáticos, antieméticos, etc. Algunos principios activos que se han incorporado en estas formas farmacéuticas se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Principios activos que han sido incorporados en laminillas orodispersables.

Fármaco	Clasificación farmacológica	Dosis (mg)
Salbutamol	Antiasmático	4
Levocetirizina	Antihistamínico	75
Clorhexidina	Antiséptico	12
Ondesterona	Antiemético	2.5
Loratadina	Antihistamínico	10
Nicotina	Terapia anti-tabaquismo	2

Cabe mencionar que existen ciertas características deseables en un fármaco a formular en laminillas orodispersables como:

- Debe tener sabor agradable
- La dosis debe ser menor a 40 mg
- Debe tener tamaño y peso molecular bajos
- Debe tener buena estabilidad y solubilidad tanto en agua como en saliva



e) Debe estar parcialmente ionizado al pH de la cavidad oral (Bhupinder et al, 2011).

5.3.2 Filmógenos

Constituyen alrededor del 45 % p/p del peso total de la laminilla seca, sin embargo, esta proporción puede ser aumentada a 60-65 % p/p. Algunas de sus propiedades deseables son que no cause irritación, que no dificulte la desintegración, que tenga buenas propiedades de dispersión, que posea buenas propiedades mecánicas y que no sea tóxico.

La HPMC es de los mejores filmógenos y se pueden utilizar diferentes grados como Methocel E3, Metocel E5, Methocel E15 Premium LV, etc.

5.3.3 Plastificantes

En general, las propiedades mecánicas como resistencia a la ruptura y porcentaje de elongación se ven mejoradas por la adición de un plastificante a las formulaciones. La concentración de plastificante usualmente varía entre el 0 % y 20 % p/p. Algunos ejemplos de plastificantes son PEG, glicerol, dietilftalato, trietilcitrato, tributilcitrato, etc.

5.3.4 Surfactantes

Los surfactantes juegan un rol vital como dispersantes, agentes de mojado y para solubilización por lo que mejoran la desintegración en segundos liberando el fármaco rápidamente. Los surfactantes comúnmente utilizados son el cloruro de benzalconio, polisorbatos y lauril sulfato de sodio. Regularmente, el poloxámero 407 se utiliza debido a que presenta varias ventajas.

5.3.5 Endulzantes

Los endulzantes son diseñados para desintegrarse o disolverse dentro de la cavidad oral, Se pueden utilizar agentes de origen natural o artificial. Generalmente se usan en una proporción del 3 al 6% solos o combinados. Polialcoholes como sorbitol, manitol e isomaltosa pueden usarse combinados y proveen una sensación de frescura. Los endulzantes naturales deben restringirse en pacientes diabéticos o con dieta baja en calorías por eso se emplean endulzantes artificiales como sacarina, ciclamato y aspartame componen la primera generación de endulzantes, seguidos por acesulfame-K, sucralosa, alitame y neotame que conforman la segunda generación. El acesulfame-K y sucralosa tienen más de 200 a 600 veces el poder endulzante. Neotame y alitame tienen más de 2000 a 8000 poder endulzante que la sucrosa.

5.3.6 Agentes estimulantes de saliva

Su propósito es aumentar la cantidad de saliva que ayude a acelerar la desintegración de la laminilla. Generalmente se usan ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico, ácido ascórbico y ácido tartárico. Se usan solos o en combinación del 2 al 6% p/p.

5.3.7 Saborizantes

Los saborizantes son necesarios para enmascarar los sabores desagradables del fármaco incorporado. La cantidad incorporada depende de su naturaleza y fuerza. Cualquier ingrediente aprobado por la FDA puede ser utilizado como sabores dulces, agridulces y sabor a menta. En un trabajo de investigación se verificó que una mezcla de menta, regaliz y sucralosa enmascararon

apropiadamente el sabor amargo del diclofenaco sódico. Normalmente se utilizan lenguas electrónicas para evaluar el efecto de enmascaramiento de diferentes agentes (Irfan et al, 2015).

5.3.8 Colorantes

Se utilizan pigmentos como colorantes. El óxido de titanio es el más ampliamente usado en formas farmacéuticas orales de rápida disolución y otras preparaciones farmacéuticas. Además del óxido de titanio, una amplia cantidad de colores están disponibles (Irfan et al, 2015).

5.3.9 Agentes mucoadhesivos

Uno de los factores a considerar en la formulación óptima de laminillas orodispersables son las propiedades mucoadhesivas y se han hecho varias propuestas para mejorar este aspecto de las formas farmacéuticas. Muchos de los polímeros usados son predominantemente hidrofílicos los cuales se hinchan al contacto con agua y permiten interacciones entre las cadenas poliméricas y la mucina de la mucosa bucal. Algunos ejemplos de estos polímeros hinchables incluyen hidroxipropilcelulosa (HPC), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxietilcelulosa (HEC), carboximetilcelulosa sódica (CMCS), polivinilpirrolidona (PVP) y quitosán (Morales y McConville, 2011).

5.4 Métodos de preparación de laminillas orodispersables

Existen diferentes métodos para la preparación de laminillas orodispersables los cuales se resumen en la figura 30:

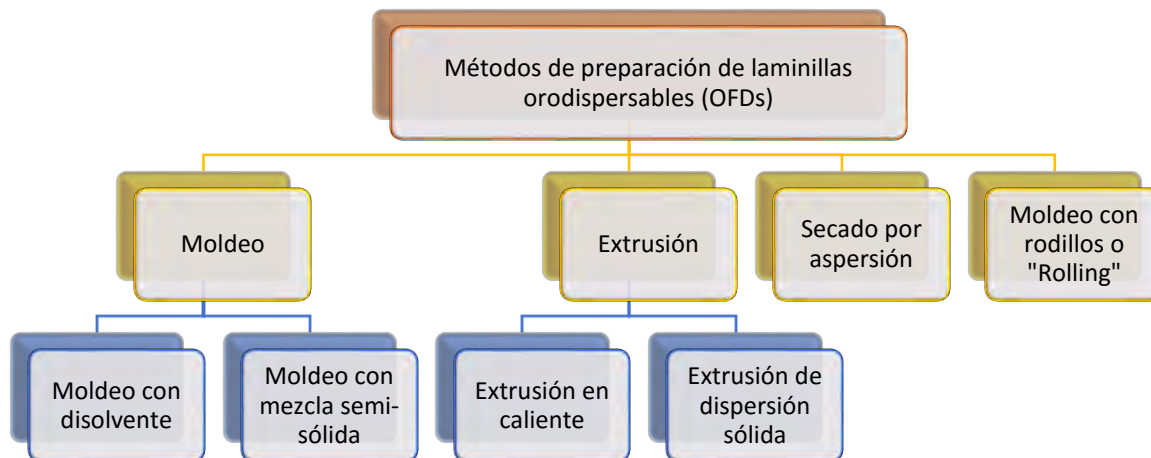


Figura 30. Métodos de preparación de OFDs (Irfan et al, 2015).

5.4.1 Moldeo con disolvente

El moldeo con disolvente es el método más comúnmente utilizado para preparar OFDs utilizando excipientes solubles en agua, polímeros y fármacos que se pueden disolver en agua desionizada; consecuentemente se obtiene una mezcla a través de la dispersión y/o disolución de cada ingrediente. Después, la solución preparada se vacía en un recipiente como caja de Petri y el solvente se seca exponiéndolo a cierta temperatura para obtener la laminilla. El proceso se resume en la figura 31.

La compatibilidad del fármaco con el solvente y otros excipientes deben ser tomados en cuenta antes de la formulación final. Durante la preparación, la incorporación no deseable de burbujas puede afectar la uniformidad de contenido en las laminillas preparadas. Por lo tanto, la desaireación de la mezcla se puede llevar a cabo con ayuda de una bomba de vacío (Irfan et al, 2015).

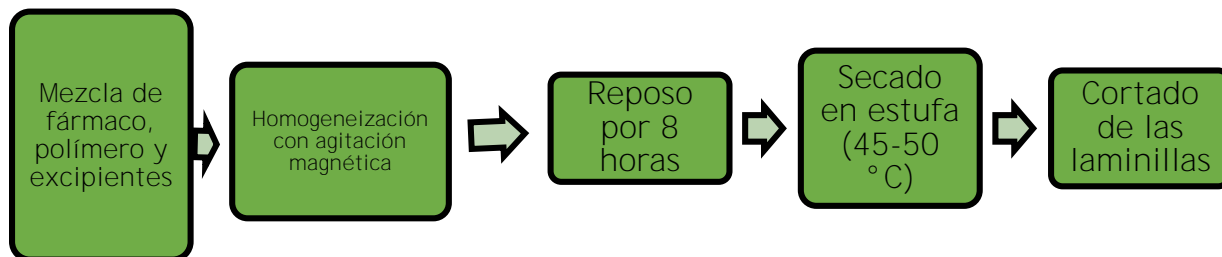


Figura 31. Proceso general del método de moldeo con disolvente.

5.4.2 Moldeo con mezcla semisólida

Este método se prefiere cuando se usan polímeros ácidos insolubles en agua. La masa de gel es moldeada en cintas o laminas en rodillos bajo condiciones de calor controladas. La masa de gel se obtiene adicionando la solución de la laminilla a una solución de los polímeros insolubles en ácido preparada en hidróxido de sodio o amonio. Algunos polímeros ácidos son: ftalato acetato de celulosa y butirato de acetato de celulosa. Estos polímeros deben ser usados en una proporción de 1:4. Finalmente se agrega el plastificante (Panda, Dey y Rao, 2012). La figura 32 resume este proceso.

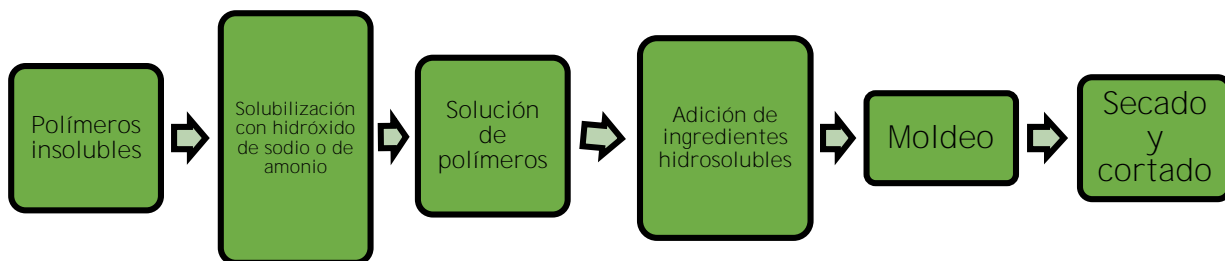


Figura 32. Proceso general para el método de moldeo con mezcla semisólida.

5.4.3 Extrusión en caliente

Primero el fármaco se mezcla con acarreadores en forma sólida. Después el granulado seco se introduce en el extrusor. La velocidad es de 15 rpm por 3 ó 4 minutos. La temperatura es de 80°C (zona 1), 115°C (zona 2), 100°C (zona 3) y 65°C (zona 4). El material (a 65°C) es colocado entonces en un rodillo para obtener la laminilla. Éste método presenta las siguientes ventajas: menos operaciones unitarias, es un proceso continuo con pocos pasos, se mejora uniformidad de contenido, puede aumentar la biodisponibilidad debido a la dispersión del activo a nivel molecular y, es un proceso anhidro. Los componentes de la formulación deben ser térmicamente estables las condiciones de procesamiento utilizadas. Esto puede limitar la extrusión de fármacos termosensibles (Panda, Dey y Rao, 2012). El proceso se presenta en la figura 33.



Figura 33. Proceso general para el método de extrusión en caliente.

5.4.4 Extrusión de dispersión sólida

Este método involucra la dispersión sólida para incorporar el fármaco incorporado al polímero fundido. El principio activo se disuelve en un solvente líquido apropiado y la solución obtenida se añade al polímero fundido, a temperaturas menores a 70 °C sin remover el solvente líquido con el fin de obtener la dispersión. La dispersión sólida obtenida es extruida, secada y cortada en el tamaño deseado (Bala et al (2013)). El proceso se resume en la figura 34.

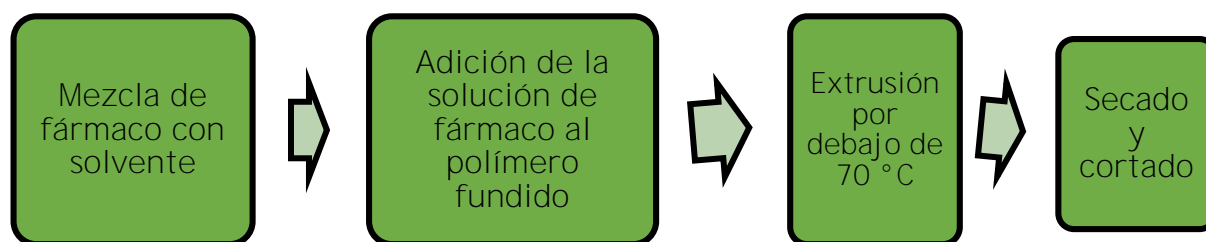


Figura 34. Proceso general para el método de extrusión de dispersión sólida.

5.4.5 Secado por aspersion

En esta técnica, el fármaco, los polímeros y los demás excipientes se disuelven en un solvente adecuado para formar una solución translúcida. Esta solución clara se dispersa a través de una boquilla sobre un material adecuado, tal como vidrio, láminas de polietileno, papel Kraft sin silicon o láminas de teflón (Irfan et al, 2015). El proceso se resume en la figura 35.

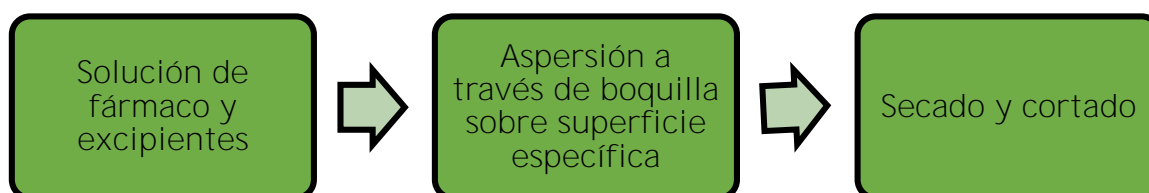


Figura 35. Proceso general para el método de secado por aspersion.

5.4.6 Moldeo **con rodillos o “Rolling”**

En este método una solución o suspensión de fármaco con agente filmógeno es preparada y colocada en los rodillos. La solución o suspensión debe tener una consideración reológica específica para



entrar por la tolva y fluir por los rodillos. El solvente es principalmente agua y una mezcla de agua con alcohol. La película es secada en rodillos y cortada a las dimensiones deseadas (Panda, Dey y Rao, 2012). El proceso se resume en la figura 36.

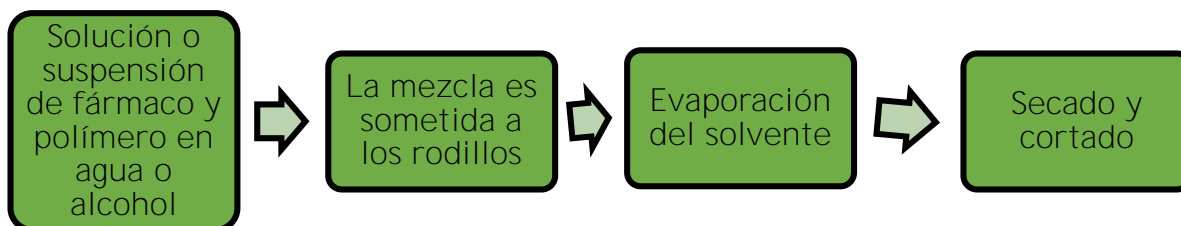


Figura 36. Proceso general para el método de **moldeo con rodillos o “Rolling”**.

5.5 Caracterización de laminillas orodispersables

La caracterización de laminillas orodispersables se lleva a cabo mediante los siguientes parámetros.

5.5.1 Propiedades organolépticas

Dado que la forma farmacéutica está destinada a desintegrarse rápidamente, o permanecer más tiempo en la cavidad oral, el producto necesita tener características organolépticas de sabor aceptables. El producto debe poseer las características deseadas de dulzura y sabor aceptables para una gran masa de la población. Se utilizan métodos *in vitro* como sensores de sabor. Estos aparatos y metodologías son muy adecuadas para el análisis de formulaciones farmacéuticas orales.

Los experimentos utilizando mediciones lengua electrónica también han sido reportados para distinguir entre los niveles de dulzor en el enmascaramiento del sabor de la formulación (Panda, Dey y Rao, 2012).

5.5.2 Propiedades mecánicas

a) Espesor

Ya que el espesor de la laminilla tiene que ver directamente con la uniformidad de contenido de la laminilla es necesaria una uniformidad en el espesor de las unidades. Puede usarse un micrómetro o con un Vernier calibrado.

b) Humedad

El porcentaje de humedad afecta la resistencia y friabilidad de las laminillas. Básicamente, los ingredientes de la formulación determinan el grado de humedad en la película. La cantidad de humedad se determina usualmente mediante titulación con reactivo de Karl-Fischer o por secado. Típicamente, una película es pesada y secada a 100-120°C hasta que mantenga peso constante. La cantidad de humedad se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Contenido de humedad} = \frac{\text{Masa inicial} - \text{Masa final}}{\text{Masa inicial}} * 100$$

El contenido de agua en una película debe ser menor al 5%.



c) Resistencia a la ruptura

Es la máxima fuerza aplicada al punto que la laminilla se rompe. Se calcula con la carga aplicada en la ruptura entre el área transversal de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Resistencia a la ruptura} = \frac{\text{Fuerza aplicada (kp)}}{(\text{Espesor} * \text{ancho})}$$

Básicamente es de un orden bajo, aproximadamente de de 51 N/mm², y se usa para medir la resistencia inicial a la ruptura. El máximo esfuerzo o fuerza (que es generalmente cercano a la aparición del desgarro) se reporta en Newtons.

d) Porcentaje de elongación

Cuando se aplica una fuerza, una laminilla se estira y esto se refiere a una tensión. La tensión es básicamente la deformación entre las dimensiones originales de la pieza. Generalmente un estiramiento aumenta a mayor contenido de plastificante.

$$\text{Porcentaje de elongación} = \frac{\text{Incremento de tamaño}}{\text{Tamaño original}} * 100$$

e) Módulo de Young

El módulo de Young o módulo elástico es la medida de la rigidez de la laminilla. Se representa como la relación de la tensión aplicada en la región de deformación elástica de la siguiente manera:

$$\text{Módulo de Young} = \frac{\text{Pendiente de la curva fuerza - elongación}}{\text{Espesor} * \text{Velocidad de jale}}$$

Las piezas duras y quebradizas presentan una alta resistencia a la tracción y el módulo de Young con una pequeña elongación.

f) Resistencia al plegado

La resistencia al plegado se determina doblando repetidamente la laminilla en el mismo sitio hasta que se quiebra. El número de veces que la laminilla se dobla sin romperse se registra como la resistencia a plegado. El valor máximo reportado es de 300.

g) Índice de hinchamiento

Los estudios del hinchamiento de las laminillas se llevan a cabo utilizando solución de saliva simulada. Cada laminilla es pesada y colocada en una malla de acero. La malla conteniendo la muestra es sumergida en 15 mL de solución de saliva simulada. Se determina el incremento en el peso de la laminilla hasta que éste se vuelve constante.

El grado de hinchamiento se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de erosión} = \frac{\text{Masa inicial} - \text{Masa final}}{\text{Masa inicial}} * 100$$

h) Transparencia

La transparencia de las películas se puede determinar usando un sencillo espectrofotómetro UV. Se cortan las muestras de película en rectángulos y se colocan en el lado interno de la celda de espectrofotómetro. La transmitancia de las películas se determina a 600 nm. La transparencia de las películas se calcula como sigue:



$$\text{Transparencia} = (\log T_{600})/b = -\epsilon c$$

Dónde T_{600} es la transmitancia a 600 nm y b es el espesor de la película (mm) y c es la concentración (Bhupinder et al, 2011).

5.5.3 Contenido químico y uniformidad de contenido

Se determina por cualquier método analítico descrito para el principio activo en particular, en cualquiera norma farmacopéica. La uniformidad del contenido se determina por la estimación del contenido de principio activo en la tira individual. El límite de uniformidad de contenido es 85-115 por ciento.

5.5.4 Caracterización morfológica

Se puede llevar a cabo mediante microscopía de barrido electrónico. Para excipientes y principio activo preprocesados así como para las laminillas se pueden utilizar las técnicas de difracción de rayos X y calorimetría diferencial de barrido (Bhupinder et al, 2011).

5.5.5 Tiempo de desintegración

El aparato de desintegración mencionado en las farmacopeas oficiales es el utilizado para la determinación del tiempo de desintegración de una laminilla dispersable. Normalmente, el tiempo de desintegración es función de su composición y varía entre rangos de 5 a 30 segundos. No existen guías oficiales disponibles para laminillas orodispersables. Existe el llamado método de la caja de Petri en donde una laminilla es colocada en 2 mL de agua desionizada y el tiempo que se requiere para disolver completamente la laminilla se considera como el tiempo de desintegración (Irfan et al, 2015).

Bala et al (2013) mencionan otro método en donde el tiempo de desintegración se detecta al introducir la laminilla en 25 mL de agua desionizada en un vaso de precipitados con agitación y se registra el momento en que la película comienza a romperse o desintegrarse.

5.5.5 Disolución *in vitro*

La prueba de disolución puede realizarse usando el aparato de canastilla o de paletas descrito en cualquier farmacopea. El medio de disolución **debe encontrarse a 37 °C y en condiciones "sink"** con respecto a la dosis más alta del principio activo. Muchas veces la prueba de disolución puede presentar dificultades debido a la tendencia de la laminilla de flotar dentro del medio de disolución cuando se usa el aparato de paletas; por esta razón, es recomendable usar el aparato de canastilla. Las muestras de fármaco se recolectan a intervalos predeterminados de tiempo y analizadas con el método analítico desarrollado (Irfan et al, 2015).

5.5.5 pH

Se mide el pH de la solución o dispersión obtenida después de dejar la laminilla en agua destilada por una hora (Panda y Dey, 2012). También se puede medir el pH de un gel de agarosa al 1% p/v al que se puso en contacto con la laminilla (Bhupinder et al, 2011).

Irfan et al (2015) mencionan que éste parámetro puede ser medido colocando la laminilla en una caja Petri y agregando agua desionizada para después medir el pH colocando un par de electrodos sobre la laminilla. La determinación del pH es vital para determinar si el producto podría causar irritación mucosal por carácter ácido o básico.



VI. PARTE EXPERIMENTAL

1. Materiales y equipos

1.1 Materias primas

▪ Polímero

Poli-(ϵ -caprolactona) (Polycaprolactone, PCL, Sigma-Aldrich, USA) con peso molecular promedio de 80, 000 g/mol.

▪ Estabilizante

Alcohol polivinílico Mowiol® 40-88 (Polyvinyl alcohol, PVAL, Glomarza, México).

▪ Principio activo

Digluconato de clorhexidina, solución acuosa al 20% p/v (Chlorhexidine digluconate solution 20% in H₂O). Frasco con 100 mL.

▪ Filmógenos para laminillas

Pharmacoat® 615 Shin-Etsu Chemical Co, Japón.

▪ Carbopol® 974 NF Polymer, Cleveland, Ohio, USA).

▪ Eudragit® E100 (Evonik, Germany).

▪ Eudragit® RLPO (Evonik, Germany).

▪ Eudragit® L100-55 (Evonik, Germany).

▪ Carboximetilcelulosa sódica.

1.2 Reactivos en general

▪ Cloruro de sodio USP (grado reactivo Droguería Cosmopolita, México, D.F., México).

▪ Cloruro de potasio USP (grado reactivo Droguería Cosmopolita, México, D.F., México).

▪ Fosfato de Potasio Monobásico ACS, P.M. 136.09 (Grado reactivo Fermont, Productos Químicos Monterrey, México).

▪ Fosfato de Potasio Dibásico ACS, P.M. 174.18 (Grado reactivo Fermont, Productos Químicos Monterrey, México).

▪ Tiocianato de Potasio ACS, P.M. 97.18 (Grado reactivo Fermont, Productos Químicos Monterrey, México).

▪ Bicarbonato de Sodio USP (Grado reactivo Droguería Cosmopolita, México, D.F., México).

▪ Ácido cítrico USP (Grado reactivo Droguería Cosmopolita, México, D.F., México).

▪ Ácido bórico ACS (Grado reactivo Sigma-Aldrich, USA).

▪ Yoduro de potasio (Grado reactivo, J.T. Baker, México).

▪ Yodo metálico (Grado reactivo, Sigma-Aldrich, USA).

▪ Glicerina USP (Grado reactivo Droguería Cosmopolita, México, D.F., México).

▪ Trietanolamina (Grado reactivo Droguería Cosmopolita, México, D.F., México).

▪ Propilenglicol (Grado reactivo Droguería Cosmopolita, México, D.F., México).



- Polisorbato 80, Tween® 80, (Grado reactivo Droguería Cosmopolita, México, D.F., México).
- Alcohol etílico (Grado analítico Reasol, México, D.F., México).
- Acetona (Grado analítico Productos Químicos Monterrey, México).
- Acetato de etilo (Grado analítico Productos Químicos Monterrey, México).

1.3 Material de cristalería en general

1.4 Lista de equipos

- Evaporador rotativo ® R-210, Buchi®.
- Ultrasonido UP200Ht, Hielscher®.
- Zetasizer Nano S® ZS90, Malvern.
- Espectrofotómetro Genesys® 10S UV-VIS.
- Multímetro HI2221-02, HANNA® Instruments.
- Ultraturrax T25, IKA®.
- Balanza analítica VE-204, VELAB®.
- Balanza OHAUS® TravelerTM.
- Ultracentrífuga LE-80K, OPTIMA®.
- Microscopio electrónico de barrido JSM-25 S II; JEOL, Japón
- Campana de recubrimiento con oro JFC-110; JEOL, Japón
- Centrifuge tubes, Polycarbonate, Beckman Coulter, 25X89 mm.
- Agitador magnético multiplazas IKA-WERKE® RO 15.
- Agitador magnético multiplazas IKA-WERKE® RO 15.
- Liofilizadora de mesa (Labconco®, USA).
- Pipeta automática.
- Baño Dubnoff® Q226M1.
- Desintegrador BJ-2, Vanguard Pharmaceutical Machinery Inc.
- Filtros Millex® -**GV de 2.5 cm de diámetro y poro de 0.22 µm (Millipore®)**.
- Bolsas de diálisis Spectra/Por® Dialysis, Peso molecular 6-8000 g/mol.
- Colorímetro por reflectancia/de laboratorio CR-5; KONICA MINOLTA; JAPÓN.



2. Procedimientos experimentales

2.1 Sistemas analíticos

2.1.1 Preparación de saliva simulada

Se pesaron los ingredientes de acuerdo a la siguiente tabla y de acuerdo al volumen de fluido simulado a preparar.

Tabla 11. Composición de la saliva simulada (Duffo, 2004).

Ingrediente	Concentración (g/L)
NaCl	0.6
KCl	0.72
KH ₂ PO ₄	0.68
Na ₂ HPO ₄	0.856
KSCN	0.06
NaHCO ₃	1.5
Ácido cítrico	0.1

pH esperado: 6.5

Se disolvió cada ingrediente en agua desionizada con agitación magnética. Se llevó al volumen de aforo deseado. Se midió el pH de la solución con un potenciómetro.

2.1.2 Espectros de absorción de gluconato de clorhexidina en agua desionizada y en saliva simulada

Se realizó la prueba en saliva simulada y en agua desionizada. Se probaron diferentes diluciones desde la solución stock de gluconato de clorhexidina al 20%p/v. La concentración que arrojó **resultados pertinentes fue de 20 µg/mL.**

Se tomaron 0.025 mL del stock del fármaco con una micropipeta y se vertieron en un matraz volumétrico de 25 mL (Solución A). Se tomó 1 mL de la solución A con una pipeta volumétrica y se vertió en un matraz volumétrico de 10 mL. Se llevó a la línea de aforo con agua desionizada o saliva simulada.

2.1.3 Estudio de estabilidad del fármaco en presencia de la luz

Se colocó 1 mL de stock de fármaco expuesto a la luz y se tomó una muestra de 0.025 mL a 0,1, 2, 4, 6 y 25 horas, obteniendo su espectro de absorción en agua desionizada para cada tiempo.



2.1.4 Curva de calibración de gluconato de clorhexidina en saliva simulada

Se tomaron 0.4 mL de la solución de fármaco 20 % p/v con una micropipeta y se vertieron en un matraz volumétrico de 10 mL. Se agitó y se llevó a la línea de aforo con agua desionizada (Solución A). Se tomó 1 mL de la solución A con una pipeta volumétrica y se vertió en un matraz volumétrico de 100 mL. Se llevó a la línea de aforo con saliva simulada (Solución B).

Para la preparación de las soluciones estándar se tomaron 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 mL de la solución B con pipetas volumétricas y se vertieron en matraces volumétricos de 10 mL independientes y por triplicado. Se llevó a la línea de aforo con agua desionizada. Se determinó la absorbancia de cada solución en el espectrofotómetro a 263 nm.

2.1.5 Curva de calibración de alcohol polivinílico en agua desionizada

Se preparó una solución stock de 2.021mg/mL. Se pesaron 202.1 mg de alcohol polivinílico en un vaso de precipitados de 50 mL con una balanza analítica. Se transfirieron a un matraz Erlenmeyer de 100 mL. Se agregaron 80 mL de agua desionizada y se colocó en agitación magnética hasta completa disolución. Se transfirió el líquido a un matraz volumétrico de 100 mL y se llevó a la línea de aforo con agua desionizada.

Para preparar las soluciones estándar se tomaron aleatoriamente 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 mL de la solución stock con pipetas volumétricas y se transfirieron a matraces volumétricos de 10 mL independientes y por triplicado. Se llevó a la línea de aforo con agua desionizada y se agitaron. Para la formación de complejo PVAL-ácido bórico-Yodo/yoduro se tomó 1 mL de cada solución estándar y se transfirió a un tubo de ensayo de 15 mL por separado. Se agregaron 4 mL de agua desionizada, 1 mL de solución de ácido bórico 0.65 M y 1 mL de solución I_2 0.05 M/KI 0.15 M. Se determinó la absorbancia a 640 nm. El proceso se realizó para cada solución de manera independiente ya que se obtiene un complejo verde estable por 15 minutos.

2.1.6 Validación del sistema analítico para gluconato de clorhexidina

2.1.6.1 Especificidad

Se obtuvo el espectro de absorción de cada uno de los siguientes elementos: saliva simulada y cada uno de sus ingredientes de manera independiente; gluconato de clorhexidina, poli- ϵ -caprolactona y Pharmacoat® 615 en saliva simulada y se superpusieron en un gráfico para analizar si existían interferencias en los máximos de absorbancia del fármaco. Se determinó la longitud de onda en donde la absorbancia se debiera únicamente el ingrediente activo.

2.1.6.2 Linealidad

Se llevó a cabo el procedimiento descrito en el numeral 2.1.4 y se determinaron los siguientes parámetros: coeficiente de determinación (r^2) e **intervalo de confianza del intercepto ($IC(B_1)$)** mediante análisis de mínimos cuadrados parciales. Se contrastaron los resultados con las especificaciones de la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos.



2.1.6.3 Límites de detección y cuantificación

Se preparó un triplicado de las soluciones no. 1, 4 y 7 de la curva de calibración reportada en el numeral 2.1.4, se determinó su absorbancia en el espectrofotómetro a 263 nm y se calculó el coeficiente de determinación (r^2) **y el intervalo de confianza del intercepto (IC(β_1))** de la respuesta analítica mediante análisis de mínimos cuadrados parciales. Se obtuvieron los límites de acuerdo a los procedimientos indicados en la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos.

2.1.6.4 Precisión

Se preparó un sextuplicado de soluciones a la concentración del analito correspondiente al 100 % de la muestra para cuantificación. Se obtuvo su absorbancia a 263 nm y se calculó el coeficiente de variación porcentual (%CV). Se contrastó el resultado con lo especificado en la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos.

2.1.6.5 Repetibilidad

Se compararon los parámetros de coeficiente de determinación (r^2) y coeficiente de variación porcentual Absorbancia/concentración ($C_{y/x}$) obtenidos a partir de las soluciones 1, 4 y 7 en dos días diferentes y se analizaron según las especificaciones $r^2 \leq 0.98$ y $C_{y/x} \leq 2\%$.

2.1.6.6 Exactitud

Se compararon las concentraciones corregidas de las soluciones 1, 4 y 7 de la curva de calibración descrita en el numeral 2.1.4 obtenidas en dos días diferentes y se analizaron según las **especificaciones porcentaje de recobro $\geq 98\%$ y $CV_{\text{recobro}} \leq 3\%$.**

2.1.7 Evaluación del sistema analítico colorimétrico para cuantificar alcohol polivinílico

2.1.7.1 Linealidad

Se llevó a cabo el procedimiento descrito en el numeral 2.1.5 y se determinaron los siguientes parámetros: coeficiente de determinación (r^2) **e intervalo de confianza del intercepto (IC(β_1))** mediante análisis de mínimos cuadrados parciales. Se contrastaron los resultados con las especificaciones de la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos.

2.1.7.2 Límites de detección y cuantificación

Se analizaron los datos obtenidos de las soluciones 1, 4 y 7 de a curva de calibración del numeral 2.1.5 mediante el método de mínimos cuadrados parciales. Se obtuvieron los límites de acuerdo a los procedimientos indicados en la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos.



2.2 Desarrollo de laminillas orodispersables

2.2.1 Preformulación y desarrollo del proceso

Se prepararon dispersiones de los siguientes polímeros: Eudragit® RS 100, Eudragit® RLPO, Eudragit® E100, Carboximetilcelulosa sódica, Pharmacoat® 615 y Pharmacoat® 615 + Carbopol® 974 NF modificando la técnica de dispersión, proporción de los excipientes y método de moldeado así como de secado. Para evaluar la carboximetilcelulosa sódica sólo se realizó una prueba de compatibilidad. Se elaboraron ocho lotes con las siguientes condiciones:

Tabla 12. Formulaciones para laminillas orodispersables.

No. Lote	Tamaño lote (mL)	Composición			Procedimiento
		Ingrediente	Función	% p/v	
I	25	Pharmacoat® 615	Filmógeno	8	Dispersión del filmógeno en mezcla de agua caliente-glicerina. Servido inmediatamente después de la disolución en cajas Petri. Secado a 42°C en estufa por 18 horas.
		Glicerol	Plastificante	10	
		Agua desionizada	Solvente	c.b.p.	
		Glicerol	Plastificante	10	
		Agua desionizada	Solvente	c.b.p.	
II	25	Pharmacoat® 615	Filmógeno	10	Dispersión del filmógeno en mezcla de agua caliente-glicerina. Servido inmediatamente después de la disolución en cajas Petri. Secado a 42°C en estufa por 18 horas.
		Glicerol	Plastificante	10	
		Agua desionizada	Solvente	c.b.p.	
III	25	Pharmacoat® 615	Filmógeno	12	Dispersión del filmógeno en mezcla de agua caliente-glicerina. Servido inmediatamente después de la disolución en cajas Petri. Secado a 42°C en estufa por 18 horas.
		Glicerol	Plastificante	10	
		Agua desionizada	Solvente	c.b.p.	



Tabla 12. Formulaciones para laminillas orodispersables (continuación).

No. Lote	Tamaño lote (mL)	Composición			Procedimiento
		Ingrediente	Función	% p/v	
IV	25	Pharmacoat® 615	Filmógeno	8	Procedimiento Dispersión del filmógeno en mezcla de agua caliente-glicerina. Servido inmediatamente después de la disolución en cajas Petri. Secado a 42°C en estufa por 18 horas.
		Glicerol	Platificante	10	
		Agua desionizada	Solvente	c.b.p.	
V	25	Pharmacoat® 615	Filmógeno	8	Disolución del filmógeno en mezcla de agua fría-glicerina. Servido inmediatamente después de la disolución en Porta-objetos de 2.5 cm X 7 cm. Secado a 42°C en estufa por 20 horas.
		Glicerol	Plastificante	10	
		Agua desionizada	Solvente	c.b.p.	
VI	25	Gluconato de clorhexidina	Principio activo (antiséptico)	1	Dispersión del filmógeno y el agente mucoadhesivo por 2 h y reposo por 24 h. Neutralización con Trietanolamina. Mezclado con los otros ingredientes con ultraturrax a 5000 rpm por 10 min. Servido en Porta-objetos de 2.5 cm X 7 cm. Secado a 42°C en estufa por 20 horas.
		Pharmacoat® 615	Filmógeno	3	
		Carbopol® 974 NF	Agente mucoadhesivo	0.05	
		Trietanolamina	Agente neutralizante de pH	c.s.	
		Glicerina	Plastificante	10	
		Propilenglicol	Plastificante	10	
		Agua desionizada	Solvente	c.b.p.	



Tabla 12. Formulaciones para laminillas orodispersables (continuación).

		Ingrediente	Función	% p/v	
VII	25	Gluconato de clorhexidina	Principio activo (antiséptico)	1	Dispersión del filmógeno en etanol y posterior adición de trietanolamina. Dispersión del agente mucoadhesivo en agua desionizada por 2 h y posterior reposo de 24 h. Adición del filmógeno al agente mucoadhesivo con ultraturrax a 9500 rpm por 5 min. Servido en portaobjetos de 2.5cmX7.5 cm y posterior secado en estufa a 42°C por 20 horas.
		Eudragit® RL PO, E 100 o L 100	Filmógeno	0.5	
		Pharmacoat® 615	Agente mucoadhesivo	2	
		Trietanolamina	Plastificante	3	
		Etanol	Cosolvente	5	
		Agua desionizada	Solvente	c.b.p.	
VIII	50	Gluconato de clorhexidina	Principio activo (antiséptico)	1	Dispersión del filmógeno en agua desionizada con glicerina por 1 h. Reposo en refrigerador por 24 h. Posterior adición del principio activo disperso en propilenglicol. Aforo con agua desionizada y servido (2 mL gel) en portaobjetos de 2.5cmX7.5 cm Secado en estufa a 42°C/20h.
		Pharmacoat® 615	Filmógeno	3	
		Glicerol	Plastificante	5	
		Propilenglicol	Plastificante	5	
		Agua desionizada	Solvente	c.b.p.	



2.3 Selección de las variables de proceso para laminillas orodispersables

Se prepararon seis lotes de 70 mL de gel cada uno con la siguiente formulación:

Tabla 13. Formulación para laminillas orodispersables.

Ingrediente	Concentración (% p/v)
Gluconato de clorhexidina	1
Pharmacoat® 615	Varias proporciones (Ver tabla 14)
Glicerol	5
Propilenglicol	5
Agua desionizada	c. b. p.

Para el filmógeno se manejaron las siguientes proporciones:

Tabla 14. Lotes preparados para la selección de variables de proceso para laminillas orodispersables.

Lote	Proporción de Pharmacoat® 615 (hidroxipropilmetilcelulosa) (% p/v)	Modo de secado
1	3	Estufa a 42 °C por 20 h.
2	4	Estufa a 42 °C por 20 h.
3	5	Estufa a 42 °C por 20 h.
4	3	Desecador a 25 °C por 48 h.
5	4	Desecador a 25 °C por 48 h.
6	5	Desecador a 25 °C por 48 h.

Se calentó el agua desionizada a 80 °C. Se agregaron los plastificantes y el filmógeno rápidamente y se dejó en dispersión con propela a 600 rpm por una hora, suspendiendo el calentamiento. Se dejó reposo por 20 horas a 5 °C para hidratación del polímero y para eliminar burbujas. Se agregó el principio activo al gel y se dispersó con propela a 300 rpm por 10 minutos. Se eliminaron las burbujas en baño de ultrasonido por 5 minutos a temperatura ambiente. Se sirvió el gel en moldes de vidrio de 10.5 cm X 16.5 cm como muestra la figura 30 y se sometió a secado de acuerdo a la tabla 13. Se cortaron laminillas de 5 cm X 1 cm y se almacenaron en desecador para posterior análisis.



Figura 37. Moldeo del gel para laminillas.



2.4 Caracterización de laminillas orodispersables

2.4.1 Masa y uniformidad de masa

Se pesaron diez laminillas orodispersables de manera independiente en una balanza analítica. Se calculó promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y uniformidad de masa.

2.4.2 Contenido químico y uniformidad de contenido

Se colocó la laminilla dispersable en 20 mL de saliva simulada hasta completa disolución. Se transfirió el líquido a un matraz volumétrico de 25 mL y se llevó a la línea de aforo con saliva simulada (Solución A). Se tomaron 2 mL de la solución A con una pipeta volumétrica y se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 mL. Se llevó a la línea de aforo con saliva simulada y se determinó la absorbancia en el espectrofotómetro a 263 nm. Se evaluaron diez muestras. Se calculó promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y uniformidad de contenido.

2.4.3 Evaluación de pH laminillas orodispersables

Se colocó la laminilla dispersable en 20 mL de saliva simulada hasta completa disolución. Se midió el pH de la solución obtenida con un potenciómetro. El proceso se realizó por sextuplicado para cada lote.

2.4.4 Tiempo de desintegración

Se utilizó una adaptación de la canastilla de desintegración de la USP para evitar que la laminilla flotara en el medio de prueba.



Figura 38. Adaptación de la canastilla de desintegración USP.

Para la evaluación se colocaron seis laminillas en la canastilla. Se colocaron en el desintegrador BJ-2, Vanguard Pharmaceutical Machinery Inc., con 900 mL de saliva simulada a 37 ± 0.5 °C. Se registró el tiempo en el que la laminilla se fragmentaba.



2.4.5 Evaluación de laminillas orodispersables en colorímetro

Se evaluó una laminilla por cada lote. Se cortó cada laminilla en tres partes y se evaluó cada uno por separado colocándolo en una caja Petri sobre el equipo. Se registraron los valores de luminosidad (*L), variación rojizo-verdoso (a*) y variación amarillento-azulado (b*).

2.4.6 Microscopía Electrónica de Barrido

Se colocó la muestra de laminilla sobre un portaobjetos y se recubrieron con una película de oro empleando un dispersor iónico (JFC-110, JEOL, Japón) y fueron observadas a 10, 000 X.

2.4.7 Calorimetría diferencial de barrido

Se pesaron 2.4 mg de muestra y se colocaron en charolas de aluminio herméticas. Para la calibración del equipo se utilizó estándar de indio. La velocidad de calentamiento fue de 10 °C/minuto y el flujo de nitrógeno fue de 50 mL/minuto. La línea base y la muestra se corrieron de -10 °C a 300 °C.

2.5 Desarrollo de nanopartículas poliméricas

2.5.1 Determinaciones previas

2.5.1.1 Evaluación de la estabilidad para la emulsión de gluconato de clorhexidina en acetato de etilo con poli-(ϵ -caprolactona)

Se evaluó visualmente la estabilidad de la emulsión de fármaco en la fase orgánica para la preparación de las nanopartículas utilizando el sonotrodo de 7 mm de diámetro a dos profundidades de inmersión (5 mm y 2 cm) y a tres niveles de potencia (50 W, 75 W y 100 W) con un 80 % de amplitud y tres minutos de sonicación. Se realizó una inspección visual al terminar la prueba y después de cinco minutos. Posteriormente se aumentó la profundidad de inmersión del sonotrodo al máximo y se aumentó la potencia a 150 W, con amplitud de 80 % y tiempo de sonicación de 7 minutos. Se realizó una inspección visual al terminar la prueba y después de 5, 10 y 15 minutos.

2.5.1.2 Evaluación del efecto del ultrasonido en la estabilidad del principio activo

Se prepararon cuatro soluciones de gluconato de clorhexidina en saliva simulada de la siguiente manera: del stock de fármaco 20 % p/v se tomaron 0.2 mL con una micropipeta y se vertieron en un matraz volumétrico de 25 mL, llevando a la línea de aforo con agua desionizada (Solución A). De la solución A se tomaron 0.5 mL con una micropipeta y se vertieron en un matraz volumétrico de 25 mL. Se llevó a la línea de aforo con saliva simulada. Las soluciones preparadas se sometieron a la prueba tal como indica la siguiente tabla.



Tabla 15. Preparación de soluciones de gluconato de clorhexidina y evaluación del efecto del ultrasonido en la estabilidad del fármaco.

Solución	Condiciones de sonicación	Tiempo de sonicación (min)
Estándar	Sin sonicación	7
Solución 1	50 W/80%amplitud	7
Solución 2	100 W/80%amplitud	7
Solución 3	150 80%amplitud	7

2.5.3 Preparación de suspensión de nanopartículas placebo y cargadas por los métodos de doble emulsificación-difusión y de doble emulsificación.

Se prepararon suspensiones de nanopartículas con las siguientes condiciones:

Tabla 16. Preparación de suspensión de nanopartículas.

No. Lote	Fase orgánica			Fase acuosa		Método de preparación
	Solvente Acetato de etilo (mL)	Polímero Poli-(ϵ -caprolactona) (mg)	Fármaco Gluconato de clorhexidina (mg-mL sol. 20%p/v)	Solvente Agua desionizada (mL)	Estabilizante Alcohol polivinílico (mg, C=0.5 % p/v)	
1	20	200	100-0.5	40	200	Doble emulsificación-difusión
2	40	400	0	80	400	Doble emulsificación difusión
3	40	400	200-1	80	400	Doble emulsificación-difusión

El procedimiento de describe a continuación: Se saturaron mutuamente el acetato de etilo y el agua desionizada en un embudo de separación por 20 minutos. Posteriormente, se disolvió la poli-(ϵ -caprolactona) en el acetato de etilo y el alcohol polivinílico en el agua desionizada. Para incorporar el gluconato de clorhexidina en la fase orgánica se llevó a cabo una primera emulsión agua en aceite (w/o) con ultrasonido a 150 W al 80% de la potencia del equipo por 7 minutos.



Inmediatamente después, se agregó la fase acuosa y se emulsificó con dispersor Ultraturrax a 10, 000 rpm por 15 minutos. En el caso del método de doble emulsificación-difusión se agregó un exceso de 120 mL de agua desionizada seguida de agitación en Ultraturrax a 10, 000 rpm por 10 minutos.

Posteriormente se llevó a cabo la eliminación del exceso de solvente a presión reducida en el evaporador rotatorio a velocidad media y 37°C. Se eliminó el solvente hasta alcanzar un volumen total de suspensión de aproximadamente 40 mL. Se tomaron muestras del solvente eliminado para determinar la presencia del fármaco. Finalmente se determinó el tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta de cada lote en el Zetasizer Nano S® ZS90, Malvern.

2.5.4 Obtención de nanopartículas cargadas

Se prepararon dos lotes más bajo las siguientes condiciones:

Tabla 17. Obtención de nanopartículas cargadas.

No. Lote	Fase orgánica			Fase acuosa		Método de preparación
	Solvente	Polímero	Fármaco	Solvente	Estabilizante	
	Acetato de etilo (mL)	Poli-(ϵ -caprolactona) (mg)	Gluconato de clorhexidina (mg-mL sol. 20%p/v)	Agua desionizada (mL)	Alcohol polivinílico (mg, C=0.5 % p/v)	
4	40	400	200-1	80	400	Doble emulsificación
5	30	400	200-1	60	400	Doble emulsificación

Se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el punto 2.7 hasta la obtención de los 40 mL de nanosuspensión. Posteriormente, se centrifugó el lote a 20, 000 rpm por 25 minutos y a 25°C. Se recuperó el sobrenadante para determinar la presencia de principio activo. La pastilla se resuspendió y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones con el fin de lavar la muestra.

La pastilla se resuspendió y se sometió a congelación a -20°C por 24 horas. En el caso del lote 5 se agregó manitol al 10 % p/v con respecto al volumen total de nanosuspensión a congelar. La muestra congelada se liofilizó a -40°C y 130 mBar de presión por 48 horas para posterior almacenamiento en un desecador.

2.6 Caracterización de nanopartículas poliméricas

2.6.1 Determinación de tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta

Tanto para las suspensiones de nanopartículas como para las muestras resuspendidas del liofilizado, se tomó una muestra y se analizó en el Zetasizer Nano S® ZS90, Malvern.



2.6.2 Cuantificación de alcohol polivinílico residual en nanopartículas

En vasos de precipitados, se pesaron aproximadamente 12 mg de liofilizado de nanopartículas por triplicado. Se agregaron 10 mL de acetato de etilo a cada muestra y se dejó en disolución por 5 horas a 40 °C. Se evaporó el solvente hasta sequedad y se agregaron 5 mL de agua desionizada. Se dejó en disolución con agitación magnética por 48 horas a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se transfirió el líquido a un matraz volumétrico de 10 mL y se llevó a la línea de aforo con agua desionizada. De la solución anterior, se tomó 1 mL con una pipeta volumétrica y se vertió en un tubo de ensayo. Se agregaron 4 mL de agua desionizada, 1 mL de solución de ácido bórico 0.65 M y 1 mL de solución de I₂ 0.05 M/KI 0.15 M. Se agitó hasta formación de complejo verde y se determinó la absorbancia a 640 nm. El resultado se interpoló en la curva de calibración correspondiente y se hicieron los cálculos pertinentes.

2.6.3 Cuantificación de gluconato de clorhexidina en nanopartículas

En vasos de precipitados protegidos de la luz, se pesaron aproximadamente 12 mg de liofilizado de nanopartículas por triplicado. Se agregaron 10 mL de acetato de etilo a cada muestra y se dejó en disolución por 5 horas a 40 °C. Se evaporó el solvente hasta sequedad y se agregaron 5 mL de saliva simulada. Se dejó en disolución con agitación magnética por 3 horas a 40 °C; después de este tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se continuó la agitación hasta 48 horas. Se transfirió el líquido del vaso de precipitados a un matraz volumétrico de 10 mL y se determinó la absorbancia a 263 nm. Se interpoló el resultado obtenido en la curva de calibración y se hicieron los cálculos pertinentes.

2.6.4 Calorimetría diferencial de barrido

Se pesaron entre 1 y 3 mg de cada muestra y se colocaron en charolas de aluminio herméticas. Para la muestra de gluconato de clorhexidina se colocó una gota de solución 20 % p/v en un vaso de precipitados y se colocó en un desecador por una semana; al finalizar este tiempo, se recuperó el sólido y se colocó en la charola. Para la calibración del equipo se utilizó estándar de indio. La velocidad de calentamiento fue de 10 °C/minuto y el flujo de nitrógeno fue de 50 mL/minuto. La línea base y las muestras se corrieron de -10 °C a 300 °C.

2.7 Preparación de laminillas con nanopartículas

El gel se preparó de la misma manera que para las laminillas cargadas únicamente con fármaco. Para éste proceso se utilizó el lote número 5 de nanopartículas. Una vez que el gel estuvo listo, se pesaron 318.1 mg de liofilizado de nanopartículas y se colocaron en un tubo de ensayo. Se agregaron 10 mL de agua desionizada y se resuspendieron en ultrasonido con el sonotrodo de 7 mm a una potencia de 100 W y amplitud de 70 % por 40 segundos. Inmediatamente después, se agregó la suspensión de nanopartículas al gel y se aforó al volumen de lote. Se mantuvo agitación mecánica por un minuto. Posteriormente, se eliminaron las burbujas en baño de ultrasonido por 30 segundos. Finalmente, se sirvió el gel en molde de vidrio de 11 cm X 17 cm y se secó en estufa a 42°C por 20 horas.

Una vez que estuvieron secas las laminillas, se cortaron con un tamaño de 5 cm X 1cm. Se disolvió una de ellas en agua desionizada y se analizó el tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta en el Zetasizer Nano S® ZS90, Malvern.



2.8 Perfiles de liberación *in vitro* del fármaco en solución, desde nanopartículas y desde laminillas con nanopartículas

Se hidrataron las membranas de diálisis Spectra/Por® Dialysis (PM: 6-8000) por 12 horas.

Para la solución, se tomaron 0.07 mL de la solución de fármaco 20 % p/v con una micropipeta y se vertieron en un matraz volumétrico de 10 mL, llevando a la línea de aforo con agua desionizada (Solución A). De la solución anterior, se tomó 1 mL con una pipeta volumétrica y se transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL, llevando a la línea de aforo con saliva simulada (Solución B). De la solución B se tomaron 1.5 mL con micropipeta y se colocaron en las membranas de diálisis. Una vez cerradas las bolsas, fueron sumergidas en un frasco con 30 mL de saliva simulada. La prueba se realizó por triplicado.

Para las nanopartículas, se resuspendieron 10 mg en promedio de liofilizado de nanopartículas con ultrasonido en 1.5 mL de saliva simulada y se colocaron en la bolsa de diálisis. Una vez cerradas las bolsas, fueron sumergidas en un frasco con 30 mL de saliva simulada. La prueba se realizó por triplicado.

Para las laminillas con nanopartículas se colocó una laminilla en la bolsa de diálisis y se agregó 1.5 mL de saliva simulada. Se cerraron las bolsas y se sumergieron en 30 mL de saliva simulada. La prueba se realizó por triplicado.

La prueba se realizó en un baño de agitación horizontal a 37 ± 0.5 °C. Se tomaron muestras de 3 mL a los 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 75, 90, 120, 150, 180, 240, y 300 minutos, reponiendo en cada tiempo el volumen retirado con medio fresco. Para la liberación desde laminillas, se continuó el muestreo hasta los 480 minutos.



VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Sistema analítico para gluconato de clorhexidina y sistema analítico para alcohol polivinílico

Para ésta investigación, se utilizó espectrofotometría UV/VIS en el desarrollo del método analítico para el fármaco debido a su accesibilidad y facilidad de preparación de las muestras. Según Másquio et al (2010) varias técnicas se han desarrollado para la determinación de clorhexidina, teniendo como método oficial descrito para sus sales la titulación en medio acuoso usando ácido perclórico 0.1 M y cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Además, reporta otras técnicas como extracción en fase sólida, cromatografía líquida, electroforesis capilar y voltamperometría. Sin embargo, el uso de cualquiera de estos métodos implica equipos de alto costo y cierta complejidad.

Se preparó saliva simulada como medio de prueba y se obtuvo el espectro de absorción del fármaco en este medio, así como en agua desionizada para determinar la longitud de onda máxima de absorción, encontrando valores de 231 y 254 nm; se calcularon los coeficientes de absorción específicos.

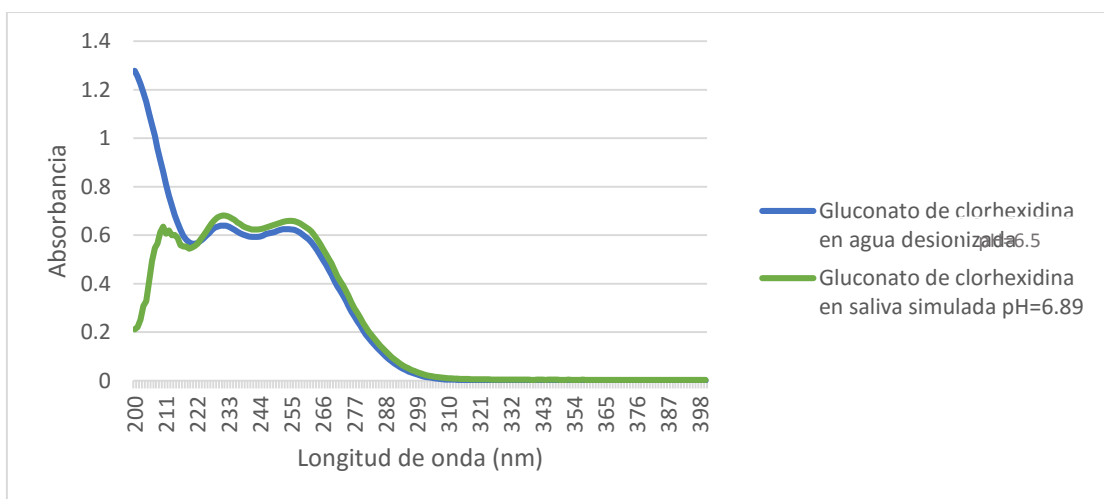


Gráfico 4. Espectro de absorción de gluconato de clorhexidina.

Tabla 18. Coeficientes de absorción de gluconato de clorhexidina en agua desionizada y en saliva simulada pH=6.89 a 231 y 254 nm.

Longitud de onda (nm)	Coefficiente de absorción específico en agua (mL/ μ g*cm)	Coefficiente de absorción específico en saliva simulada (mL/ μ g*cm)
231	0.032	0.0341
254	0.0312	0.0329

Moffat et al, 2011 reportan dos máximos de absorbancia para la clorhexidina, a 232 y 255 nm, mismos que son encontrados en los resultados obtenidos en esta investigación. Con respecto a los

coeficientes de absorptividad obtenidos, se encontró que este valor es mayor en saliva simulada que en agua desionizada, además de que el espectro se ve alterado antes de los 220 nm. Por eso, se decidió obtener los espectros de absorción de la saliva simulada, así como de cada ingrediente del fluido para determinar si existía alguna interferencia espectrofotométrica.

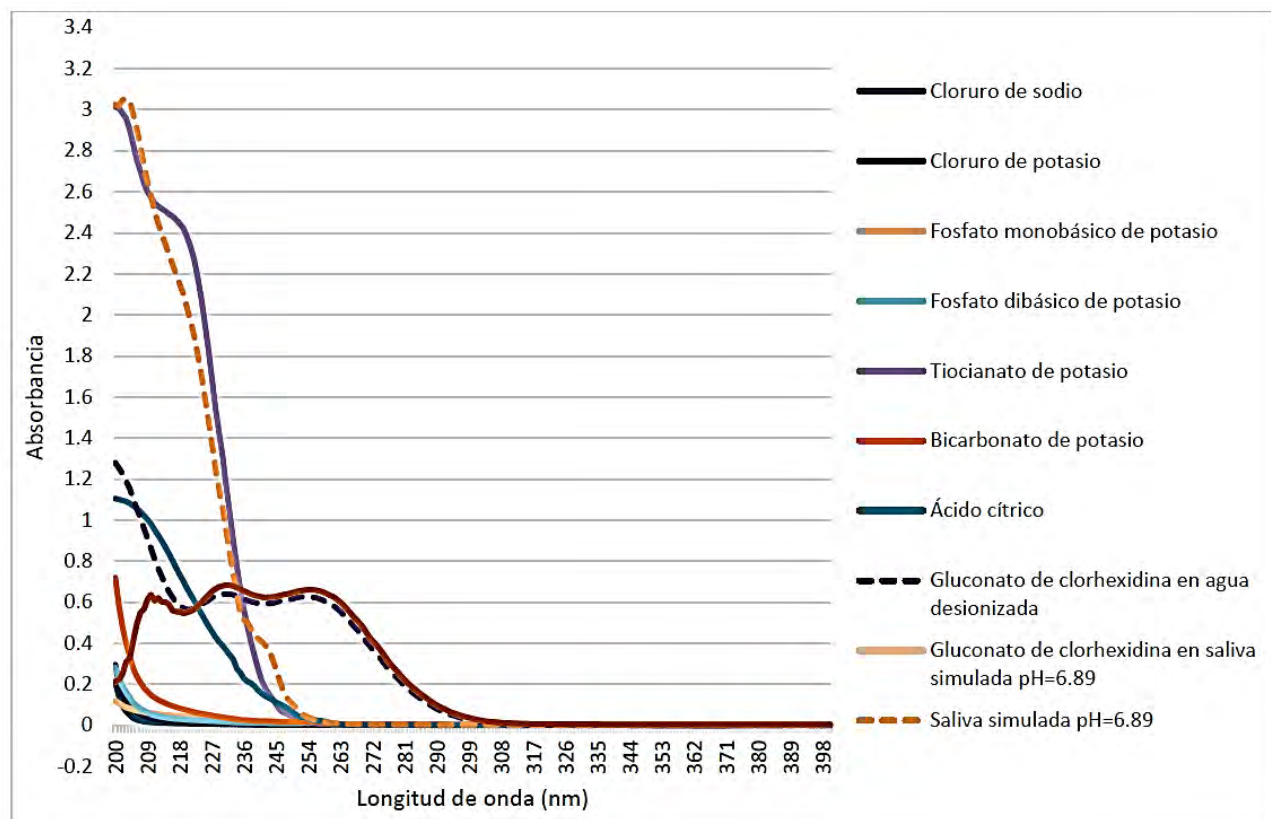


Gráfico 5. Comparación de los espectros de absorción de gluconato de clorhexidina, saliva simulada y cada componente de la saliva simulada.

Con esta comparación, se encontró que en el primer máximo a los 231 nm, la absorbancia de los ingredientes del fluido es considerable. Uno de los principales parámetros de cualquier método analítico es la especificidad, es decir, la capacidad del método que asegura que la respuesta se debe únicamente al analito, por lo que cualquier interferencia espectrofotométrica debe ser eliminada. Así mismo, se encontró que esta interferencia continuaba hasta el segundo máximo de absorción a los 260 nm con un valor de 0.037 unidades, por lo que se decidió recorrer la lectura espectrofotométrica a los 263 nm, en donde la respuesta del fluido es prácticamente despreciable (0.003). Másquio et al (2014) mencionan una variedad de longitudes de onda máxima para la detección en el espectro UV/VIS de clorhexidina que varían de 220 nm a 254 nm. Juliano et al (2008) prepararon laminillas bucales de gluconato de clorhexidina en donde su longitud de onda de detección fue de 262 nm, encontrando que sus laminillas contenían entre 89.6 % y 95.1 % del principio activo por lo que se puede decir que la longitud de onda seleccionada en esta investigación no influye considerablemente en la cuantificación del fármaco, a la vez que evita la interferencia del medio de prueba.



Una vez seleccionada la longitud de onda máxima de absorción, se procedió a calcular el coeficiente de absorptividad máximo en ese punto y preparar la curva de calibración del fármaco en saliva simulada con el fin de evaluar la linealidad del sistema analítico.

Tabla 19. Coeficientes de absorptividad del gluconato de clorhexidina en agua desionizada y saliva simulada a 263 nm.

Longitud de onda (nm)	Coeficiente de absorptividad específico en agua (mL/μg*cm)	Coeficiente de absorptividad específico en saliva simulada (mL/μg*cm)
263	0.0277	0.0306

Se calculó el coeficiente de determinación ($r^2=0.9997$), el intervalo de confianza de la pendiente (0.0301-0.0306) y la precisión del sistema (CV=0.467 %), encontrando que éstos parámetros cumplían con las especificaciones establecidas en la Guía de Validación de Métodos Analíticos editada por el Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, A.C. (2002).

Además, se realizó un análisis de varianza (ANADEVA) de un factor entre las pendientes de cada nivel de concentración encontrando que la F calculada es menor que la F crítica por lo tanto la relación entre la concentración del fármaco y su absorbancia es lineal. Complementariamente, se realizó la prueba del intercepto, encontrando que este es estadísticamente igual a cero. Se calcularon los límites de detección y cuantificación, repetibilidad y exactitud preparando tres niveles de concentración de la curva de calibración en un día diferente. Los límites encontrados fueron 0.7114 μg/mL y 2.1560 μg/mL, respectivamente, la repetibilidad se demostró con el CV=1.1785 % para el día 1 y CV=1.0346 % para el día 2 y la exactitud con un recobro igual a 100.0152 % y el CV=1.7909 %. Estos resultados se muestran en el anexo A.

En el anexo A se presenta también el sistema analítico para alcohol polivinílico. Se preparó la curva de calibración con base en los datos presentados por García (2011) y se encontró un coeficiente de determinación (r^2) de 0.9988, intervalo de confianza para la pendiente de 8.3014-8.5864 y límite de detección de 0.0061 mg/mL y de cuantificación de 0.0186 mg/mL.

1.1 Prueba de estabilidad de principio activo expuesto a la luz

Con el fin de conocer el comportamiento del gluconato de clorhexidina utilizado como principio activo en esta investigación y asegurar su estabilidad durante la preparación de la forma farmacéutica y su evaluación se procedió a realizar una serie de determinaciones previas. La clorhexidina, en sus diferentes presentaciones es un antimicrobiano de amplio espectro utilizado en diferentes preparaciones farmacéuticas, sin embargo, es conocido por ser inestable frente a diferentes condiciones. Nicolay et al (2011) menciona que las soluciones acuosas de sales de clorhexidina son más estables en pH de entre 5 y 8, en donde en un valor mayor a 8, el fármaco precipita en forma de clorhexidina base y en condiciones más ácidas se presenta una degradación gradual por que el compuesto es menos estable. Rowe et al (2009) mencionan factores como la temperatura, la cual no debe superar los 150 °C, la presencia de ácidos orgánicos e inorgánicos así como sales (benzoatos, bicarbonatos, boratos, carbonatos, cloruros, citratos, etc.) en donde la presencia de clorhexidina en concentración mayor a 0.05 % p/v propicia la formación de sales



insolubles y finalmente, indican que este fármaco debe conservarse en contenedores protegidos de la luz ya que de lo contrario se degrada por reacción de polimerización en *p*-cloroanilina.

Para evaluar la estabilidad del fármaco, se obtuvo el espectro de absorción del fármaco en agua desionizada de 0 a 25 horas y con base a su coeficiente de absorptividad específico se calculó la concentración de principio activo a cada tiempo:

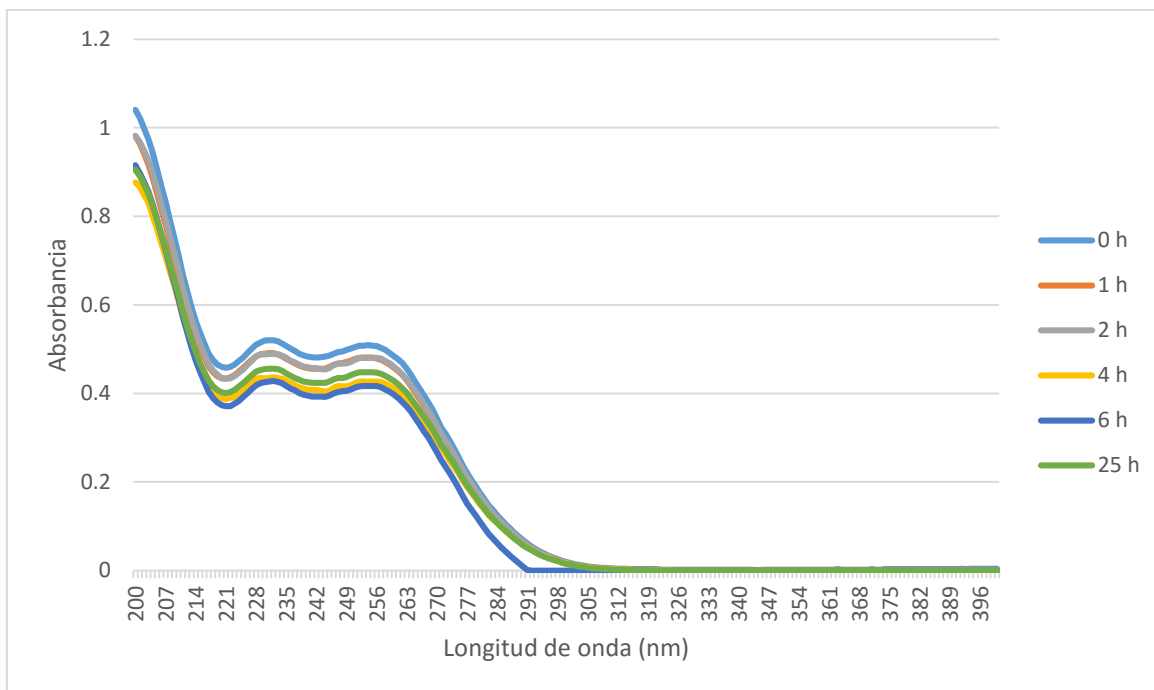


Gráfico 6. Espectro de absorción de gluconato de clorhexidina en agua desionizada pH=6.85 (20 µg/mL) de 0 a 25 horas expuesto a la luz.

Tabla 20. Concentración de gluconato de clorhexidina a diferentes tiempos expuesto a la luz.

Tiempo (h)	Absorbancia a 254 nm	Concentración (µg/mL)	% de gluconato de clorhexidina
0	0.509	20	100
1	0.481	18.89	94.45
2	0.48	18.86	94.3
4	0.426	16.73	83.65
6	0.417	16.38	81.9
25	0.408	16.03	80.15

Se encontró que después de 6 horas de exposición la concentración del fármaco había disminuido a 81.9 %, llegando a 80.15 % a las 25 horas. Es sabido que algunas pruebas requieren un tiempo largo de exposición del fármaco, como la determinación de la eficiencia de encapsulamiento para la que García (2011) mantuvo una agitación magnética de 3 horas, así como liberaciones *in vitro* que pueden durar días o semanas. Por esta razón, se estableció que las muestras que contenían gluconato de clorhexidina debían mantenerse protegidas de la luz y debían ser analizadas en el espectrofotómetro a la brevedad posible.

2. Desarrollo de laminillas orodispersables

2.1 Preformulación

Una vez que se habían determinado las condiciones óptimas para la cuantificación del fármaco, se procedió al desarrollo de las laminillas orodispersables. Como se mencionó en la parte experimental, se seleccionó el método de moldeo con disolvente para su preparación. Morales y McConville (2011) mencionan que dicho método es sin duda el más utilizado en la preparación de estas formas farmacéuticas debido a su facilidad de proceso y el bajo costo que representa el sistema para su aplicación a nivel laboratorio. Además, este método no necesita de equipos como extrusores o la formación de productos intermedios como dispersiones sólidas. También se evitan condiciones de proceso extremas, como la temperatura en el caso de la extrusión en caliente, lo cual tiene, como se mencionó anteriormente, un alto impacto en la estabilidad del principio activo seleccionado.

Se probaron en total seis polímeros como filmógenos y se elaboraron ocho diferentes lotes variando ingredientes de formulación y condiciones de proceso con la finalidad de optimizar la preparación de las laminillas. Los polímeros evaluados fueron: Eudragit® RS 100, Eudragit® RLPO, Eudragit® E100, Carboximetilcelulosa sódica, Pharmacoat® 615 y Pharmacoat® 615 + Carbopol® 974 NF y se prestó especial atención al filmógeno ya que Irfan et al (2015) mencionan que el desarrollo exitoso de las laminillas depende de una justificada selección de los ingredientes de la formulación, en especial del filmógeno, ya que sus propiedades impactan directamente en las características de la forma farmacéutica final, tales como desintegración y propiedades mecánicas. Además, se analizó la compatibilidad del fármaco con los excipientes. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 21. Desarrollo de formulación y proceso para laminillas orodispersables.

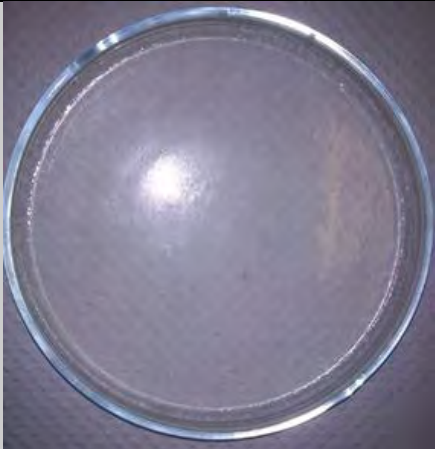
No. formulación	Observaciones	Figura
I	Gelificación inmediatamente después del vertido. Superficie homogénea; No presentaba grumos después del secado.	 Figura 39. Dispersión de HPMC al 8% en glicerol-agua caliente.

Tabla 21. Desarrollo de formulación y proceso para laminillas orodispersables (continuación).

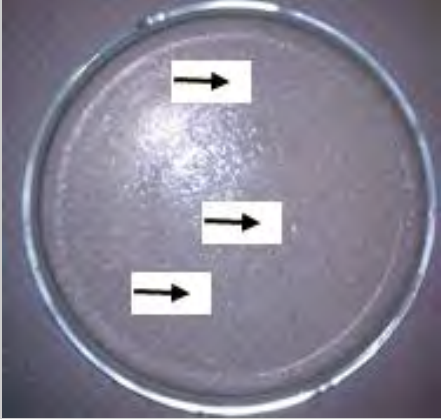
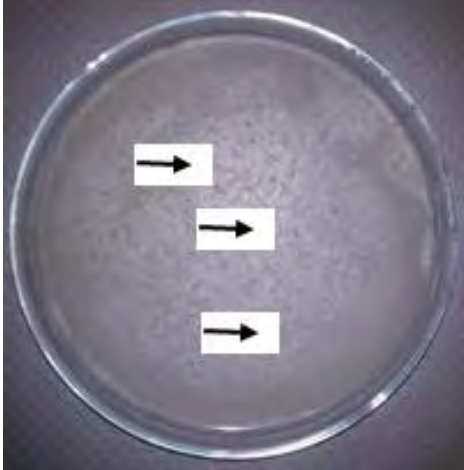
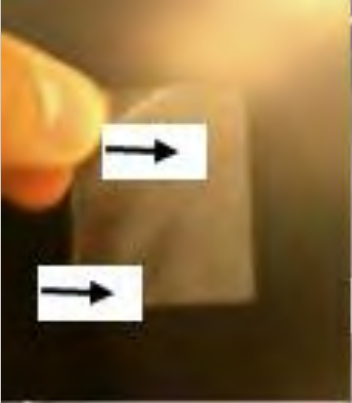
No. formulación	Observaciones	Figura
II	Gelificación inmediatamente después del vertido. Superficie heterogénea; Presentaba grumos después del secado.	 <p data-bbox="852 779 1356 842">Figura 40. Dispersión de HPMC al 10% en glicerol-agua caliente.</p>
III	Gelificación inmediatamente después del vertido. Presentaba grumos después del secado, más que el lote I.	 <p data-bbox="852 1308 1356 1371">Figura 41. Dispersión de HPMC al 12% en glicerol-agua caliente.</p>
IV	Gelificación inmediatamente después del vertido. Presentaba grumos después del secado.	 <p data-bbox="852 1774 1356 1837">Figura 42. Dispersión de HPMC al 8% en glicerol-agua fría, servido en Parafilm®</p>

Tabla 21. Desarrollo de formulación y proceso para laminillas orodispersables (continuación).

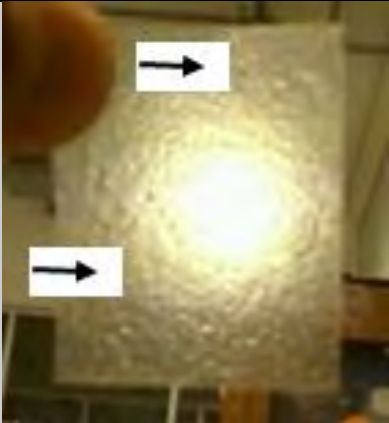
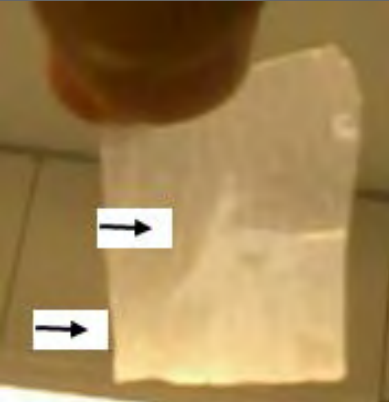

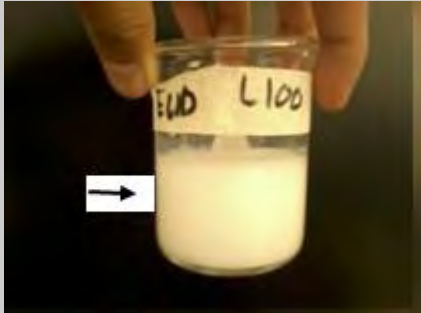


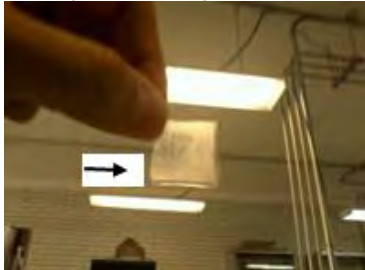
No. formulación	Observaciones	Figura
V	Gelificación inmediatamente después del vertido. Presentaba grumos después del secado.	 <p data-bbox="841 779 1370 869">Figura 43. Dispersión de HPMC al 8% en glicerol-agua fría, servido en portaobjetos de 2.5X7.5 cm.</p>
VI	Dispersión de polímeros translúcida y viscosa. Turbidez y pérdida de viscosidad al agregar el principio activo. Película delgada y flexible. Presentaba opacidad. Bajo contenido químico.	 <p data-bbox="862 1304 1349 1430">Figura 44. Dispersión de HPMC al 3% y Carbopol 9174 PNF al 0.5% en glicerol-propilenglicol-agua fría, servido en portaobjetos de 2.5X7.5 cm.</p>
VII	Turbidez al agregar la trietanolamina en el caso de Eudragit® L 100. Separación de Eudragit® E 100 al dispersar con el agente mucoadhesivo. Turbidez en el caso de Eudragit® RL PO. Presencia de cristales en laminillas después del secado.	 <p data-bbox="834 1745 1378 1871">Figura 45. Dispersión de Eudragit RLPO C al 0.5% e HPMC al 2% en etanol-trietanolamina-agua fría, servido en portaobjetos de 2.5X7.5 cm.</p>

Tabla 21. Desarrollo de formulación y proceso para laminillas orodispersables (continuación).

No. formulación	Observaciones	Figura
VII	<p>Turbidez al agregar la trietanolamina en el caso de Eudragit® L 100. Separación de Eudragit® E 100 al dispersar con el agente mucoadhesivo. Turbidez en el caso de Eudragit® RL PO. Presencia de cristales en laminillas después del secado.</p>	<div style="text-align: center;">  <p>Figura 46. Dispersión de Eudragit L100 C al 0.5% e HPMC al 2% en etanol-trietanolamina-agua fría.</p>  <p>Figura 47. Dispersión de Eudragit RLPO C al 0.5% e HPMC al 2% en etanol-trietanolamina-agua fría.</p> </div>
VIII	<p>Se obtuvo un gel traslúcido y viscoso. Después del secado, se obtuvieron laminillas traslúcidas y flexibles. Sin embargo, fue difícil retirar del molde.</p>	<div style="text-align: center;">  <p>Figura 48. Dispersión de HPMC al 3% en glicerina-agua fría.</p>  <p>Figura 49. Laminillas HPMC al 3% servida en portaobjetos.</p> </div>



Para los lotes I al V se evaluó hidroxipropilmetilcelulosa (Pharmacoat® 615) como filmógeno ya que es el excipiente más utilizado en películas de aplicación farmacéutica, tanto para recubrimientos de tabletas y cápsulas de gelatina dura, así como para películas dispersables (Curtis et al, 2012).

Debido a que los polímeros elegidos como filmógenos determinan el perfil de liberación del fármaco, Juliano et al (2008) demostraron en un estudio sobre la influencia de tres diferentes filmógenos, HPMC, quitosán y alginato de sodio en laminillas bucales de acetato de clorhexidina que aquellas preparadas con alginato y/HPMC permitieron controlar la liberación del fármaco satisfactoriamente.

Se seleccionó glicerol como plastificante para la HPMC ya que, de acuerdo a Sakhare (2012), este excipiente forma agregados que se interponen en las cadenas de polímero, proporcionando mayor flexibilidad a la película, además de que ejerce el efecto plastificante gracias a una combinación de sus propiedades como cosolvenia, baja volatilidad, no cristalinidad e higroscopía. De acuerdo a Irfan et al (2015), la concentración del plastificante varía de entre 0 y 20 % p/p.

Así, en los lotes I, II y III se evaluaron las condiciones de dispersión del polímero en agua desionizada para poder formar una mezcla homogénea que fuera fácil de aplicar en los moldes. Se utilizaron concentraciones de polímero de 8, 10 y 12 % p/v, respectivamente. En el procedimiento de preparación se mencionó que la dispersión del polímero se había realizado en agua caliente pues, de acuerdo a Rowe et al (2009), para preparar soluciones acuosas, se recomienda que la hipromelosa sea dispersada cuidadosamente e hidratada en un volumen correspondiente al 20-30% de la formulación total; el agua debe ser calentada de 80 a 90°C y posteriormente el polímero debe ser añadido. La preparación se realizó como indica éste procedimiento, sin embargo, se observó al momento de dispersar el polímero que se formaban grumos lo cual se atribuyó a que la hipromelosa es insoluble en agua (Rowe et al, 2009) culminando en la gelificación de la mezcla al llevar al volumen de aforo o servir en el molde, impidiendo así asegurar una dispersión uniforme del gel. Para las formulaciones IV y V se decidió dispersar la hipromelosa en una mezcla de agua fría-glicerina ya que en estas condiciones se forma una dispersión coloidal viscosa (Rowe et al, 2009). Sin embargo, la gelificación se presentó al servir la mezcla en el molde y se observaron grumos en la laminilla.

Curtis et al (2012) realizaron un estudio sobre las condiciones de formulación de la hipromelosa y su impacto en las propiedades de las películas preparadas. Indicaron que los protocolos estándar de preparación de películas con este polímero indican que debe ser dispersado en agua caliente (>80 °C) y entonces hidratado a bajas temperaturas (<10 °C); si el polímero es añadido directamente al agua fría, se forman grumos en donde la capa exterior del polímero comienza a hidratarse, formando una capa alrededor del polvo seco, lo que resulta en largos periodos de hidratación, lo cual puede explicar lo sucedido en los lotes I a V. Cabe mencionar que la hidratación del polímero es muy importante para que las cadenas de polímero puedan interactuar con las diferentes superficies de la cavidad bucal. Por esto, estos autores concluyeron que las condiciones óptimas de dispersión involucran la adición del filmógeno a agua a más de 80 °C con velocidades de agitación de entre 400 y 600 rpm por una hora, seguida de una hidratación por 5 horas a 4 °C. El impacto de estas condiciones en las propiedades de las películas resultó en una mayor claridad y mejores propiedades mecánicas.

Siguiendo estas condiciones de dispersión, se preparó el lote VI ahora añadiendo el Carbopol® 974 NF al 0.5 % p/v como agente mucoadhesivo. De acuerdo a los atributos de diseño de la forma



farmacéutica, se requiere que esta se mantenga cierto tiempo en contacto con la mucosa gingival para que las nanopartículas puedan ser liberadas y penetren en la bolsa periodontal. Morales y McConville (2011) indican que los polímeros de las familias de los ácidos poli-acrílicos (Carbopol®) y los derivados de celulosa han sido utilizados ampliamente como agentes mucoadhesivos, formando parte de la llamada primera generación. En este trabajo se decidió evaluar la posibilidad de incluir al carbómero ya que Semalty et al (2008) demostraron que, usando un aparato de desintegración modificado, el tiempo de residencia in vitro de películas formuladas con una combinación de Carbopol® 934P y HPMC E15 fueron de casi el doble que el de las laminillas que sólo contenían HPMC E15. Para ésta formulación se decidió añadir propilenglicol como cosolvente con la intención de facilitar la humectación de los polímeros y así facilitar su dispersión conjunta. A partir de este lote se decidió agregar gluconato de clorhexidina para probar la uniformidad del gel obtenido.

Se encontró, sin embargo, que en el lote se presentó nebulosidad al agregar el principio activo, seguido de pérdida de la viscosidad del gel y presencia de un precipitado blanco. Se sospechó que dichas observaciones se debieron a alguna incompatibilidad del principio activo con los excipientes pues, como ya se mencionó, dicho fenómeno se observó al agregarlo a la mezcla. Además, las laminillas obtenidas presentaban opacidad y una apariencia heterogénea. Para confirmar esta suposición se cuantificó el gluconato de clorhexidina en tres laminillas y los resultados se presentan en la tabla 22.

Tabla 22. Cuantificación de gluconato de clorhexidina en laminillas preparadas con Pharmacoat® 615 y Carbopol 974 PNF.

Laminilla	A 254 nm	mg gluconato de clorhexidina/laminilla
1	0.770	1.6923
2	0.210	0.4615
3	0.151	0.3318

Para las muestras, se cortaron laminillas de 2.5X3 cm (7.5 cm²) con una dosis de 0.5333 mg/cm², se disolvieron en 25 mL de agua desionizada, se aforaron a 50 mL y se determinó la absorbancia de la solución a 254 nm en el espectrofotómetro. La concentración teórica se muestra a continuación:

$$\text{Conc. fármaco} \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = \frac{7.5 \text{ cm}^2}{50 \text{ mL}} * \frac{0.5333 \text{ mg}}{1 \text{ cm}^2} * \frac{1000 \mu\text{g}}{1 \text{ mg}} = 79.995$$

Se esperaba que cada laminilla contuviera 3.999 mg de activo, sin embargo, se obtuvo un valor promedio de 0.8285 mg, correspondiente al 20.71%. De acuerdo a Rowe et al (2009) los carbómeros son compuestos polihidroxilados incompatibles con ciertos materiales catiónicos o altos niveles de electrolitos además de que forman complejos insolubles con ciertos principios activos amino-funcionales a pH neutros, generando nebulización de la solución y pérdida de la viscosidad. Las sales de clorhexidina se consideran compuestos altamente catiónicos ya que derivan de la forma base, la cual tiene una alta capacidad de captar protones gracias a los pares de electrones presentes en el grupo bisguanido (figura 12). Además, según Gordon (2014) los carbómeros forman una dispersión turbia ácida de baja consistencia, sin embargo, cuando la dispersión es neutralizada con una base adecuada se generan cargas negativas alrededor del esqueleto del polímero. La repulsión entre éstas cargas negativas causa que las cadenas del polímero se desenreden por completo en una estructura rígida de alta viscosidad, como se observa en la figura 43. Con base a

lo anterior, al interactuar el gluconato de clorhexidina con las cargas negativas del carbómero neutralizado se formó el precipitado blanco observado y la red del polímero perdió viscosidad.

Cabe mencionar que se consideró necesaria la neutralización con trietanolamina debido al pH que podría presentar el gel por dos razones: la estabilidad del gluconato de clorhexidina, que disminuye en medios ácidos y la posible irritación de la mucosa oral con éstos valores de pH. Gordon (2014) menciona que los geles de carbómeros tienden a ser ácidos.

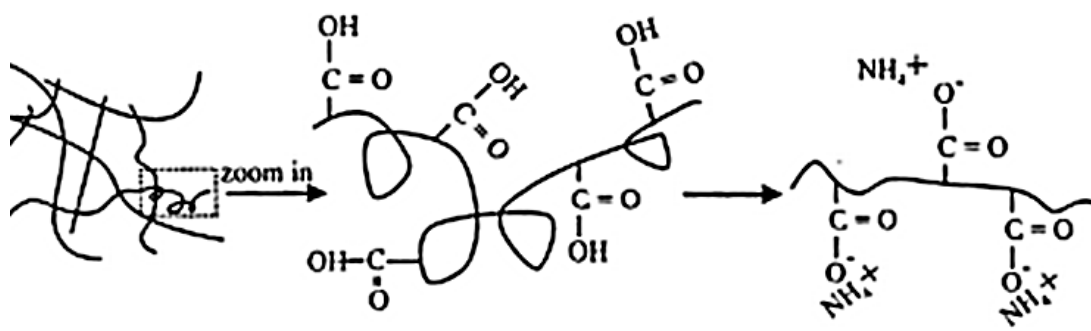


Figura 50. Estructura del gel de carbómero antes y después de neutralizar.

Con base a los resultados obtenidos con el carbómero, se puede decir que la incompatibilidad que presentó con el principio activo podrían descartarlo de la formulación de laminillas orodispersables, sin embargo, de acuerdo a la hipótesis de que la matriz polimérica de las nanopartículas poliméricas protegerá al principio activo de dicha interacción con el carbómero, éste polímero se podría usar en la formulación final. Con base a los resultados obtenidos con las nanopartículas se discutirá la razón de los excipientes seleccionados para la formulación final.

Para el caso del lote VII se probaron diferentes tipos de Eudragit® como filmógenos. Se propuso esta formulación ya que Perumal et al (2008) encontraron que la elaboración de con polímeros de diferentes solubilidades, Eudragit® R100 y quitosán en su caso mejoran la mucoadhesión ya que la adición de un plastificante al Eudragit® reduce la fuerza de agregación causada por la atracción intermolecular del polímero resultando en un aumento de la fuerza de adhesión de la laminilla. En este estudio se reportan fuerzas de adhesión de 443.4 ± 30.96 mN en comparación con los 133.6 ± 27.89 mN del quitosán solo. Perioli et al (2004) reportan que en laminillas elaboradas con Eudragit como filmógeno e hidroxipropilmetilcelulosa como agente mucoadhesivo presentaba tiempos de residencia ex vivo en mandíbula de cerdo de 4 a 5 horas lo cual se atribuye al alto índice de hinchamiento de la HPMC y que le permite interactuar con la mucosa bucal.

Sin embargo, como se puede observar en las figuras 38, 39 y 40 el filmógeno tuvo que dispersarse primero en etanol debido a su baja solubilidad en agua para posterior mezcla con la fase acuosa que contenía hidroxipropilmetilcelulosa y se presentaron cristales en las laminillas después del secado, lo cual se atribuye a la evaporación del etanol ya que el secado se realizó a 42°C por 24 horas. Además de que el etanol promueve la precipitación del principio activo, ya que la solución de gluconato de clorhexidina es miscible con este alcohol sólo 1 en 5 partes (Rowe et al, 2009). Podría optimizarse el proceso de elaboración con esta mezcla de polímeros para aprovechar sus propiedades de tiempo de residencia y mucoadhesión.

Con la carboximetilcelulosa sódica sólo se llevó a cabo una prueba de compatibilidad. Se decidió evaluar este polímero ya que se he reportado que presenta buenas propiedades de hinchamiento y mucoadhesión en comparación con la HPMC y Carbopol (Alanazi et al, 2007). Sin embargo, se encontró que al agregar el fármaco a la dispersión de polímero se presentó la formación de un precipitado blanco (figura 33). Rowe et al (2009) menciona que las sales de clorhexidina son incompatibles con materiales viscosos como goma acacia, alginato de sodio, carboximetilcelulosa sódica, almidón y tragacanto. Además, las incompatibilidades se pueden deber al carácter fuertemente catiónico del gluconato de clorhexidina lo que provoca una interacción con materiales aniónicos como estos polímeros. De acuerdo a Morales y McConville (2011), muchos de estos materiales son utilizados en la fabricación de laminillas mucoadhesivas gracias a su interacción con las capas de mucina.

Con base a la gran cantidad de incompatibilidades del gluconato de clorhexidina con ciertos materiales, se decidió utilizar HPMC como filmógeno, ya que, como se muestra en la figura 33, no se presentó incompatibilidad alguna.

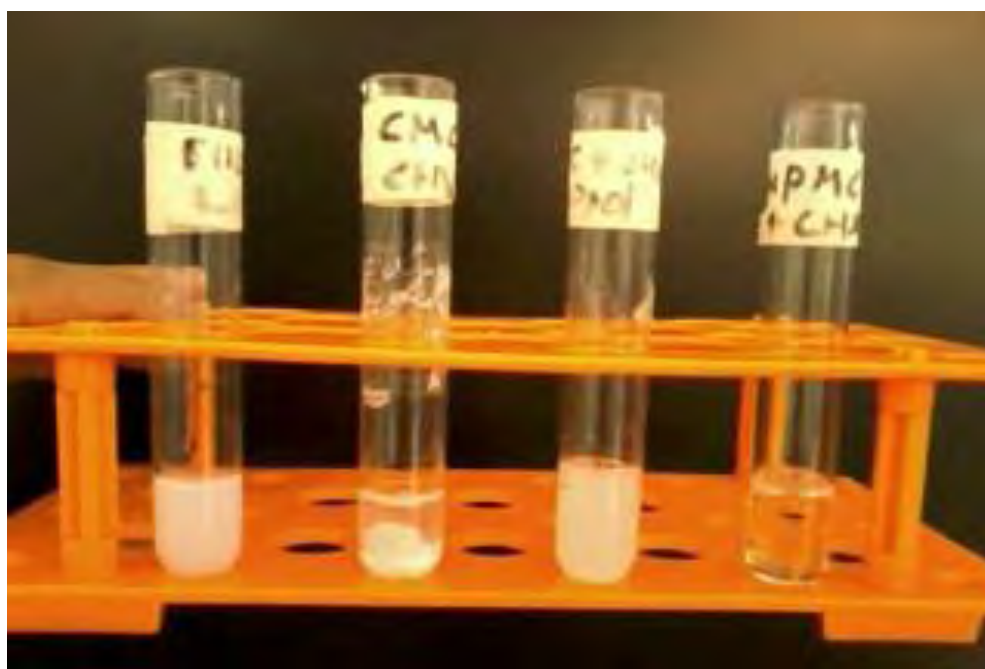


Figura 51. Resumen de compatibilidad del fármaco con diferentes filmógenos: De izquierda a derecha, Eudragit® E 100 + gluconato de clorhexidina, Carboximetilcelulosa sódica + gluconato de clorhexidina, Pharmacoat® 615+Carbopol 974 PNF + gluconato de clorhexidina, Pharmacoat® 615 +gluconato de clorhexidina.

Así, para el lote VIII se utilizó Pharmacoat® 615 nuevamente como filmógeno, glicerol y propilenglicol como plastificantes, manteniendo las condiciones de preparación mencionadas por Curtis et al (2012). Se evaluó la uniformidad de masa y contenido de cinco laminillas y de cinco puntos de una laminilla. Cabe mencionar que para analizar la uniformidad de masa y contenido en las laminillas orodispersables se utilizará el término de desviación estándar relativa (%DER) ya que este término es el utilizado por los compendios como FEUM y USP, además que es el equivalente al coeficiente de variación (CV).



Tabla 23. Evaluación de laminillas orodispersables del lote VIII.

Laminilla	Masa (mg)	Dosis (mg gluconato de clorhexidina/cm ²)	Cantidad de gluconato de clorhexidina/laminilla (mg)
1	90.4	0.422	1.691
2	91.2	0.400	1.600
3	78.7	0.316	1.266
4	76.3	0.400	1.600
5	77.3	0.430	1.720
Promedio	82.78	0.393	1.575
Desviación estándar	7.376	0.045	0.181
Desviación estándar relativa (%DER)	8.910	11.496	11.496

Tabla 24. Evaluación de cinco puntos de una laminilla del lote VIII.

Muestra	Cantidad de gluconato de clorhexidina/laminilla (mg)
1	0.100
2	0.105
3	0.112
4	0.137
5	0.113
Promedio	0.113
Desviación estándar	0.013
Desviación estándar relativa (%DER)	11.603

En el caso de las cinco laminillas, la desviación estándar relativa fue de 8.910 % para masa y 11.496 % para contenido químico, mientras que para los cinco puntos de una laminilla fue de 11.603 %. De acuerdo a la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) 9ª edición (2009) para los procedimientos de *uniformidad de peso* y *uniformidad de contenido* deben seleccionarse no menos de treinta unidades de dosificación y se deben analizar primero diez unidades; los requisitos para la uniformidad se cumplen si el contenido de principio activo en cada una de las diez unidades de dosificación se encuentra dentro del intervalo de 85 % a 115 % del valor declarado y la desviación estándar relativa es menor o igual a 6 %. Si estas condiciones no se cumplieran, se analizan 20 unidades más, ampliando el rango a un contenido de 75 % a 125 % y una desviación estándar relativa no mayor a 7.8 %. Minako et al (2012) prepararon laminillas orodispersables cargadas con dexametasona para terapia antiemética y mencionan que para su análisis de uniformidad de contenido utilizaron los mismos parámetros, que ellos refieren a la Farmacopea Japonesa 15. Irfan et al (2015) aclaran que la uniformidad de contenido se determina estimando el contenido individual de cada laminilla, tal como se procedió en esta investigación.

Aunque el resultado no fue obtenido por el método descrito en la FEUM, con base a la desviación estándar relativa, se puede decir que la variación en el contenido de cada laminilla es muy grande. A su vez, puede estar relacionada con la variación de masa. Esto se puede explicar con base a que el método de moldeo con disolvente es, sin duda alguna, el más usado, sin embargo, la uniformidad de contenido es uno de sus principales inconvenientes.



A pesar de estas variaciones, con los resultados anteriores se identificó a la HPMC como el filmógeno que permite obtener laminillas translúcidas con una apariencia homogénea y flexible, además se determinó que las condiciones de dispersión del polímero eran las adecuadas. Sin embargo, los resultados para uniformidad no fueron satisfactorios, por lo que se decidió establecer nuevas condiciones de proceso para la obtención de laminillas orodispersables.

2.2 Caracterización de laminillas orodispersables y selección de las condiciones de proceso

En esta etapa, se prepararon los seis lotes presentados en la tabla 14 de la parte experimental, seleccionando concentraciones de polímero de 3, 4 y 5% p/v. La concentración de 3% p/v se eligió con base a que fue la proporción que permitió obtener laminillas homogéneas y translúcidas en la etapa anterior. Las proporciones de 4 y 5% se eligieron con base al reporte previo de Shen et al (2013) en donde se optimizaron laminillas de HPMC con nanopartículas, variando la proporción de filmógeno de 4 a 6 %, encontrando que con estos valores se obtenían los mejores resultados en tamaño de las nanopartículas, porcentaje de fármaco liberado y tiempos de desintegración.

Así mismo, para la preparación de éstos lotes se utilizaron moldes de vidrio de 10.6 cm X 16.5 cm para evitar los problemas de uniformidad mencionados y para obtener un mayor número de laminillas por lote.

2.2.1 Contenido químico y uniformidad de contenido

Se evaluó el contenido químico y la uniformidad de contenido. Cabe mencionar que para estas evaluaciones se analizaron sólo las primeras 10 unidades por cada lote ya que el total de unidades obtenidas fue de 32, con las que se evaluó también el pH, tiempo de desintegración y transparencia para homogeneizar los resultados.

Tabla 25. Contenido químico de laminillas orodispersables.

	Lote	Dosis (mg gluconato de clorhexidina/cm ²)	Cantidad de gluconato de clorhexidina (mg) /laminilla	Porcentaje de gluconato de clorhexidina /laminilla (%)
Estufa	3 % p/v filmógeno	0.6770±0.034	3.3852±0.17	97.75±5.037
	4 % p/v filmógeno	0.6810±0.038	3.4050±0.19	98.319±5.508
	5 % p/v filmógeno	0.6884±0.029	3.4420±0.14	99.388±4.202
Desecador	3 % p/v filmógeno	0.6766±0.055	3.3832±0.27	97.69±8.072
	4 % p/v filmógeno	0.70625±0.047	3.5312±0.23	102.997±5.425
	5 % p/v filmógeno	0.6793±0.042	3.3967±0.21	96.562±3.874

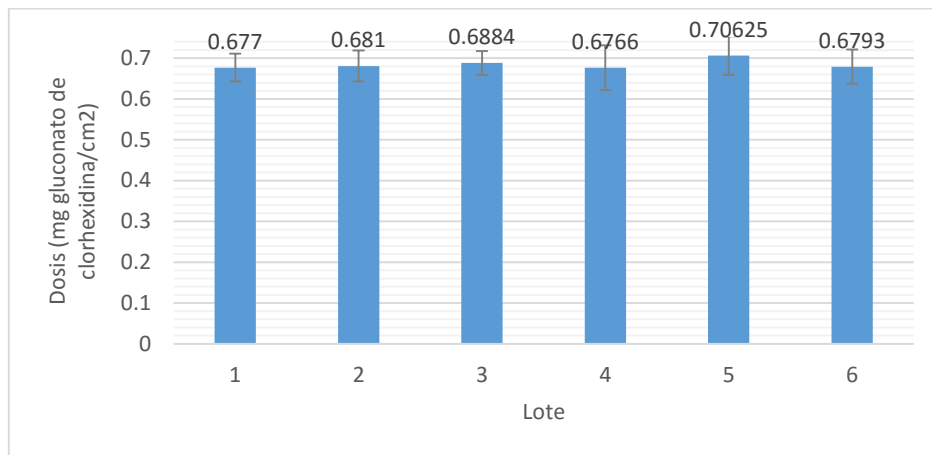


Gráfico 7. Dosis de gluconato de clorhexidina en laminillas orodispersables (mg fármaco/cm²).

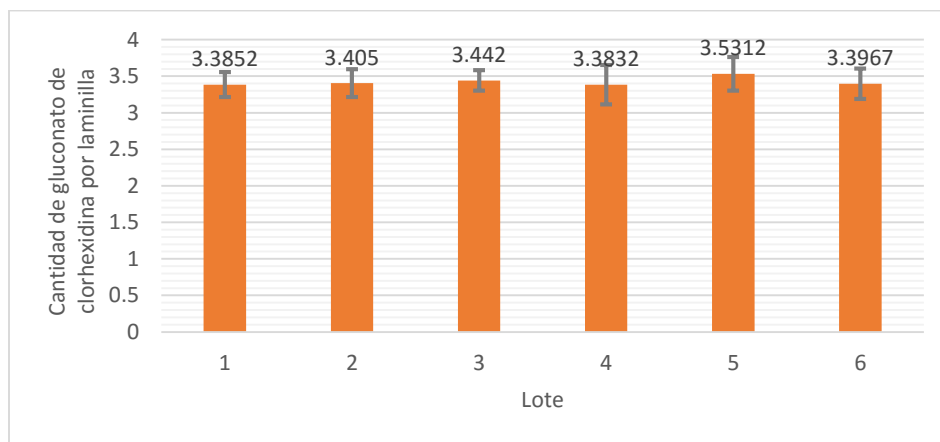


Gráfico 8. Cantidad de gluconato de clorhexidina por laminilla orodispersable.

La dosis promedio de gluconato de clorhexidina incluida en las laminillas orodispersables fue de 0.6847 mg/cm² y de 3.4238 mg/laminilla. De acuerdo a Torres, Díaz y Acosta (2009) la clorhexidina suele presentarse en dos concentraciones, al 0.12 % p/v y al 0.2 % p/v y se recomienda realizar un enjuague con 10 mL de producto a una concentración del 0.2 % p/v y de 15 mL al 0.12 % p/v. Esto es debido a la dosis total de clorhexidina, ya que en el caso del primer producto se liberan 20 mg mientras que en el segundo se obtienen 18 mg, observándose que los resultados con ambas formulaciones son igual de efectivos. En la información para prescribir del enjuague bucal Peridex® proporcionada por la FDA en 2013 se indica como farmacocinética que sólo el 30 % del fármaco, es decir, alrededor de 6 mg se retiene en la cavidad oral después de un enjuague con el producto y que esta cantidad es liberada lentamente en los fluidos bucales. Con respecto a laminillas orodispersables. Bhupinder et al (2011) mencionan que la dosis de clorhexidina incluida en estas formas farmacéuticas es de 12 mg.

Tomando en cuenta que, tal como indica la farmacocinética, más del 70% de la dosis administrada no permanece en la cavidad oral y que la laminilla propuesta sólo se va a aplicar a una parte de la encía en específico, se propuso en este trabajo reducir la cantidad administrada en las laminillas, por eso se incluyeron solamente 3.4238 mg/laminilla para evitar desperdicio del principio activo.



Posteriormente, se calculó el porcentaje de fármaco por cada lote. La uniformidad de contenido se evaluó con los parámetros especificados en la FEUM (2009) para las primeras diez unidades de dosificación antes mencionados. Los resultados se muestran en la siguiente tabla 20 y el gráfico 9.

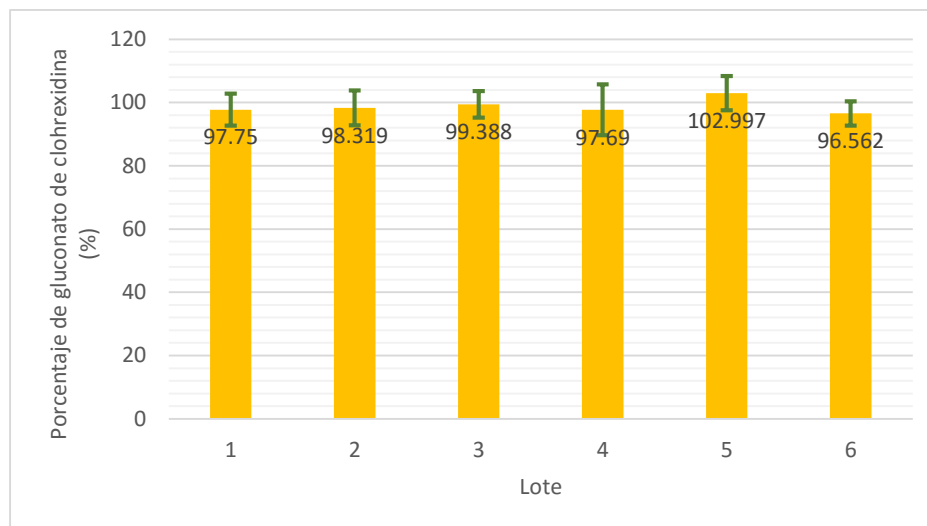


Gráfico 9. Contenido químico de laminillas orodispersables.

Tabla 26. Uniformidad de contenido para laminillas orodispersables.

	Lote	Rango de contenido (%)	Desviación estándar relativa (%DER)	Valor de aceptación para uniformidad de contenido
Estufa	3 % p/v filmógeno	91.374-106.809	5.153	12.84
	4 % p/v filmógeno	90.78-109.302	5.602	13.399
	5 % p/v filmógeno	94.105-104.553	4.228	10.566
Desecador	3 % p/v filmógeno	85.2-105.978	8.263	15.68
	4 % p/v filmógeno	97.31-116.901	5.267	14.519
	5 % p/v filmógeno	90.78-102.534	4.012	11.236



Con respecto al porcentaje de fármaco encontrado en cada lote, el valor promedio fue mayor al 95%. Estos resultados se pueden considerar aceptables en comparación con otros encontrados en la literatura, en donde se reportan valores de 81.4 %, 95.1% y 91-105% (Sakhare, 2011; Juliano et al, 2008; Jones et al, 2013).

Para el rango de contenido, el valor mínimo fue de 85.2 % para el lote 4 y el mayor fue de 116.901% en el lote 5. De acuerdo a las especificaciones de la FEUM (2009), este rango debe oscilar entre 85% y 115% para las primeras diez unidades analizadas, por lo que se podría decir casi todos los lotes cumplen con las especificaciones para el primer ensayo, excepto el lote 5. Para este lote podrían analizarse las veinte unidades siguientes y evaluar si el resultado coincide dentro del rango de 75% a 125%. Para el análisis de uniformidad de contenido se incluyó el parámetro conocido como valor de aceptación (AV) el cual, de acuerdo a la USP 35 NF 30 no debe ser mayor a 15 % para considerar que las masas de las unidades son homogéneas. En el gráfico 10 se muestran los resultados para uniformidad de contenido.

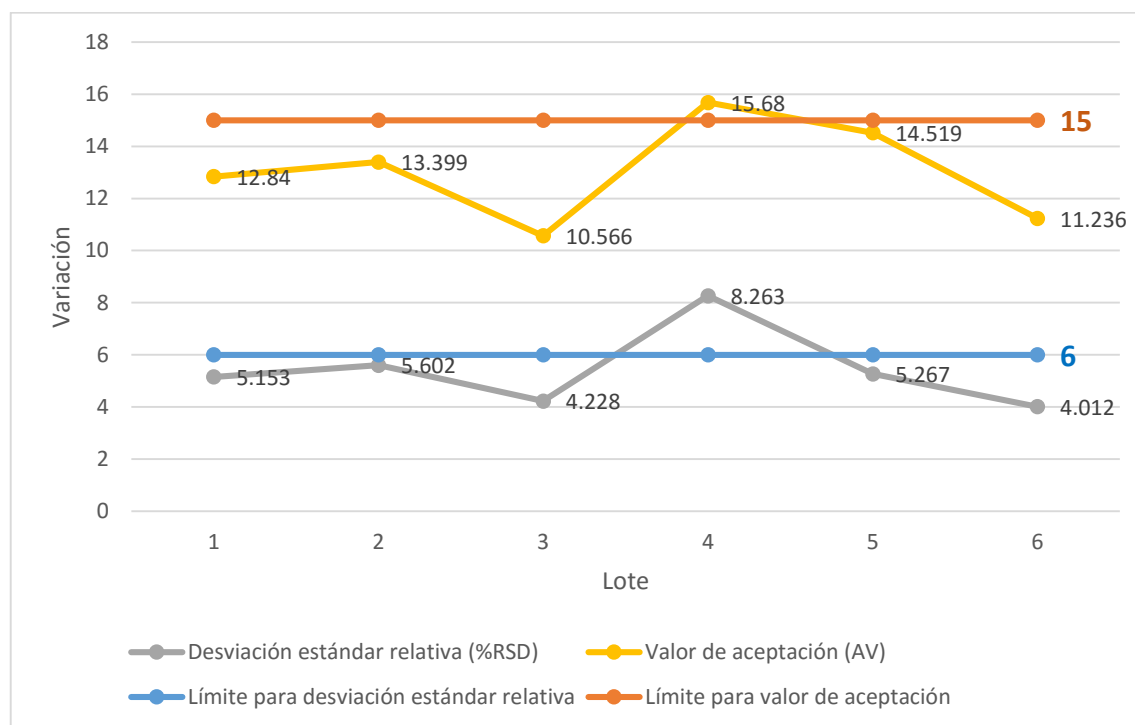


Gráfico 10. Uniformidad de contenido para laminillas orodispersables.

De manera general, se encontraron valores más altos tanto de desviación estándar relativa como de valor de aceptación para aquellos lotes con menos proporción de filmógeno. Estos resultados pueden estar relacionados con las propiedades reológicas de los geles producto de la cantidad de polímero.

Según Morales y McConville (2011) durante la producción de las laminillas se debe poner importante atención a las propiedades reológicas de la solución o la suspensión, así como presencia de burbujas. La reología del líquido determina en gran medida la uniformidad de contenido debido a la distribución del mismo en el molde mientras que el aire atrapado produce una superficie irregular que afecta directamente el contenido de principio activo. Irfan et al (2015) mencionan que la



viscosidad de la solución a vaciar en los moldes es un aspecto crítico en el método de moldeo con disolvente. Murata et al (2010) prepararon laminillas orodispersables de polisacáridos naturales y reportaron que la concentración de pululano del 2 al 8 % aumentaba la viscosidad de la solución de polímero y disminuía la variación del contenido químico debido a que la mezcla era menos propensa a alteraciones en la uniformidad. Con base a lo anterior, se puede decir que debido a la mayor viscosidad de los geles elaborados con mayor proporción de filmógeno la variación de contenido fue menor.

Con respecto a la comparación entre modo de secado, se puede ver en el gráfico 10 que al menos en aquellos lotes con menor proporción de filmógeno (lotes 1 y 4) el valor de los parámetros de variación es mayor en los obtenidos en estufa que aquellos obtenidos en desecador. Esto se puede deber a la mayor cantidad de agua que es evaporada en la estufa con respecto al desecador.

2.2.2 Masa y uniformidad de masa

Se analizó la masa y su uniformidad en cada uno de los lotes. Los resultados se muestran en la tabla 28 y en los gráficos 11 y 12.

Tabla 27. Uniformidad de masa para laminillas orodispersables.

	Lote	Masa (mg)	Desviación estándar relativa (%DER)	Valor de aceptación (AV)
Estufa	3 % p/v filmógeno	84.86±6.749	8.187	19.650
	4 % p/v filmógeno	92.55±4.958	5.267	12.821
	5 % p/v filmógeno	101.59±4.614	4.154	10.834
Desecador	3 % p/v filmógeno	127.35±15.500	12.222	29.334
	4 % p/v filmógeno	150±6.849	6.411	17.346
	5 % p/v filmógeno	176.1±6.161	6.198	15.833

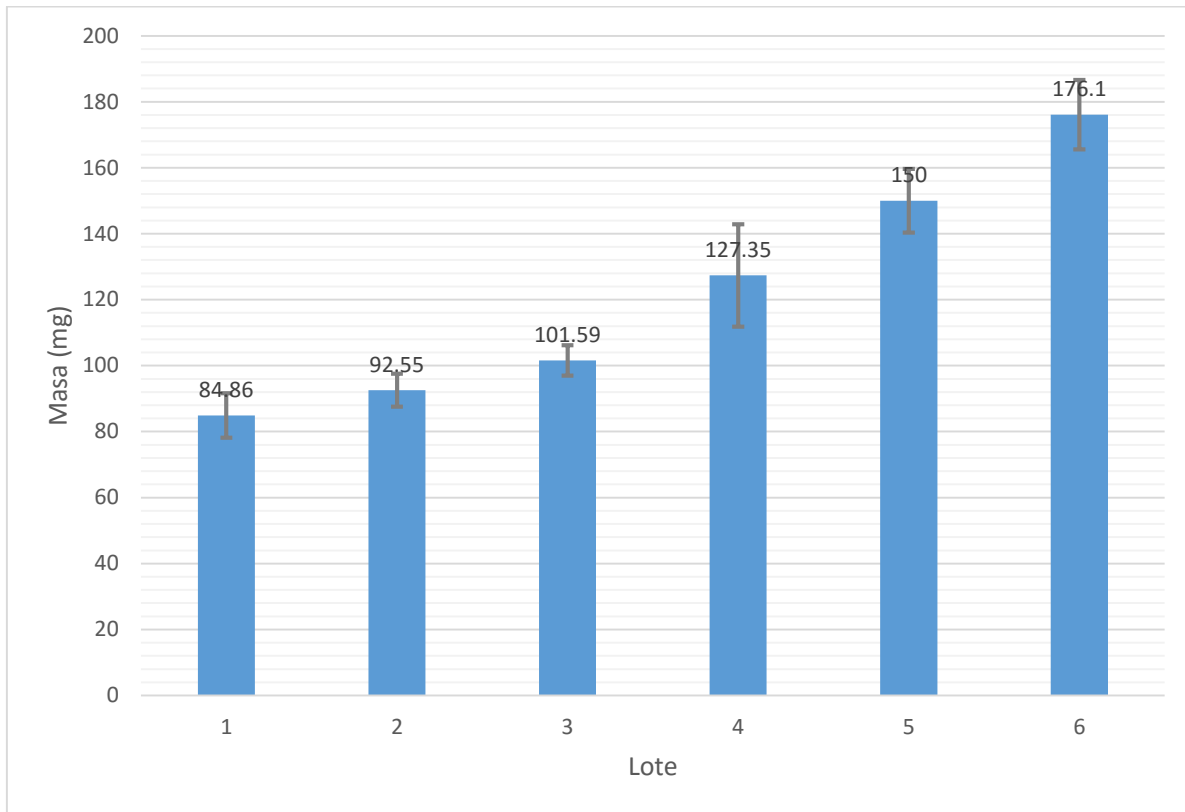


Gráfico11. Masa de laminillas orodispersables.

Se encontró una relación directamente proporcional entre la proporción de filmógeno y la masa de las laminillas, además de que aquellas laminillas obtenidas en desecador presentaron mayor masa en comparación con sus iguales obtenidas en estufa. Con respecto a la proporción de filmógeno, los resultados eran de esperar ya que al aumentar la cantidad de polímero adicionado en la preparación aumenta la cantidad total presente en la laminilla seca. Los resultados obtenidos en las laminillas obtenidas con desecador se pueden explicar con base a la mayor cantidad de agua que es evaporada en la estufa con respecto a los desecadores en cierto periodo de tiempo. Como se mencionó en la metodología, el tiempo de secado para la estufa fue de veinte horas, mientras que para el desecador fue de 48 horas. Preis et al (2014) mencionan que, cuando se elaboran laminillas orodispersables, las condiciones de moldeo y secado influyen en las propiedades finales de la forma farmacéutica y una de estas condiciones críticas es el secado. La producción industrial no permite procesos de secado que requieran grandes periodos de tiempo, por lo que este proceso es acelerado con temperaturas de 40° C, 60° C y 80 °C. A pesar de que el tiempo de secado fue mayor en los lotes obtenidos en desecador, no se igualó la masa con aquellos obtenidos en estufa lo que indica que las diferencias observadas se deben a la cantidad de agua en las laminillas.

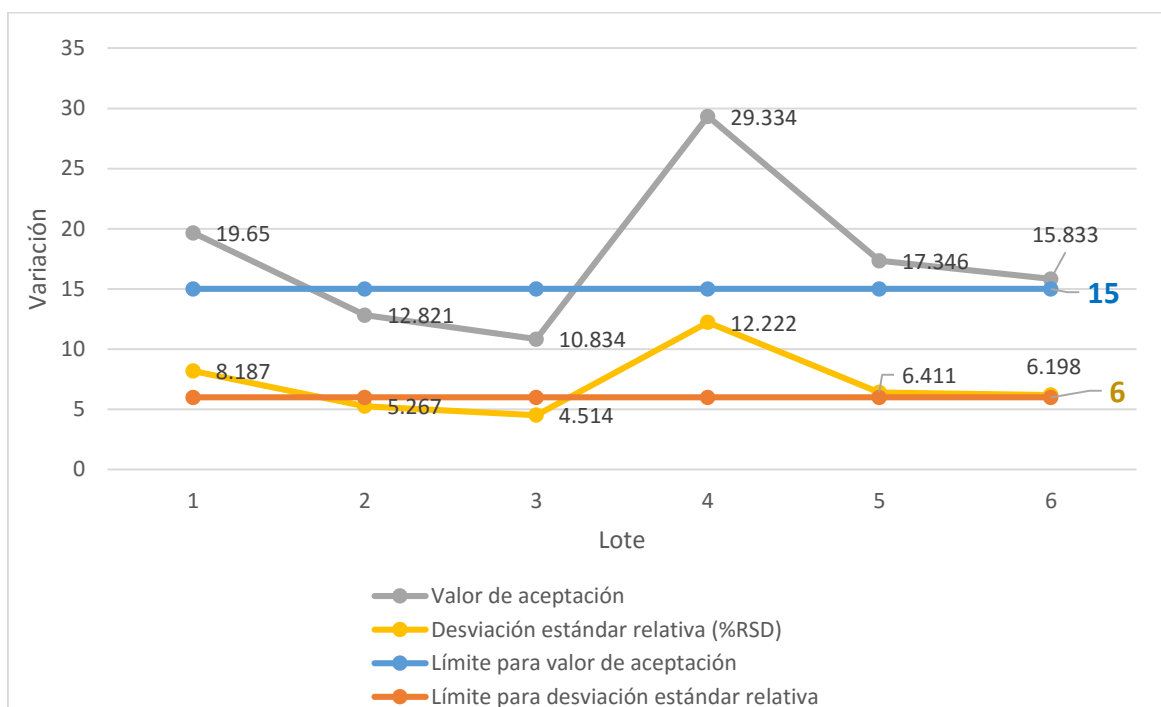


Gráfico 12. Uniformidad de masa para laminillas orodispersables (Desviación estándar y valor de aceptación).

Se encontró que la desviación estándar relativa y el valor de aceptación son mayores en aquellos lotes con menor proporción de filmógeno, así como en aquellos lotes obtenidos en desecador con respecto a los obtenidos en estufa. Retomando lo mencionado para el análisis de uniformidad de contenido, se puede decir que las variaciones observadas se deben a la viscosidad de cada uno de los geles preparados. En (2008), Silvano et al realizaron un estudio sobre el comportamiento reológico de soluciones acuosas de HPMC al 1, 2, 5 y 10 % p/p. En primer lugar, indicaron que, como era de esperarse, la viscosidad de las soluciones disminuía con la disminución en el contenido de HPMC.

Con base a lo anterior se puede justificar el aumento de la variabilidad en masa de las laminillas preparadas con menos proporción de filmógeno. También se puede hacer notar que la temperatura de secado en estufa (40 °C) propicia una menor variación en la masa de las laminillas gracias a que el proceso de obtención se ve acelerado y evita que los valores individuales presenten menos diferencia entre sí.

Con base en los resultados de uniformidad de masa y uniformidad de contenido, se puede decir que el lote que presenta las mejores propiedades es aquel secado en estufa y con mayor proporción de filmógeno, es decir el lote número 3, sin embargo, se continuará con el análisis de los demás parámetros de optimización para dar una conclusión.

2.2.3 pH

Se evaluó el pH de las laminillas obtenidas en cada lote. Con respecto a este parámetro, no existe un método oficial de compendio que permita su análisis para este tipo de formas farmacéuticas. Bhupinder et al (2011) así como Bala et al (2013) reportan que la laminilla se deja en contacto con



un gel de agarosa al 1.5 % p/v y entonces el pH se mide empleando papel indicador. Irfan et al (2015) indican que el pH de la laminilla se determina colocándola en una caja de Petri y subsecuentemente se moja con agua desionizada, registrando el valor al tocar la superficie de la laminilla con un par de electrodos. Cabe mencionar que estos autores denominan al parámetro como **“pH superficial”** ya que en su método de medición sólo la superficie de la laminilla entra en contacto con el fluido de disolución, simulando su colocación sobre las superficies bucales.

En esta investigación se disolvió la laminilla en 20 mL de saliva simulada (pH=6.85) y se registró el pH con un potenciómetro. Panda y Dey (2012) mencionan un procedimiento similar al indicar que la laminilla debe dejarse en contacto con agua desionizada y después de una hora se registra el valor de pH. Los resultados se muestran en la tabla 29 y el gráfico 13.

Tabla 28. Valores de pH para laminillas orodispersables.

Lote	1	2	3	4	5	6
pH	7.24±0.04	7.48±0.07	7.33±0.09	7.43±0.05	7.34±0.02	7.35±0.08

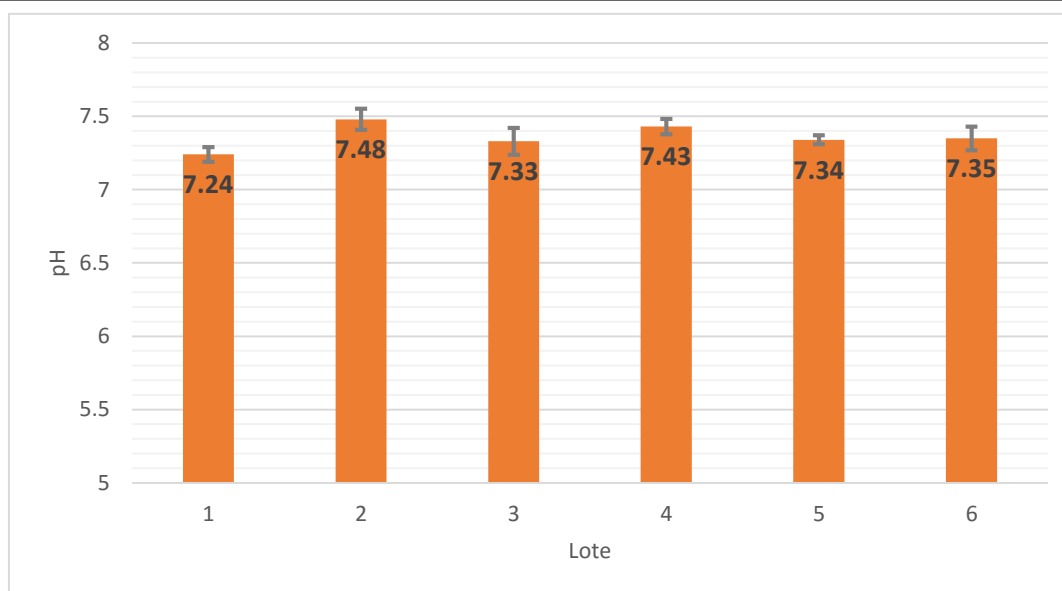


Gráfico 13. pH de laminillas orodispersables.

El valor promedio osciló entre 7.24 y 7.48. Alanazi et al (2007) reportan valores de entre 5.6 y 6.4 para laminillas cargadas con ketorolaco; Rajesh, Prazanna y Nagaraju (2014) prepararon laminillas con valsartán y encontraron que su valor de pH osciló entre 6.11 y 6.88 mientras que Perumal et al (2008) reportan valores de 6.7 a 6.8 para laminillas con clorhidrato de propanolol.

El valor encontrado para laminillas de gluconato de clorhexidina es superior a pesar de que el pH del fluido salivar simulado utilizado en este proyecto fue de 6.74. Anroop et al (2013) indican que la naturaleza química del fármaco y los excipientes influyen en el pH de las laminillas, por ejemplo, se ha reportado que un incremento en el contenido de la polivinilpirrolidona disminuye proporcionalmente el pH de las laminillas. En este caso, el aumento del pH se puede atribuir al



principio activo. Yodkhum y Phaechamund (2010) prepararon geles de almidón con gluconato de clorhexidina para tratamiento periodontal y encontraron un aumento de 4.635 a 5.993 en el valor de pH para concentración de 0 % p/p a 10 % p/p lo cual atribuyeron al carácter fuertemente básico de la molécula de clorhexidina, la cual se presenta en forma dicatiónica. Además, de acuerdo a Rowe et al (2009), el pH de las soluciones de gluconato de clorhexidina, como la empleada en la preparación de las laminillas, tiene un rango de pH de 5 a 7.

La principal preocupación con respecto al pH de las laminillas consiste en que un valor muy ácido o muy alcalino puede causar daños a la mucosa oral lo que provoca incomodidad por parte del paciente por lo que se requiere que no se sobrepase el intervalo de neutralidad de la saliva humana, de 5.8 a 7.5 (Perumal et al, 2013). Como se puede ver, el pH de las laminillas no sobrepasa estos límites.

2.2.4 Tiempo de desintegración

Se analizó el tiempo de desintegración de las laminillas preparadas. Buchi et al (2013) mencionan que la importancia de los estudios de desintegración reside en que dan una idea acerca de las características de disolución ya que en este tipo de formas farmacéuticas los procesos de desintegración y disolución son difíciles de distinguir. Estos autores proponen un método sencillo en el que se coloca la laminilla en 125 mL de saliva simulada con agitación magnética y se detecta el momento en el que la laminilla pierde su integridad. Por su parte, Patel et al (2014) reportan dos métodos diferentes:

- a) Método de goteo: una gota de agua desionizada se vierte en la laminilla sujeta en una de las paredes de la caja Petri y se registra el tiempo necesario para que la laminilla se disuelva.
- b) Método de caja Petri: la laminilla se coloca en 2 mL de agua desionizada en una caja Petri y se registra el tiempo en el que se disuelve.

Irfan et al (2015) mencionan que los aparatos mencionados en las farmacopeas oficiales son los utilizados normalmente para analizar la desintegración de una laminilla, aunque no existen guías oficiales. En esta investigación se utilizó una adaptación de la canastilla de desintegración de la USP, la cual se muestra en la sección de metodología y que evitó que la laminilla flotara en el medio durante la prueba, con 900 mL de saliva simulada a 37 ± 0.5 °C. Los resultados se muestran en la tabla 30 y el gráfico 14.

Tabla 29. Tiempo de desintegración de laminillas orodispersables.

Lote	1	2	3	4	5	6
Tiempo de desintegración (s)	30.33±3.55	48.33±2.25	67.66±10.11	29.33±3.26	51.83±3.76	82.16±10.49

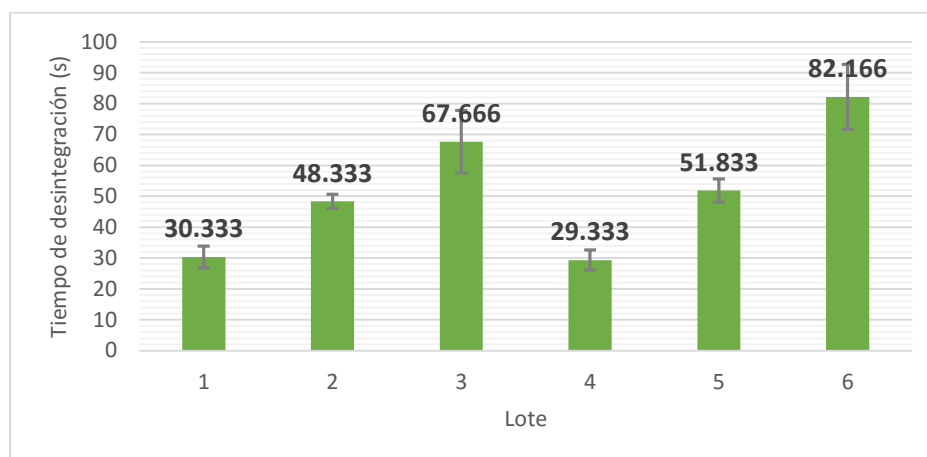


Gráfico 14. Tiempo de desintegración de laminillas.

Se puede observar que el tiempo de desintegración aumenta conforme aumenta la proporción de filmógeno en las laminillas, siendo el mayor valor para los lotes de 3 % p/v de filmógeno de 30.33 segundos y para los de 5 % p/v de 82.166.

Con respecto a otros resultados encontrados en la literatura, estos resultados se pueden considerar comparables. Buchi et al (2013) reportan valores de máximo 1.66 segundos con el método de goteo y de 33.66 segundos con el método de caja Petri para laminillas de HPMC E5 cargadas con sulfato de salbutamol. Chaudary et al (2013) prepararon laminillas de HPMC y puluano que contenían clorhidrato de ganisetrón encontrando tiempos de desintegración para todas las formulaciones menores a 60 segundos. Rajesh, Prazanna y Nagaraju (2014) reportaron valores de 54 a 84 segundos para todos sus lotes y de 57 segundos para lotes preparados con HPMC E5.

Para verificar si los factores estudiados tenían un efecto significativo en el tiempo de desintegración de laminillas, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANADEVA) de dos factores con varias muestras por grupo.

Tabla 30. Análisis de varianza de dos factores (proporción de filmógeno y modo de secado) con varias muestras por grupo para tiempo de desintegración de laminillas.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Proporción de filmógeno	12237.055	2	6118.527	143.965	4.1863E-16	3.315
Modo de secado	289	1	289	6.8	0.014	4.170
Interacción	381.5	2	190.75	4.488	0.019	3.315
Dentro del grupo	1275	30	42.5			
Total	14182.555	35				

Se llevó a cabo el siguiente planteamiento de hipótesis para la proporción de filmógeno:



H_0 = La media de los tiempos de desintegración de los lotes de laminillas preparadas con diferentes proporciones de filmógeno son iguales.

H_a = La media de los tiempos de desintegración de al menos un lote de laminillas preparadas con diferentes proporciones de filmógeno es diferente.

El criterio para el contraste de hipótesis fue el siguiente:

Si $F_{cal} < f_c$ No se rechaza la H_0

Si $F_{cal} \geq f_c$ Se rechaza la H_0

$$F_{cal} = 143.965 > F_c = 3.315$$

Como $F_{cal} > F_{crítica}$, se rechaza la hipótesis nula y se dice que la media de los tiempos de desintegración de al menos un lote de laminillas preparadas con diferentes proporciones de filmógeno son diferentes, por lo tanto este factor tiene un efecto significativo con un 95% de confiabilidad. Para encontrar los lotes que son diferentes, se llevó a cabo una prueba de Tukey, ya que el análisis de varianza sólo indica si existen diferencias entre los tratamientos pero la prueba de Tukey identifica a los tratamientos que originan las variaciones.

Tabla 31. Prueba de Tukey para el tiempo de desintegración de laminillas.

Modo de secado	Comparación de lotes	Valor absoluto de la diferencia entre medias	Diferencia honestamente significativa (HSD)
Estufa	3 % p/v y 4 % p/v	18	9.288
	3 % p/v y 5 % p/v	37.333	
	4 % p/v y 5 % p/v	19.333	
Desecador	3 % p/v y 4 % p/v	22.5	9.288
	3 % p/v y 5 % p/v	52.833	
	4 % p/v y 5 % p/v	30.333	

De acuerdo a la prueba de Tukey, los tres tratamientos son diferentes entre sí ya que el valor absoluto de la diferencia entre medias es mayor que la diferencia honestamente significativa. Estos resultados pueden explicarse en función de la proporción de filmógeno y el mecanismo de desintegración del mismo. La hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) es un polímero hidrofílico, no iónico y resistente a enzimas que es estable a pH de entre de 3 a 11 cuya interacción con medios acuosos se rige por absorción de agua (incluso en forma de vapor), hinchamiento y erosión y, finalmente, incremento de la difusividad debido a la hidratación.

Con base a estas propiedades de de la HPMC y al aumento de la proporción se puede explicar las diferencias encontradas en los tiempos de desintegración de las laminillas. Además, Repka, Chen



y Chan (2014) incluyeron nanopartículas cargadas con herpetrion e incluidas en laminillas de HPMC en donde indicaron que el tiempo de desintegración aumentó con respecto a la concentración de HPMC (4 a 6 % p/v) ya que, después de la humectación de la laminilla, la viscosidad producida por la absorción de agua aumenta el tiempo de hidratación y de desintegración.

Con base al mismo análisis de varianza de dos factores para el tiempo de desintegración, para el modo de secado el juego de hipótesis planteado fue el siguiente:

H_0 = La media de los tiempos de desintegración de los lotes de laminillas preparadas con dos modos de secado son iguales.

H_a = La media de los tiempos de desintegración de al menos un lote de laminillas preparadas mediante dos modos de secado es diferente.

El criterio para el contraste de hipótesis fue el siguiente:

Si $F_{cal} < f_c$ No se rechaza la H_0

Si $F_{cal} \geq f_c$ Se rechaza la H_0

$$F_{cal} = 4.4885 > F_c = 3.315$$

Como $F_{cal} > F_{crítica}$, se rechaza la hipótesis nula y se dice que la media de los tiempos de desintegración de al menos un lote de laminillas preparadas con diferentes modos de secado son diferentes, por lo tanto este factor tiene un efecto significativo con un 95% de confiabilidad. Para determinar los lotes que eran diferentes se aplicó la prueba de t de student a cada par de lotes:

Tabla 32. Prueba t de student para tiempo de desintegración de laminillas.

Lotes	$t_{calculada}$	$t_{crítica}$
1 (3 % p/v)-Estufa 4 (3 % p/v)-Desecador	0.507	2.228
2 (4 % p/v)-Estufa 5 (4 % p/v)-Desecador	-1.954	2.228
3 (5 % p/v)-Estufa 6 (5 % p/v)-Desecador	-2.436	2.228

El planteamiento de hipótesis es el siguiente:

H_0 =No existen diferencias significativas entre el tiempo de desintegración de laminillas preparadas obtenidas por secado con estufa y aquellas obtenidas en desecador.

H_a =Existen diferencias significativas entre el tiempo de desintegración de laminillas obtenidas por secado con estufa y aquellas obtenidas en desecador.



Estadístico de contraste:

Si $|t_{\text{calculada}}| \leq t_{\text{crítica}}$ No se rechaza H_0

Si $|t_{\text{calculada}}| > t_{\text{crítica}}$ Se rechaza H_0

De acuerdo a la tabla 29, sólo en el caso de los lotes preparados con 5 % de filmógeno se cumple la condición de que $t_{\text{calculada}}$ es mayor que $t_{\text{crítica}}$, ya que $|-2.436| > 2.228$ por lo tanto se rechaza la hipótesis nula y se dice que existen diferencias significativas en el tiempo de desintegración laminillas obtenidas por secado con estufa y aquellas obtenidas en desecador preparadas con 5 % p/v de filmógeno.

Además del efecto del modo de secado en la uniformidad de contenido y de masa, se ha reportado que este factor influye en el tiempo de desintegración de laminillas. Preis et al (2014) prepararon laminillas de diferentes polímeros evaluando el secado a 21°C por 48 horas, después de lo cual los lotes fueron sometidos a temperaturas de 40° C, 60° C y 80° C encontrando que a 40° C el tiempo de desintegración aumentaba y al 60° C y 80° C no se presentaba desintegración, superando los 600 segundos. Sin embargo, estos autores señalan que el efecto depende de la composición de la laminilla y del tipo de polímero utilizado, encontrando en su trabajo que sólo en los lotes preparados con hidroxietilcelulosa y ácido poliacrílico se encontró un efecto significativo; en los lotes preparados con HPMC el efecto fue despreciable. Probablemente el hecho de que el lote 6 presentó una diferencia significativa con respecto al lote 3 se deba a la masa de las laminillas, cuyo promedio fue mayor a todos los demás lotes (lote 3-101.59 y lote 5-176.1).

En el análisis de uniformidad de masa y contenido químico se indicó que el lote 3 era el que mejor características presentaba sin embargo, contrastando con los resultados de tiempo de desintegración y con base a que en este tipo de formas farmacéuticas este parámetro se debe minimizar, se puede decir que el lote 1 es el que presenta las mejores características ya que tiene un valor de aceptación para uniformidad de contenido de 12.84 y una desviación estándar de 5.153, ambos parámetros menores a sus valores límite de tolerancia, además de una desintegración de 30.333 segundos.

2.2.5 Análisis de laminillas orodispersables por colorimetría y microscopía electrónica de barrido

Como parámetro organoléptico se evaluaron las laminillas por colorimetría. De acuerdo a Bala et al (2013) las propiedades organolépticas deseadas de una laminilla dispersable incluyen el color, sabor y la textura. Debido a que la formulación está destinada a desintegrarse en la cavidad oral debe poseer propiedades organolépticas aceptables por parte del paciente. En la figura 52 se muestran las laminillas del lote 1.

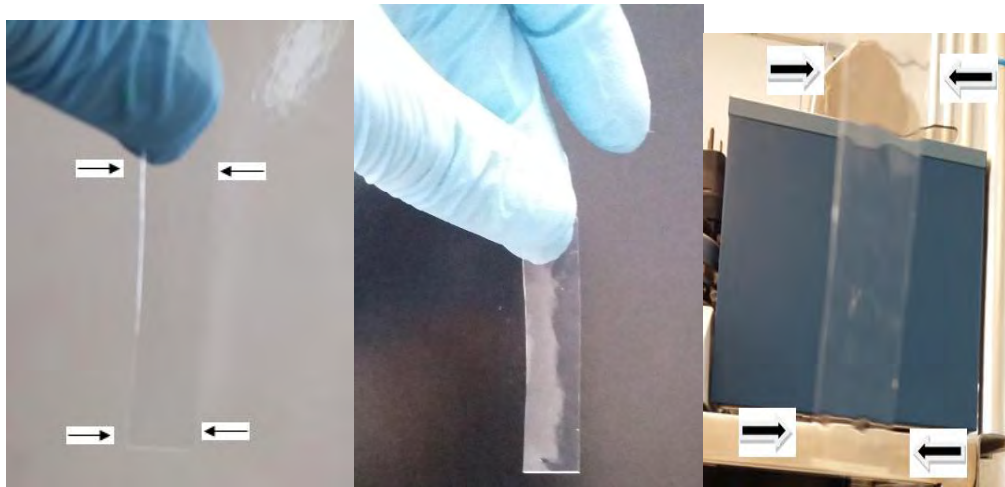


Figura 52. Apariencia de las laminillas orodispersables del lote 1.

Como se puede observar, se obtuvieron laminillas incoloras, traslúcidas, suaves y flexibles, con superficie homogénea y sin grumos. Esta apariencia se debe a la correcta dispersión del filmógeno durante la preparación ya la ausencia de incompatibilidades, como ya se explicó en el análisis de la preformulación. Para proporcionar datos cuantitativos sobre apariencia y demostrar que las laminillas realmente eran transparentes y no presentaban color se utilizó un colorímetro, equipo que utiliza el espacio para el color llamado CIE (Commission Internationale de l'Éclairage). De acuerdo a Becerril (2013), el espacio CIE $L^* a^* b^*$ permite especificar estímulos de color en un espacio tridimensional. El eje L^* es luminosidad (lightness) y va de 0 (negro) a 100 (blanco). Los otros dos ejes de coordenadas son a^* y b^* y representan la variación entre rojizo (120)-verdoso (-120) y amarillento (120)-azulado (-120), respectivamente. Los resultados se muestran en la tabla 34 y el gráfico 15.

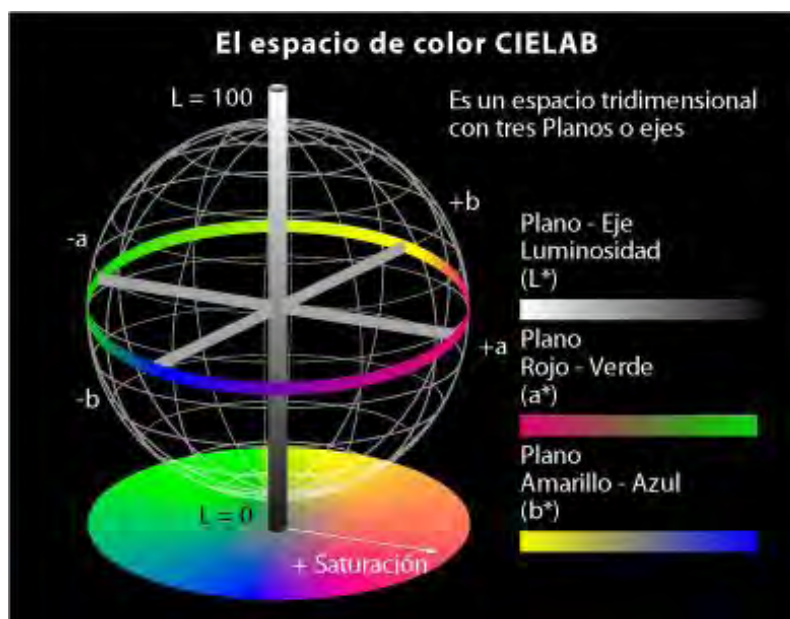


Figura 53. Espacio CIE $L^* a^* b^*$ (Tomada de Becerril, 2013).



Tabla 33. Evaluación de laminillas orodispersables en colorímetro.

	Lote	*L	*a	*b
Estufa	3 % p/v filmógeno	12.186	-0.036	-0.035
	4 % p/v filmógeno	8.53	0.166	0.253
	5 % p/v filmógeno	9.89	-0.163	-0.406
Desecador	3 % p/v filmógeno	11.1	-0.073	-0.13
	4 % p/v filmógeno	10.146	0.07	0.176
	5 % p/v filmógeno	10.76	-0.056	-0.16

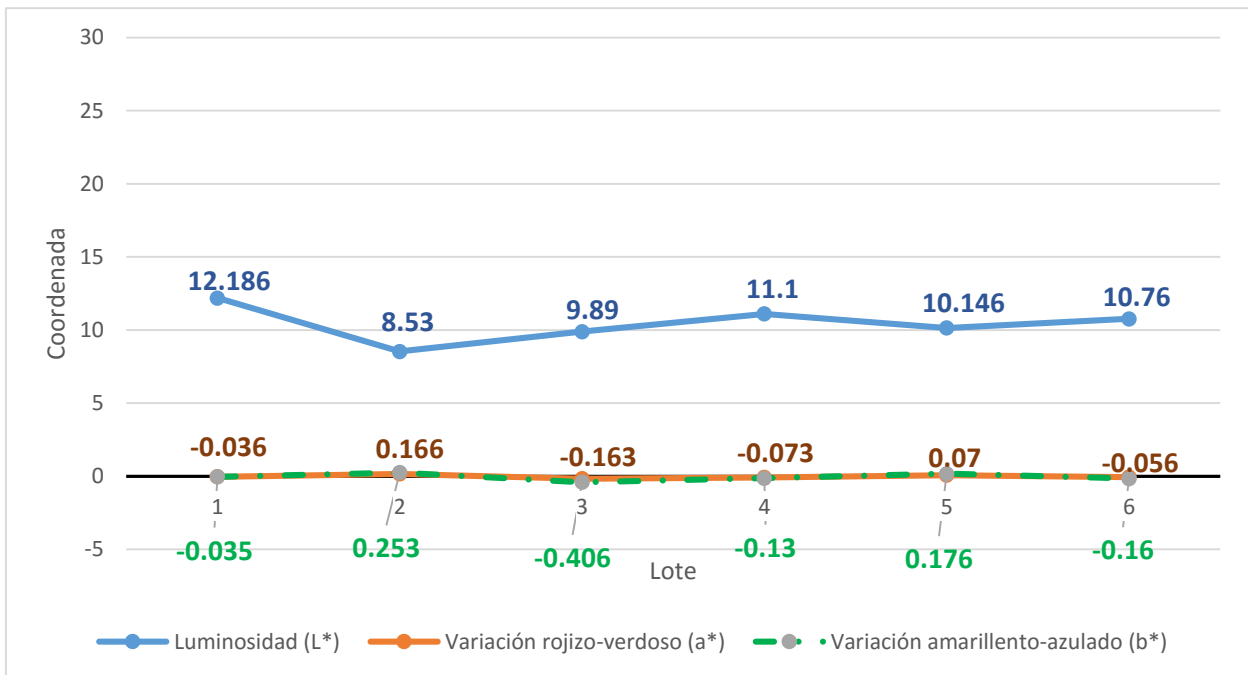


Gráfico 15. Parámetros del CIE para laminillas orodispersables.

Con respecto a la luminosidad el valor menor fue de 8.58 para el lote 2 y el mayor fue de 12.186 para el lote 1, valores muy cercanos al negro (0). De acuerdo a Zuñiga et al (2013) la apariencia de una laminilla depende de su habilidad para dispersar y absorber ondas de luz en la región visible

del espectro electromagnético; estos fenómenos determinan la transparencia, opacidad y cromaticidad de una laminilla. Curtis et al (2012) indican que una calidad óptica pobre presente en las laminillas puede deberse a algunos defectos en la superficie o dentro de la misma provocando un índice de refracción no uniforme y que estos defectos pueden deberse a algunos fenómenos como cristalización de sustancias dentro de la laminilla.

Como se puede ver, los valores de luminosidad son muy inferiores con respecto al valor máximo (100) como para considerar que la estructura interna de la laminilla afecta de manera considerable la dispersión de la luz y por lo tanto se puede decir que su estructura es homogénea. Para corroborar estos resultados, se analizaron las laminillas con microscopía electrónica de barrido. Los resultados se muestran en la figura 48 (se presenta una marca señalada con flechas para diferenciarla del resto de la superficie).

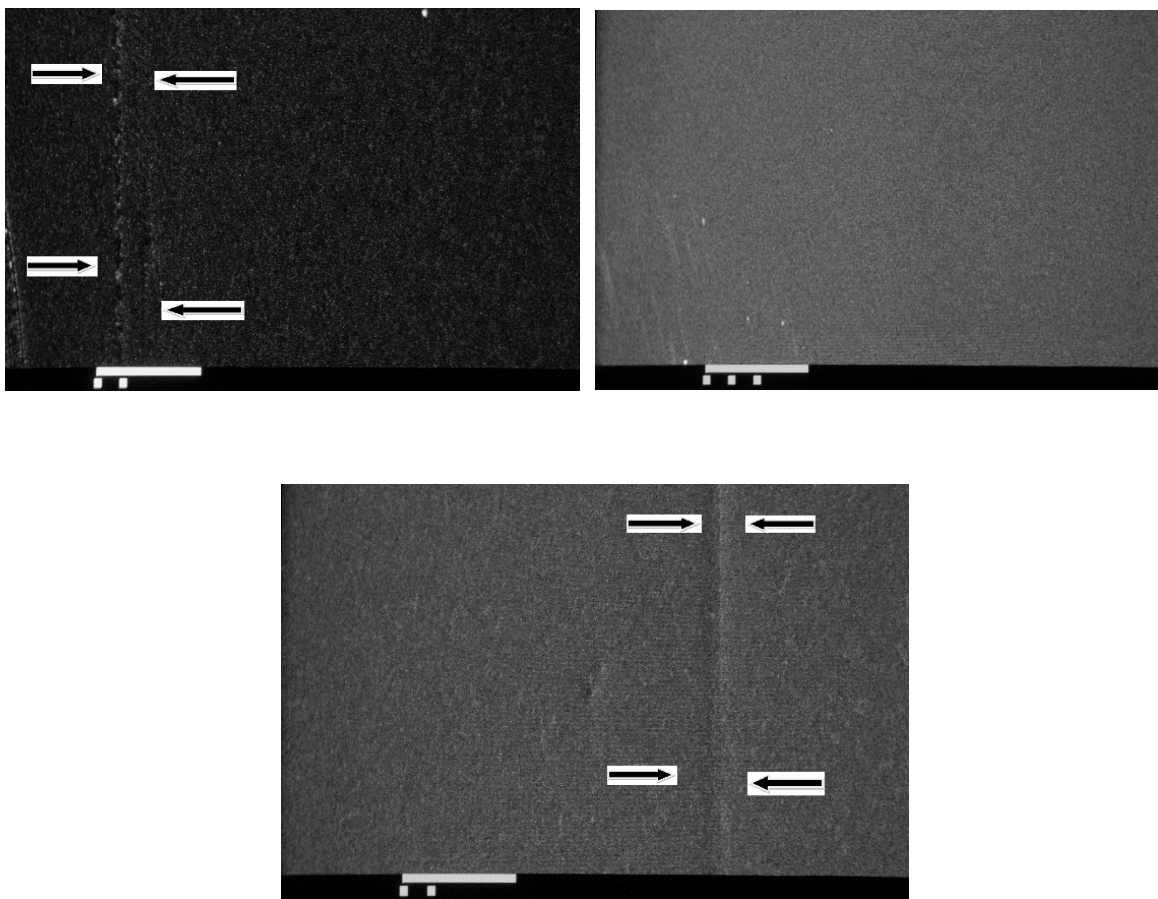


Figura 54. Microfotografías de laminillas orodispersables del lote 1 (Barra= 1 μ m).

Irfan et al (2015) mencionan a la microscopía electrónica de barrido es una de las principales técnicas que permiten analizar la morfología de las laminillas, en donde la ausencia de poros y la presencia de una superficie uniforme indica buena calidad de las preparaciones. Se puede decir que las laminillas de gluconato de clorhexidina preparadas en este trabajo son transparentes gracias a su estructura homogénea.



Con respecto a la cromaticidad de las laminillas representadas por los ejes rojizo-verdoso y amarillento-azulado, los valores fueron muy pequeños comparados con los valores límite para estos ejes (120, -120) y oscilaron alrededor de cero independientemente del lote de laminillas, con lo que se puede decir que las laminillas no presentan color. La única razón por la que las laminillas podrían presentar color sería por una inestabilidad del gluconato de clorhexidina provocada por la temperatura de secado de las laminillas ya que como se mencionó anteriormente, este principio activo puede degradarse en *p*-cloroanilina (color anaranjado-rojizo) bajo efecto del calor. Con base a que se demostró que las laminillas son acromáticas, se puede también decir que el secado no afectó la estabilidad del fármaco.

2.2.6 Análisis de laminillas orodispersables por calorimetría diferencial de barrido

Se analizaron las laminillas orodispersables del lote 1 por calorimetría diferencial de barrido. De acuerdo a Anroop et al (2013), dentro de la caracterización de películas orodispersables se incluye el análisis térmico de las mismas el cual evidencia el estado del fármaco dentro de la forma farmacéutica. Cualquier cambio en un pico endotérmico o exotérmico o un ensanchamiento del mismo representa directamente una transición de fase, recristalización o interacción molecular del fármaco contenido dentro de la película.

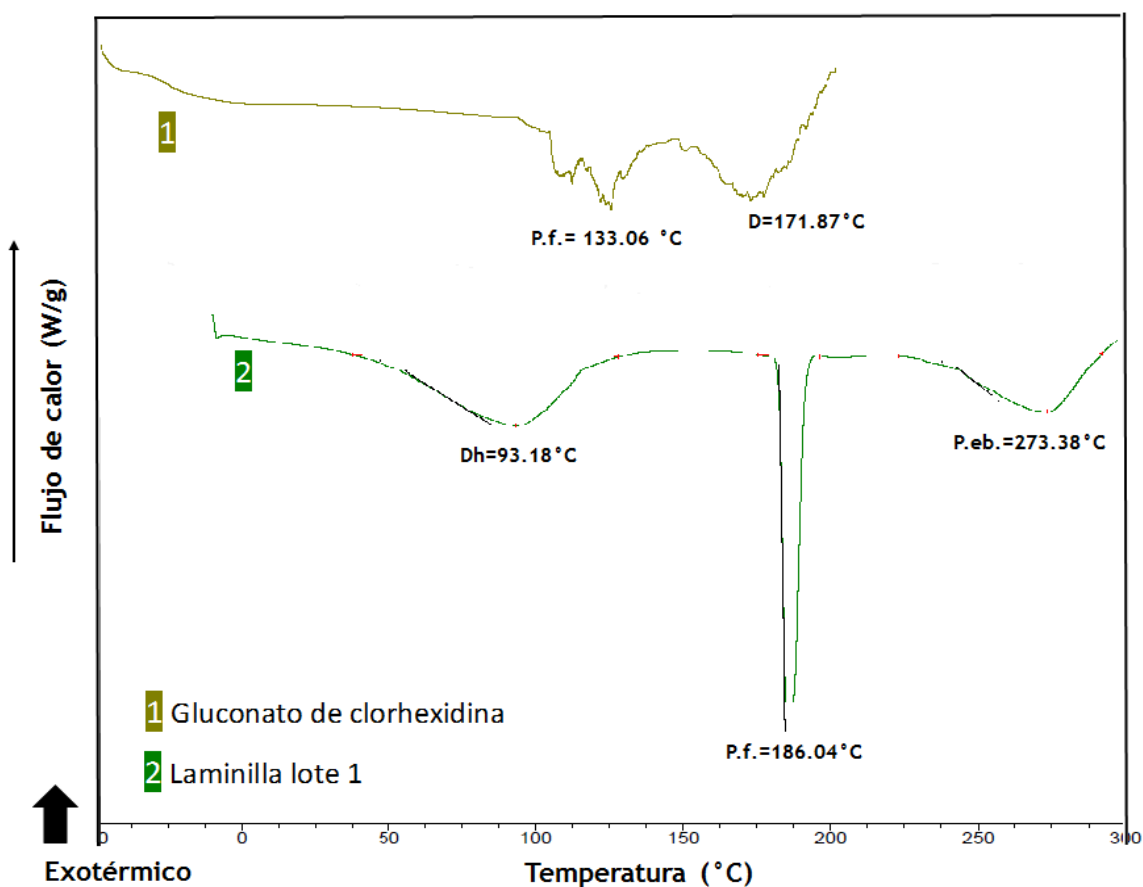


Figura 55. Calorimetría diferencial de barrido para laminilla dispersable (P.f. = punto de fusión, D= Descomposición, Dh=Deshidratación, P.eb. = punto de ebullición).



Se presenta el termograma obtenido para gluconato de clorhexidina para facilitar la comparación. Para el fármaco, se encontró una señal de fusión a los 133.06 °C y una señal que puede ser atribuida a una descomposición a partir de los 171.87 °C. El punto de fusión es cercano a lo reportado (132-136 °C, Hoja de datos de seguridad-gluconato de clorhexidina). Por su parte Rowe et al (2009) mencionan que el calentamiento a más de 150 °C causa descomposición de la clorhexidina y sus sales, dejando rastros de 4-cloroanilina. Esta señal se puede señalar definitivamente como de descomposición ya que se pierde la continuidad de la línea base alejándose la línea base (Cabrero y Martínez, 2011).

Con respecto a la laminilla, se encontraron tres señales endotérmicas en el análisis: la primera a los 93.18 °C, la segunda a los 186.04 °C y la última a los 273.38 °C. La primera señal se puede atribuir a la pérdida de agua u otros solventes que permanecieron en la laminilla incluso después del secado ya que su punto máximo se encuentra a 93.18 °C.

La señal endotérmica obtenida a los 186.04 °C representa un pico de fusión con base que es estrecho y definido y puede atribuirse a la hidroxipropilmetilcelulosa utilizada como filmógeno en las laminillas. De acuerdo a Rowe et al (2009) su intervalo de fusión va de 190 °C y 200 °C por lo que el valor experimental es al menos 6° C al reportado. Esto puede significar que existe una interacción entre el filmógeno y otro componente de la formulación que pueden ser el glicerol utilizado como plastificante. De acuerdo a Bhupinder et al (2011) el plastificante es un ingrediente vital en la formulación de las laminillas orodispersables cuya función principal es ayudar a mejorar la flexibilidad y reduce la fragilidad y mejora significativamente las propiedades de la laminilla reduciendo la temperatura de transición vítrea del polímero. Rowe et al (2009) señalan que esta señal se encuentra en un intervalo de 170 °C a los 180 °C, sin embargo, en el termograma mostrado no se aprecia con claridad dicho cambio ya que ésta es una señal de segundo orden, lo que quiere decir que es difícilmente perceptible. La tercera señal se puede atribuir a la ebullición de la glicerina, utilizada como plastificante en las laminillas.

De acuerdo a Auda, El-Badry y Inrahim (2014) en el análisis por calorimetría diferencial de barrido de una laminilla la completa desaparición de la señal de fusión del fármaco sugiere una disolución homogénea del mismo dentro de la matriz polimérica. Como se puede apreciar en el termograma, no se observa el pico de fusión del gluconato de clorhexidina a 133.06 °C, por lo que se puede decir que el fármaco se encuentra en un estado amorfo o disperso dentro de la matriz polimérica. Estos resultados coinciden con los de microscopía electrónica de barrido ya que no se encontraron cristales de gluconato de clorhexidina en ninguna de las dos pruebas.

3. Desarrollo de nanopartículas poliméricas

En esta investigación se desarrollaron nanopartículas poliméricas biodegradables cargadas con gluconato de clorhexidina por el método de doble emulsificación.

3.1 Determinaciones previas

3.1.1 Evaluación de la estabilidad para la emulsión de gluconato de clorhexidina en acetato de etilo con poli-(ϵ -caprolactona)

Se preparó una primera emulsión para incorporar el principio activo altamente hidrofílico en la fase orgánica. Se utilizó un sonotrodo de 7 mm de diámetro y las pruebas se realizaron en 10 mL

de acetato de etilo con poli-(ε-caprolactona) al 1 % p/v emulsificando con 0.25 mL de solución de gluconato de clorhexidina 20 % p/v. Los resultados se muestran en la tabla 35.

Tabla 34. Caracterización de la primera emulsión del proceso de obtención de nanopartículas poliméricas.

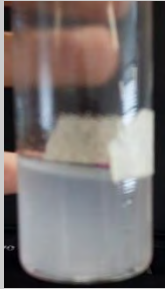











Profundidad del sonotrodo	Potencia programada (W)	Evaluación visual después de la sonicación	Evaluación visual después de cinco minutos	Potencia encontrada (W)
5 mm	50			9
	75			15
	100			25
2 cm	50			15

Tabla 34. Caracterización de la primera emulsión del proceso de obtención de nanopartículas poliméricas (continuación).

Profundidad del sonotrodo	Potencia programada (W)	Evaluación visual después de la sonicación	Evaluación visual después de cinco minutos	Potencia encontrada (W)
	75			20
	100			35

Se encontró que a ninguna de las condiciones evaluadas la emulsión mantenía su estabilidad por más de cinco minutos. De acuerdo a Hielscher (2005), las ondas de ultrasonido son perturbaciones que se obtienen a frecuencias de 20KHz y las emulsiones generadas por ultrasonido con normalmente más estables y requieren menos o ningún surfactante que aquellas producidas convencionalmente. Wu et al (2013) mencionan que **cuando** los líquidos son sonicados a alta intensidad, las ondas de sonido se propagan en el medio resultando en la formación de ciclos de alta presión (compresión) y baja presión (rarefacción), con velocidades dependientes de la frecuencia; a este fenómeno se le llama cavitación.

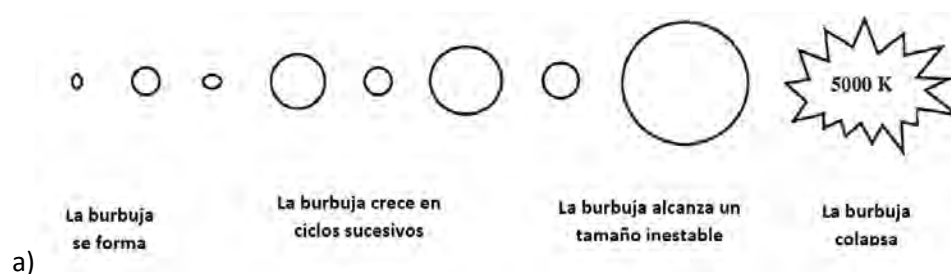


Figura 56. Fenómeno de cavitación: a) formación, crecimiento y colapso de la burbuja; (Modificada de Wu et al, 2013).

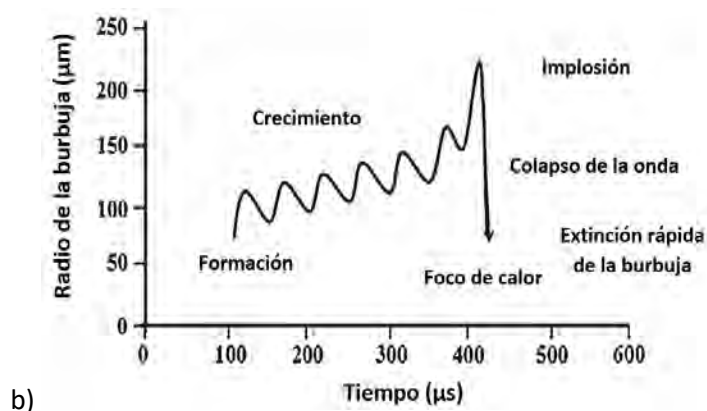


Figura 56. Fenómeno de cavitación (continuación): b) Cambios físicos de las burbujas de cavitación en función del tiempo burbuja (Modificada de Wu et al, 2013).

Estos mismos autores indican que existen varios parámetros que afectan la cavitación y el colapso de las burbujas, como la frecuencia de onda, la intensidad (relacionada con la amplitud), las características del solvente, la presión y la temperatura. A pesar de que se modificaron los parámetros de profundidad del sonotrodo y amplitud de onda, no fue posible mantener la estabilidad de la emulsión. Por esta razón, se decidió utilizar los valores límites especificados para el ultrasonido utilizado, empleando una potencia de 150 W con una amplitud de 80% y se realizó una inspección visual a los 5, 10 y 15 minutos.

Tabla 35. Inspección visual de la primera emulsión del proceso de obtención de nanopartículas poliméricas a condiciones límite.

Condiciones de emulsificación	Inspección visual a 0 min	Inspección visual a 5 min	Inspección visual a 10 min	Inspección visual a 15 min	Potencia encontrada (W)
Potencia: 150 W Amplitud: 80% Tiempo: 7 minutos					60

Se observó que la emulsión mantuvo su estabilidad hasta los 15 minutos, tiempo al que comenzó a separarse. Como en el proceso de doble-emulsificación se requiere que la primera emulsión se agregue inmediatamente a la fase acuosa para formar la doble emulsión, se consideró que estas



condiciones de sonicación generaban una emulsión más estable en comparación con los de la tabla 31 por lo que se seleccionaron para el proceso de obtención de las nanopartículas.

3.1.2 Evaluación de la estabilidad de gluconato de clorhexidina bajo aplicación de ultrasonido

A pesar de que el ultrasonido es un instrumento efectivo para obtener emulsiones con tamaño de partículas menores y con una distribución más angosta, es un hecho que puede afectar la estabilidad química de algunas sustancias, fundamento en el que se basa la sonoquímica. De acuerdo a Wu et al (2013), cuando el ultrasonido es aplicado produce la disociación térmica de la molécula de oxígeno en radicales OH^* , H^* y O^* lo que puede inducir algunas reacciones como hidrólisis, oxidación y polimerización.

Para verificar que la sonicación no propicia la degradación del fármaco se realizó una prueba sonicando una solución de fármaco en saliva simulada de concentración conocida a tres valores de potencia con 80 % de amplitud por siete minutos.

Tabla 36. Evaluación del efecto de ultrasonido en la estabilidad del fármaco.

Solución	Condiciones de sonicación	Tiempo de sonicación (min)	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Cantidad de fármaco (mg)
Estándar	Sin sonicación	7	32.618	40.772
Solución 1	50 W/80%amplitud	7	31.960	39.950
Solución 2	100 W/80%amplitud	7	31.401	39.251
Solución 3	150 W/80%amplitud	7	32.026	40.257

Se observó una reducción del contenido de fármaco en todas las soluciones, encontrando la mayor en la solución 2, con un valor de 1.471 mg equivalente al 3.73 %. Sin embargo, tomando en cuenta que la prueba se realizó aumentando la potencia de sonicación se esperaba que la mayor reducción se encontrara a los 150 W. Como en todos los casos la reducción fue menor a 5 mg, se decidió utilizar estas condiciones de sonicación.

3.2 Preparación de nanopartículas poliméricas

En primer lugar, se prepararon tres lotes utilizando la técnica de doble emulsificación agregando una etapa final de difusión con un exceso de agua. El lote 1 corresponde al lote de ensayo para caracterizar el tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta de las nanopartículas obtenidas. En los lotes 2 y 3 se duplicaron las cantidades de fármaco, fase orgánica y fase acuosa con respecto al lote 1. El lote 2 se preparó sin fármaco y el lote 3 estaba cargado. Los resultados se muestran en la tabla 38.



Tabla 37. Tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta para lotes 1, 2 y 3.

Lote	Tamaño de partícula (nm)	Índice de polidispersión	Potencial zeta (mV)
1 Cargado PCL-CHX (200 mg-100mg) Doble emulsificación-difusión	375.8	0.047	0.049
	396.8	0.076	0.0781
	404.2	0.088	0.84
PROMEDIO	392.2	0.07	0.32
	Desviación estándar=14.732		
	Coeficiente de variación=3.755		
2 Placebo PCL (400 mg) Doble emulsificación-difusión	383.2	0.127	-3.29
	403.1	0.157	-2.95
	386.3	0.122	-3.15
PROMEDIO	390.86	0.13	-3.13
	Desviación estándar=10.707		
	Coeficiente de variación=2.739		
3 Cargado PCL-CHX (400 mg-200mg) Doble emulsificación-difusión	395.8	0.114	0.738
	425.7	0.151	0.785
	396.9	0.128	0.646
PROMEDIO	406.13	0.131	0.723
	Desviación estándar=16.954		
	Coeficiente de variación=4.174		

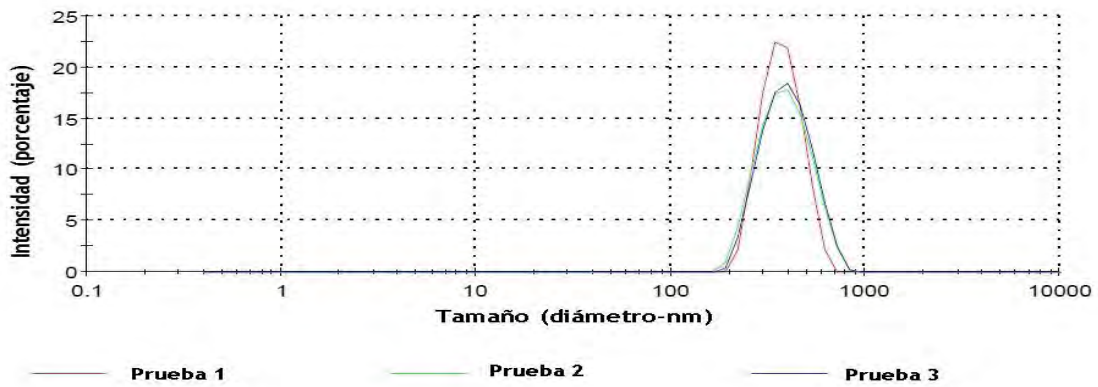


Gráfico 16. Distribución de tamaño de partícula NPP lote 1.

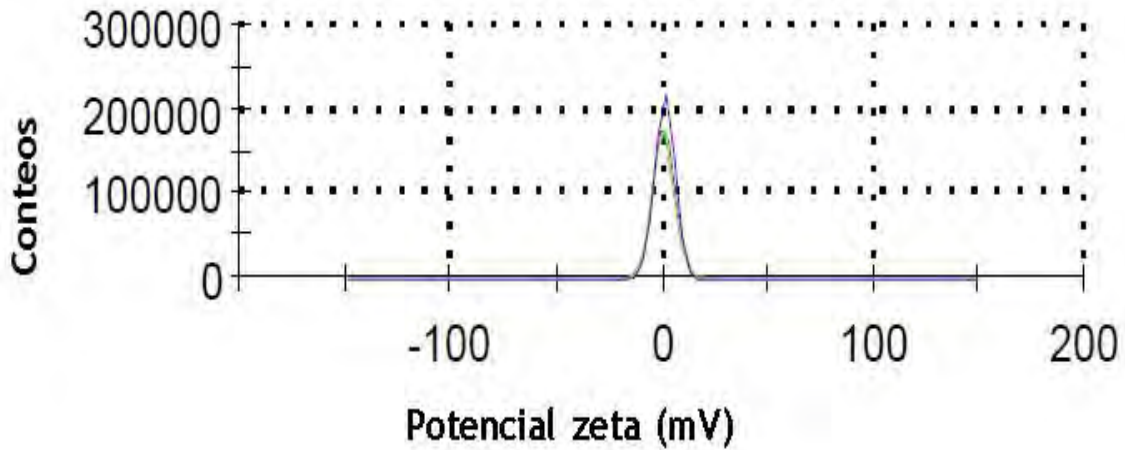


Gráfico 17. Distribución de potencial zeta de NPP lote 1.

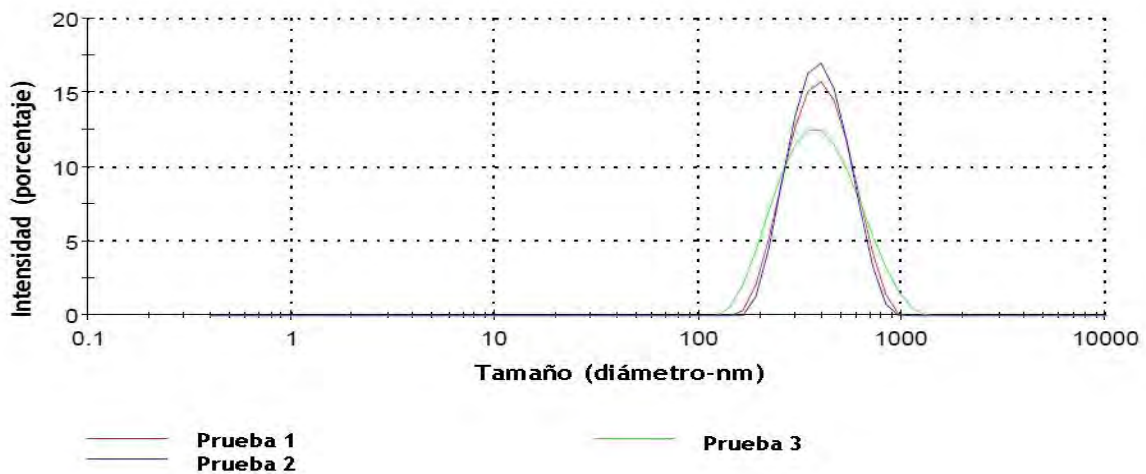


Gráfico 18. Distribución de tamaño de partícula de NPP lote 2.

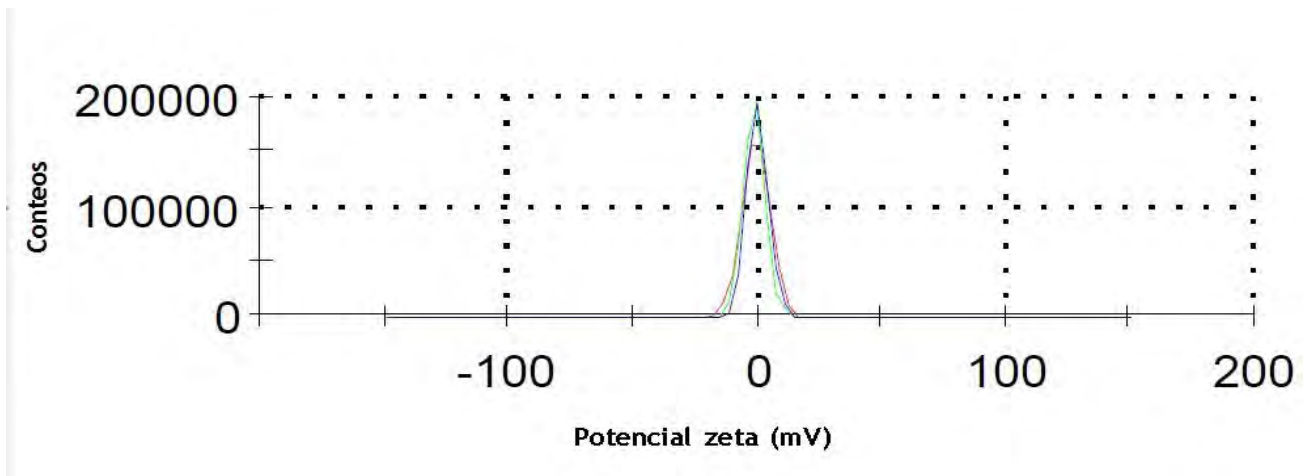


Gráfico 19. Distribución de potencial zeta de NPP lote 2.

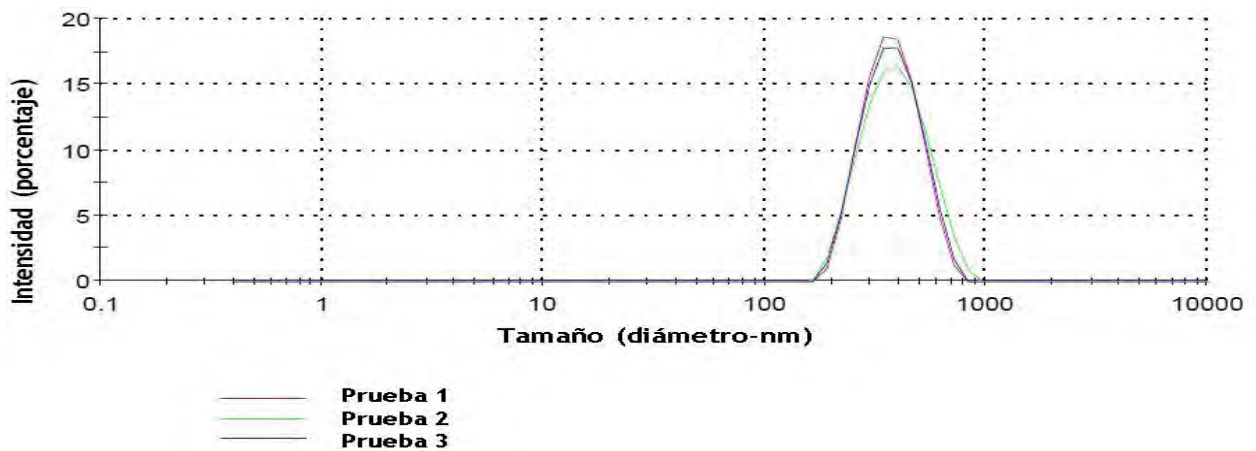


Gráfico 20. Distribución de tamaño de partícula de NPP lote 3.

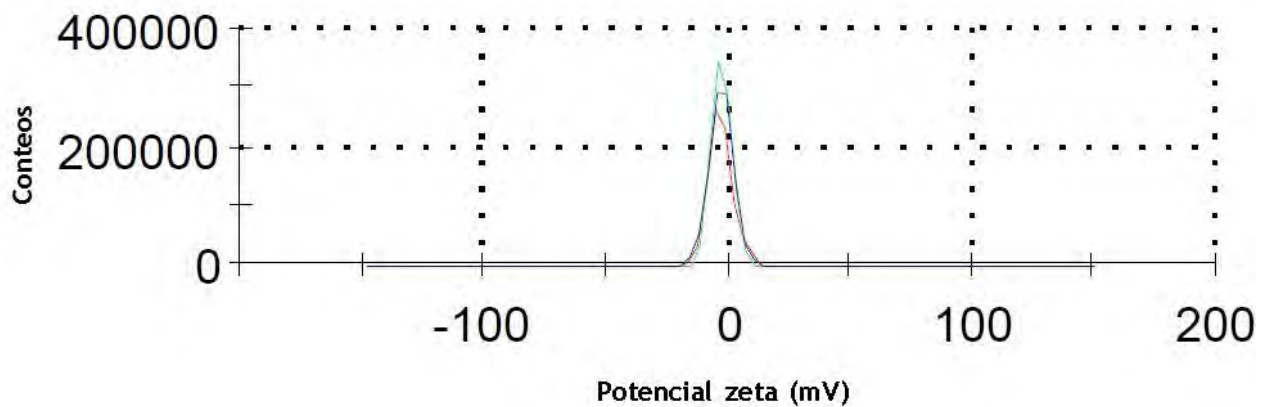


Gráfico 21. Distribución de potencial zeta de NPP lote 3.



De manera general se obtuvieron partículas submicrónicas, menores a 500 nm. De acuerdo a la Guía de NanoComposix para dispersión de luz dinámica (2012) esta técnica se basa en el paso de un rayo láser a través de una solución coloidal analizando la modulación de la dispersión de luz en función del tiempo, el tamaño hidrodinámico de las partículas y la determinación de aglomerados. Las partículas más grandes difunden más lentamente que las partículas pequeñas y el instrumento mide la dependencia del tiempo de dispersión de la luz para generar una función que puede determinar matemáticamente el tamaño de partícula.

Para analizar si las poblaciones de partículas eran monodispersas, se calculó el coeficiente de variación de los tamaños de partícula encontrados, obteniendo un valor mínimo de 3.755 % para el lote 1 y un máximo de 4.174 % para el lote 3. La guía de NanoComposix indica para el coeficiente de variación un valor máximo de 20 % para considerar que las partículas son monodispersas. Para la distribución de tamaños de partícula también se tomó en cuenta el índice de polidispersión, el cual no supero el valor de 0.2. De acuerdo a Kharia et al (2014) el índice de polidispersión puede tomar valores en el rango de 0 a 1, dependiendo del equipo; un valor más alto indica una distribución de nanopartículas menos homogénea; muestras con una amplia distribución de tamaño de partícula tienen un índice de polidispersión mayor a 0.7. De acuerdo a estos dos parámetros se puede decir que las partículas obtenidas presentan una distribución monodispersa. Contrastando los resultados del lote 2 (placebo) y el lote 3 (cargado), no se encontraron diferencias.

El ajuste de estos resultados puede deberse a las proporciones tanto de poli-(ϵ -caprolactona) como de alcohol polivinílico utilizadas. Becerril (2013) preparó nanopartículas de PLGA cargadas con ácido glicirricínico por el método de doble emulsificación utilizando una proporción de polímero de 2 % p/v en acetato de etilo y una concentración de PVAL como estabilizante de la emulsión secundaria de 1% p/v, obteniendo tamaños de partícula para de 359.9 ± 4.7 nm para NPP sin fármaco y 371.9 ± 8.1 nm para partículas con fármaco. Fuminori et al (2011) prepararon nanopartículas de PLGA cargadas con isoniazida utilizando una modificación del método de doble emulsificación y utilizaron una concentración de PLGA en diclorometano del 8 % p/v y PVAL al 1 % p/v en la fase acuosa secundaria obteniendo partículas menores a 500 nm. En la presente investigación la concentración de PVAL fue de 0.5 % p/v y para PCL fue de 1 % p/v.

Para el potencial zeta se obtuvieron valores promedio de 0.32, -3.13 y 0.723 para los lotes 1, 2 y 3, respectivamente. La medición del potencial zeta permite predecir la estabilidad coloidal de las dispersiones en almacenamiento. En general, valores de potencial zeta por encima de 30 mV (positivos o negativos) permiten una mayor estabilidad de la nanosuspensión debido a que la repulsión entre partículas previene la agregación (Kharia et al, 2014). De acuerdo al potencial zeta encontrado se podría decir que la suspensión no es estable, sin embargo, el potencial electrostático no es la única manera de estabilizar una suspensión. Como se indicó en la parte experimental, se utilizó alcohol polivinílico como estabilizante. Galindo-Rodríguez et al (2004) indicaron que la capacidad del PVAL para estabilizar emulsiones se basa en cuatro fenómenos: i) cubierta completa de las gotas, ii) anclaje firme en la interfase, iii) formación de una película firme y iv) a la óptima conformación de las cadenas de polímero hacia la fase externa.

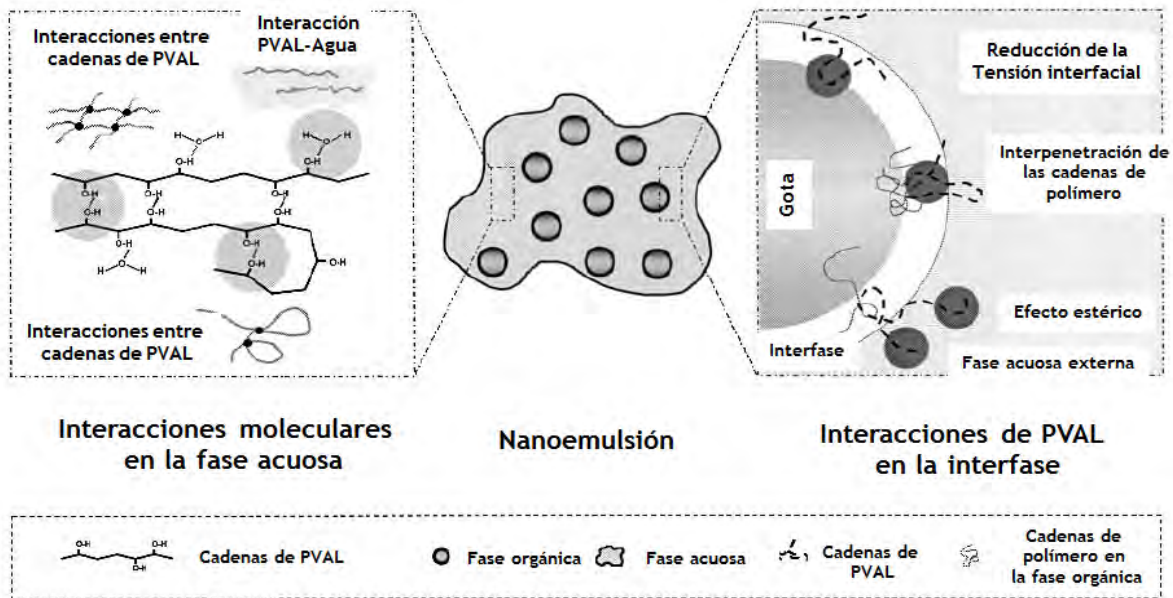


Figura 57. Mecanismos de estabilización del PVAL (Modificada de Galindo-Rodríguez et al, 2004).

Ahora, para la preparación de estos lotes se añadió una fase de difusión con un exceso de agua. Este paso se llevó a cabo ya que de acuerdo a Quintanar-Guerrero (1998) la adición de agua al sistema desestabiliza el equilibrio, hace que el polímero difunda hacia la fase externa y durante este transporte de solutos se producen nuevos glóbulos de tamaño nanométrico. Sin embargo, se esperaba que esta difusión provocara también la migración del gluconato de clorhexidina hacia la fase externa debido a su alta afinidad por el agua. A pesar de esto, no se detectó el espectro de absorción del fármaco en el solvente extraído, lo cual se puede corroborar al comparar con la respuesta provocada por el acetato de etilo (solvente).

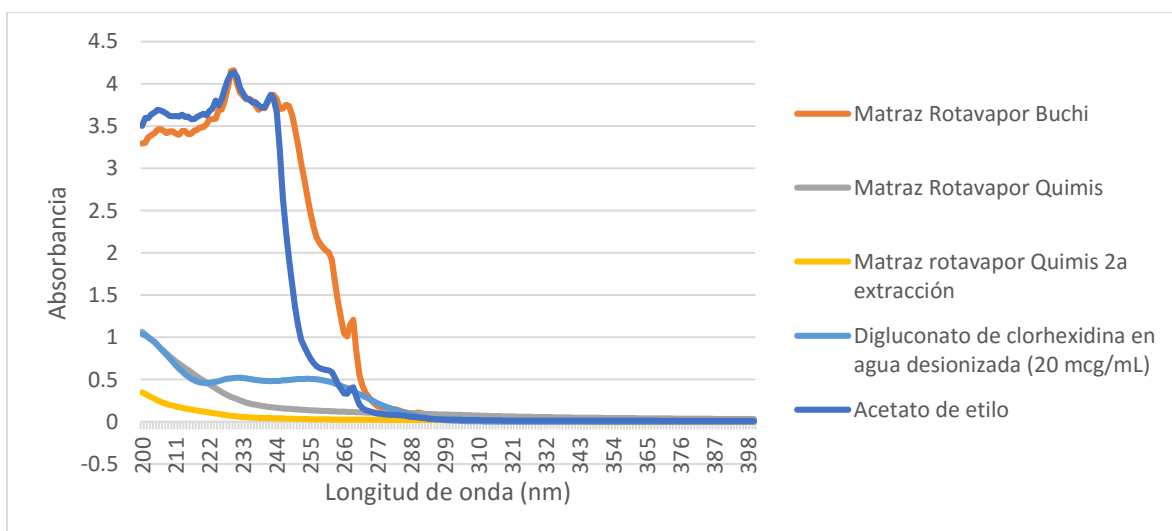


Gráfico 22. Identificación de gluconato de clorhexidina en el solvente extraído del proceso de preparación de las nanopartículas-Lote 3.



A pesar de que la adición de agua no promovió la difusión del fármaco a la fase externa, Nagavarma et al (2012) mencionan que una de las principales desventajas de este paso es que posteriormente se requiere eliminar grandes volúmenes de agua lo cual implica mucho tiempo invertido. Por eso, se sugirió eliminar esta etapa ya que Martínez (2014) demostró que al eliminar la adición de agua al preparar nanopartículas poliméricas de PLGA cargadas con miconazol no se observaron diferencias en tamaño, índice de polidispersión y potencial zeta. Los resultados se presentan en la tabla 39.

Tabla 38. Tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta para nanopartículas poliméricas eliminando la adición de agua (Lote 4).

Lote	Tamaño de partícula (nm)	Índice de polidispersión	Potencial zeta (mV)
4 PCL -CHX (400 mg-200 mg) Doble emulsificación	348.9	0.179	0.496
	373.5	0.142	0.911
	376.8	0.147	0.674
PROMEDIO	366.4	0.156	0.693
	Desviación estándar=15.244		
	Coefficiente de variación=4.160		

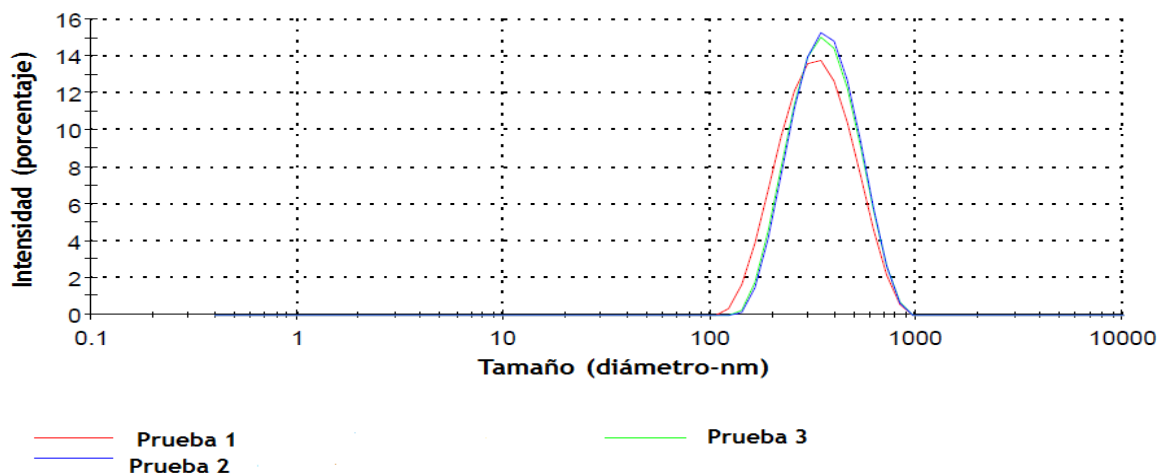


Gráfico 23. Distribución de tamaño de partícula de NPP lote 4.

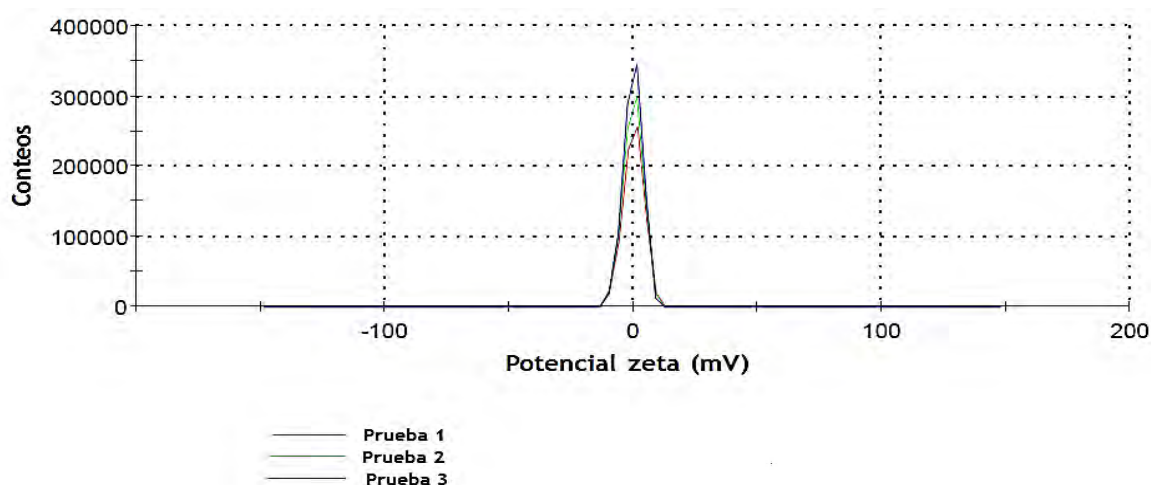


Gráfico 24. Distribución de potencial zeta de NPP lote 4.

Se encontró un tamaño de partícula promedio de 366.4 nm, índice de polidispersión 0.156 y potencial zeta de 0.693. La desviación estándar para tamaño de partícula fue de 15.244 y el coeficiente de variación fue de 4.160 %. De acuerdo a las especificaciones de la técnica de dispersión de luz dinámica se puede decir que las partículas obtenidas presentan una población monodispersa, además de que el potencial zeta es parecido al de los lotes 1 y 2. Para analizar si los tamaños de partícula eran diferentes se llevó a cabo una prueba de t de student para dos muestras suponiendo varianzas iguales.

Tabla 39. Prueba de t de student para tamaño de partícula de NPP obtenidas con y sin adición de agua.

	<i>Con adición de agua</i>	<i>Sin adición de agua</i>
Media	392.266	366.4
Varianza	217.053	232.41
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	224.731	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	2.113	
P(T<=t) una cola	0.051	
Valor crítico de t (una cola)	2.131	
P(T<=t) dos colas	0.102	
Valor crítico de t (dos colas)	2.776	

Se llevó a cabo el siguiente planteamiento de hipótesis para el efecto de la adición de agua:

H_0 = La media del tamaño de nanopartículas preparadas con adición de agua es igual a la de aquellas preparadas sin adición de agua.



H_a = La media del tamaño de nanopartículas preparadas con adición de agua es diferentes a la de aquellas preparadas sin adición de agua.

El criterio para el contraste de hipótesis fue el siguiente:

Si $|t_{calculada}| \leq t_{crítica}$ No se rechaza H_0

Si $|t_{calculada}| > t_{crítica}$ Se rechaza H_0

$$|t_{calculada}| = |2.113| < t_c = 2.776$$

Como el valor absoluto de t calculada es menor al de t crítica, no se rechaza la hipótesis nula y se dice que la media del tamaño de nanopartículas preparadas con adición de agua es igual a la de aquellas preparadas sin adición de agua. Con base a este resultado, se eliminó esta etapa del proceso de preparación. Se procedió a purificar las nanopartículas del lote 4 por ultracentrifugación para posterior congelamiento y liofilización. Se cuantificó el fármaco en el sobrenadante y se encontró que habían migrado 157.2302 mg durante el proceso de purificación hacia la fase acuosa. Este resultado se discutirá en la sección de eficiencia de encapsulamiento.

Para analizar si el proceso de liofilización afectaba el tamaño de partícula, se resuspendieron las nanopartículas liofilizadas en agua desionizada para determinar su tamaño. Sin embargo, se encontró que esto no fue posible incluso con aplicación de ultrasonido ya en lugar de un polvo se obtuvo una película que no se logró resuspender, por lo que se puede decir que las partículas se agregaron, a pesar de que existen reportes de que las nanopartículas poliméricas obtenidas con PVAL como estabilizante son fáciles de resuspender; Piñón-Segundo (2008) menciona que el PVAL forma una capa estable sobre la superficie de las nanopartículas la cual permite una redispersión casi instantánea cuando las nanopartículas liofilizadas son suspendidas en agua.

Para corroborar que las nanopartículas se habían agregado se determinó el tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta del liofilizado después de aplicar ultrasonido.

Tabla 40. Tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta para nanopartículas poliméricas del lote 4 después de liofilizar.

Lote	Tamaño de partícula (nm)	Índice de polidispersión	Potencial zeta (mV)
4-Después de liofilizar Cargado PCL-CHX (400 mg-200mg) Doble emulsificación	1403	0.842	-4.48
	1562	0.530	-4.65
	1182	0.619	-4.96
PROMEDIO	1382.333	0.663	-4.696
	Desviación estándar=190.841		
	Coefficiente de variación=13.805		

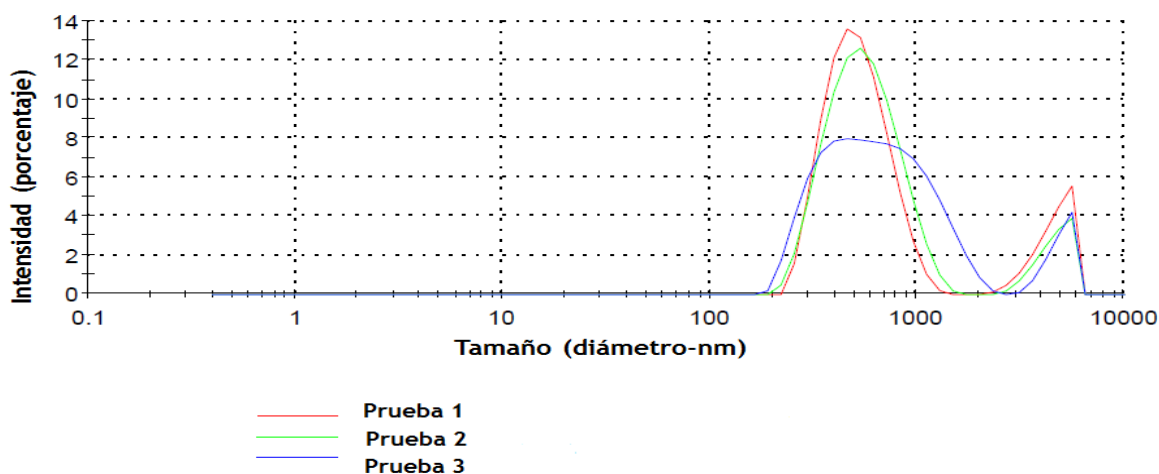


Gráfico 25. Distribución de tamaño de partícula de NPP lote 4 después de liofilizar.

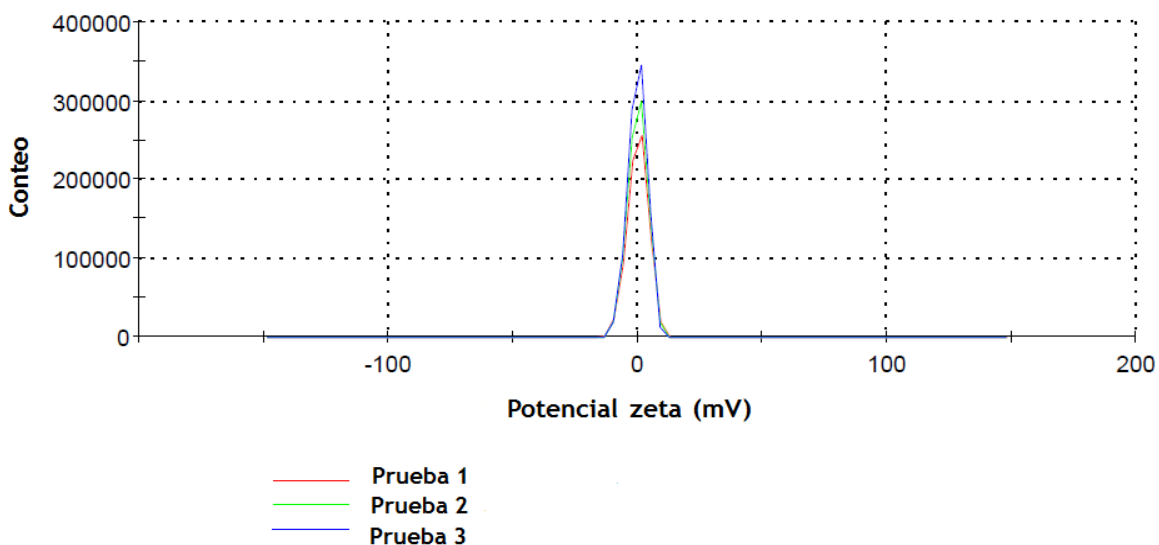


Gráfico 26. Distribución de potencial zeta de NPP lote 4 después de liofilizar.

El tamaño de partícula promedio obtenido fue de 1382.333 nm con una desviación estándar de 190.841 y coeficiente de variación de 13.805 %. Con respecto al tamaño promedio, éste es casi una micra mayor que aquel obtenido antes de liofilizar y aunque el coeficiente de variación no supera el 20 % establecido si supera por mucho al obtenido antes de liofilizar (4.160 %). Además, en el gráfico 25 se observan dos máximos de tamaño, lo cual se puede atribuir a que las partículas se estaban dispersando muy lentamente. El índice de polidispersión obtenido fue de 0.663, valor muy cercano al límite establecido por Kharia et al (2014) para poblaciones monodispersas.

Con base en lo anterior, se determinó que era necesario agregar un agente crioprotector a la suspensión de nanopartículas en el proceso de liofilización. De acuerdo a Dave et al (2012), en las nanopartículas, la estabilidad de la formulación es pobre cuando se encuentran en forma de dispersión acuosa debido a problemas de inestabilidad física como formación de aglomerados o inestabilidad química como difusión e hidrólisis del fármaco; por lo tanto, la liofilización es un



proceso utilizado ampliamente para mejorar la estabilidad del producto. Se eligió manitol en una concentración al 10 % p/v con respecto al volumen total de nanosuspensión obtenida en la purificación ya que se conoce que, esta sustancia junto con otros azúcares forma parte de los excipientes más utilizados en la liofilización de nanopartículas poliméricas. La capacidad de estos crioprotectores para mantener el tamaño de las nanopartículas puede ser explicado mediante la **“hipótesis de vitrificación”**. Esta hipótesis sostiene que, durante la etapa de congelamiento, a cierta temperatura los carbohidratos (sacáridos) formadores de cristales **“vitrifican”** y forman una matriz vidriosa, diferente de la fase crio-concentrada, en donde las nanopartículas quedan atrapadas y protegidas contra el estrés de los cristales de hielo (Barresi et al, 2015).

Con estas condiciones, se preparó el lote número 5, mostrando en la tabla 42 los resultados obtenidos antes y después de liofilizar.

Tabla 41. Tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta de nanopartículas del lote 5 antes y después de liofilizar.

Lote	Tamaño de partícula (nm)	Índice de polidispersión	Potencial zeta (mV)
5 Cargado PCL-CHX (400 mg-200mg) Doble emulsificación Antes de liofilizar	333.7	0.101	0.913
	334.0	0.129	0.461
	331.8	0.089	0.217
PROMEDIO	333.166	0.106	0.530
	Desviación estándar=1.193		
	Coefficiente de variación=0.358		
5 Cargado PCL-CHX (400 mg-200mg) Doble emulsificación Después de liofilizar	373.3	0.064	-4.09
	376.3	0.043	-4.79
	390.4	0.102	-4.68
PROMEDIO	380	0.069	-4.52
	Desviación estándar=9.137		
	Coefficiente de variación=2.402		

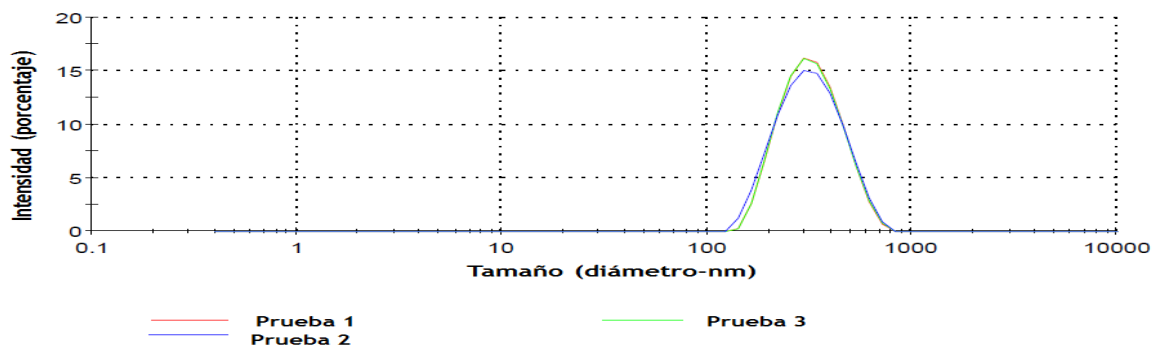


Gráfico 27. Distribución de tamaño de partícula de NPP del lote 5 antes de liofilizar.

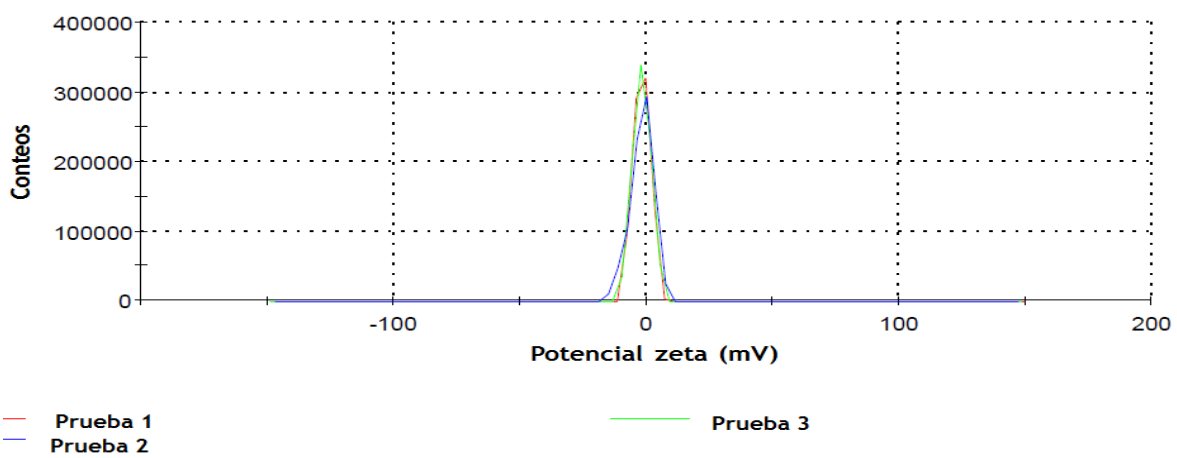


Gráfico 28. Distribución de potencial zeta de NPP del lote 5 antes de liofilizar.

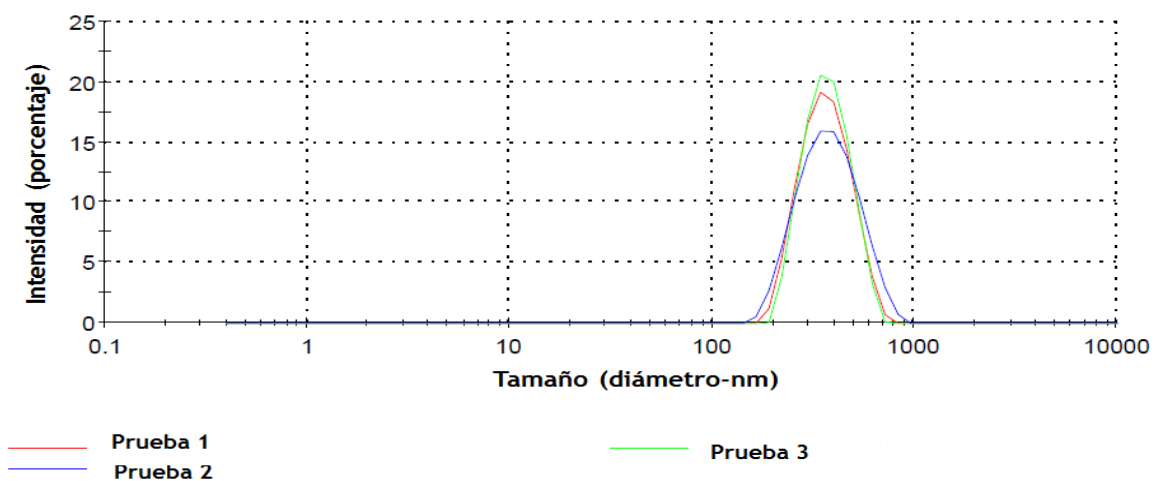


Gráfico 29. Distribución de tamaño de partícula de NPP del lote 5 antes de liofilizar.

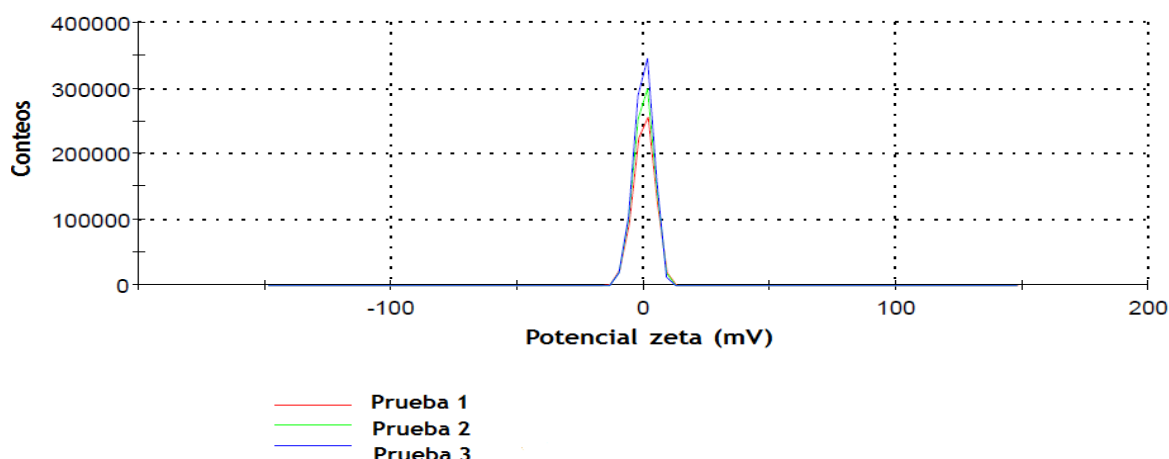


Gráfico 30. Distribución de potencial zeta de NPP del lote 5 antes de liofilizar.

Se encontró que después del proceso de liofilización el tamaño de partícula promedio aumento a 380 nm, con una desviación estándar de 9.137 y un coeficiente de variación de 2.402 %. El índice de polidispersión fue de 0.069 y el potencial zeta de -4.52. De acuerdo al coeficiente de variación para tamaño de partícula y al índice de polidispersión se puede decir que se obtuvieron partículas monodispersas. Para determinar si existían diferencias significativas antes y después de liofilizar se llevó a cabo una prueba de t de student para dos muestras suponiendo varianzas iguales.

Tabla 42. Prueba de t de student para tamaño de partícula antes y después de liofilizar.

	<i>Antes de liofilizar</i>	<i>Después de liofilizar</i>
Media	333.166	380
Varianza	1.423	83.37
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	42.396	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-8.809	
P(T<=t) una cola	0.0004	
Valor crítico de t (una cola)	2.131	
P(T<=t) dos colas	0.00091621	
Valor crítico de t (dos colas)	2.77644511	

Se llevó a cabo el siguiente planteamiento de hipótesis para el tamaño de partícula antes y después de liofilizar:

H_0 = La media del tamaño de nanopartículas antes de liofilizar es igual a la de las partículas después de liofilizar.



H_a = La media del tamaño de nanopartículas antes de liofilizar es diferente a la de las partículas después de liofilizar.

El criterio para el contraste de hipótesis fue el siguiente:

Si $|t_{\text{calculada}}| \leq t_{\text{crítica}}$ No se rechaza H_0

Si $|t_{\text{calculada}}| > t_{\text{crítica}}$ Se rechaza H_0

$$|t_{\text{calculada}}| = |-8.809| < t_c = 2.776$$

Como el valor absoluto de t calculada es mayor al de t crítica, se rechaza la hipótesis nula y se dice que la media del tamaño de nanopartículas preparadas antes de liofilizar es diferente a la de las partículas después de liofilizar. A pesar de este resultado, se puede decir que el aumento en el tamaño promedio es mucho menor que aquel observado sin la adición de manitol, así como su desviación estándar e índice de polidispersión por lo que se concluyó que la adición de este excipiente era necesaria en el proceso de liofilización.

3.3 Caracterización de nanopartículas poliméricas

3.3.1 Porcentaje de estabilizante residual, eficiencia de encapsulamiento y eficiencia del proceso

En la determinación de la eficiencia de encapsulamiento sólo se analizó lote 5 ya que presentaba las características adecuadas para su evaluación al no presentar problemas de agregación, lo cual también impactaría al momento de la liberación *in vitro*. Para calcular la cantidad de gluconato de clorhexidina así como la eficiencia de encapsulamiento se utilizaron las fórmulas propuestas por Leroux et al en 1995 (Piñón-Segundo, 2008). Cabe mencionar que se añadió un factor de fracción de manitol ya que este ingrediente se encontraba presente en el liofilizado final. Los resultados se presentan en la tabla 44.

$$\text{Principio activo cargado}(\%) = \frac{\text{Cantidad de principio activo en las nanoesferas}}{\text{cantidad de nanoesferas}} \times 100$$

E.E. (%)

$$= \frac{\% \text{ de principio activo cargado}}{\% \text{ de principio activo inicial} \times (1 - \text{fracción PVAL residual} - \text{fracción de manitol})} \times 100$$



Tabla 43. Porcentaje de estabilizante residual, porcentaje de fármaco cargado, eficiencia de encapsulamiento y eficiencia del proceso.

Prueba	%Gluconato de clorhexidina inicial	%PVAL residual	E.E. (%)	% Gluconato de clorhexidina cargado	Eficiencia del proceso (%)
1	33.33	2.608	10.561	3.429	72.826
2	33.33	3.082	12.206	3.943	
3	33.33	4.063	10.198	3.261	
	Promedio	3.25	10.989	3.544	
	Desviación estándar	0.742	1.07	0.355	
	Coefficiente de variación (%)	22.833	9.7377	10.026	

Para la eficiencia del proceso el cálculo fue el siguiente:

Masa total de lote

$$= \text{Masa de PCL} + \text{Masa de gluconato de clorhexidina} * + \text{PVAL residual} + \text{Manitol}$$

$$\text{Eficiencia del proceso} = \left(\frac{\text{Masa del liofilizado recuperado}}{\text{Masa total del lote}} \right) * 100$$

*Masa de fármaco colocada al inicio del proceso

El PVAL residual obtenido fue de 3.25 %. El PVAL residual se refiere a la cantidad de PVAL que permanece en las nanopartículas incluso después de los procesos de purificación (Galindo-Rodríguez et al, 2004). La importancia de cuantificarlo radica en que, debido a que se adsorbe sobre la superficie de las nanopartículas durante el proceso de obtención se requiere introducir el factor de corrección $1/(1-\text{fracción de PVAL residual})$ para evitar una sobreestimación de la eficiencia de encapsulamiento. El resultado obtenido se puede considerar adecuado ya que indica que los procesos de lavado de purificación de las nanopartículas son suficientes. Además, se puede considerar aceptable comparándolo con otros trabajos. Piñón-Segundo (2008) reportó valores menores al 4 % para nanopartículas de PLGA cargadas con triclosán; García (2011) encontró valores menores al 4.5 % para nanopartículas de CAP cargadas con miconazol base y nitrato de miconazol y Reyes y Rivera (2015) reportaron valores de 0.4 % y 0.8 %.

La eficiencia de encapsulamiento fue de 10.989 % y el porcentaje de fármaco cargado fue de 3.544 %. Teniendo en cuenta que este parámetro mide la relación entre la cantidad de fármaco colocada en la preparación de las nanopartículas y aquella que queda en el producto final el resultado se puede considerar como bajo. Como se indicó en la parte de preparación, se cuantificó el fármaco que migró hacia la fase acuosa durante la ultracentrifugación encontrando un resultado de 157.230 mg. Piñón-Segundo et al (2013) mencionan que los métodos de preparación de nanopartículas



desde polímeros preformados con alto potencial de aplicación en odontología se pueden clasificar en cinco categorías: i) emulsificación- evaporación, ii) inmiscibilidad por soluciones salinas (“salting-out”), iii) desplazamiento de solvente, iv) emulsificación-difusión y v) secado por aspersión. Uno de los principales problemas de estos métodos es el bajo encapsulamiento de sustancias solubles en agua, las cuales se separan de la fase orgánica para pasar a la fase acuosa. Una técnica de doble-emulsión puede ser utilizada para superar esta desventaja. A pesar de que se utilizó la técnica de emulsificación-difusión, se puede decir que el fármaco migró hacia la fase acuosa, lo cual puede ser explicado con base a la alta solubilidad del gluconato de clorhexidina en agua.

Cohen-Sela et al (2009) mencionan que el encapsulamiento de fármacos hidrofílicos en nanopartículas poliméricas siempre ha sido un reto. De acuerdo a Fuminori et al (2011), el encapsulamiento de fármacos hidrofílicos en nanopartículas poliméricas depende de las propiedades fisicoquímicas del polímero o constituyentes de la emulsión utilizada, tales como concentración, peso molecular, tamaño de partícula y viscosidad de las fases de la emulsión.

Hoffart et al (2002) prepararon nanopartículas cargadas con heparina de bajo peso molecular utilizando diferentes polímeros encontrando un valor de 16 % para partículas de PCL y de 56 % para partículas de Eudragit® RL. Sin embargo, encontraron que las partículas de Eudragit® dificultaban la liberación del fármaco debido a las fuertes interacciones con el polímero. Yue et al desarrollaron en 2004 micropartículas de PLGA cargadas con clorhexidina y clorhexidina base por la técnica de emulsificación- evaporación, utilizando asociaciones del fármaco con ciclodextrinas encontrando que la forma base asociada con una ciclodextrina hidrofílica presentó una eficiencia de encapsulamiento del 62% mientras que la forma en gluconato asociada con una ciclodextrina lipofílica presentó un valor de 12%. Por su parte, Peltonen et al (2004) prepararon nanopartículas de PLA por el método de desplazamiento de solvente cargadas con cromoglicato de sodio modificando factores como tipo de solvente, proporción fármaco polímero y características de la fase acuosa como pH y contra-ión sodio, encontrando un valor mínimo de 11.5 % y un máximo de 69.6 %; a pesar de este alto valor de eficiencia, el tamaño de partícula obtenido fue de 1200 nm contra los 470 nm para las partículas con 11.5 %.

Recurriendo a trabajos más recientes, Fuminori et al (2011) prepararon nanopartículas de PLGA cargadas con isoniazida modificando el proceso de doble emulsificación al congelar la emulsión primaria seguida de una emulsificación con la fase acuosa secundaria para formar la doble emulsión. La eficiencia de encapsulamiento para el proceso sin congelamiento fue de 8 % comparado con el 20 % obtenido para el proceso con congelamiento. Cohen-Sela et al (2009) además mencionan al pH como un factor determinante, así como la presencia un contra-ión para el principio activo con el fin de disminuir la solubilidad del fármaco y aumentar su encapsulamiento. Estos autores prepararon nanopartículas de PLGA cargadas con de cargadas con alendronato, un bifosfonato de bajo peso molecular, y encontraron que la adición de calcio (Ca^{2+}) a la fase acuosa en una proporción de 1:2 aumentaba la eficiencia de encapsulamiento de 4.5 % a 83.5 %. Cabe mencionar que la técnica utilizada por Cohan-Sela et al (2009) se conoce como par-iónico. Finalmente, Santino (2013) preparó nanopartículas de PLGA cargadas con ácido glicirricínico preparadas por el método de doble emulsificación utilizando Pluronic® F-68 como estabilizante de la fase primaria obteniendo una eficiencia de encapsulamiento de 4.27%.

Como se puede observar, diferentes estrategias han sido propuestas para aumentar el encapsulamiento de fármacos hidrofílicos con resultados variados dependiendo de diferentes



factores como el tipo de fármaco, polímero, etc. En esta investigación, además de la alta afinidad del gluconato de clorhexidina por la fase acuosa el resultado obtenido se puede atribuir a la alta hidrofobicidad de la PCL, lo que dificultó en encapsulamiento del fármaco. También se puede decir que el bajo peso molecular del principio activo impactó en el resultado. Sin embargo, los resultados obtenidos son satisfactorios comparados con los trabajos anteriormente citados.

Con el propósito de obtener una alta eficiencia de encapsulamiento, al principio de este proyecto se planteó la posibilidad de utilizar a la clorhexidina en su forma base. Con respecto a las propiedades fisicoquímicas, la clorhexidina por sí sola es una base fuerte, prácticamente insoluble en agua (0.008% p/v a 20°C) que reacciona con ácidos para formar sales del tipo RX_2 . Debido a su bajo perfil de solubilidad, se encuentra normalmente como acetato, gluconato o clorhidrato (Rowe et al, 2009). Debido a la casi nula solubilidad de la forma base, parecía ser el mejor candidato para la preparación de las nanopartículas, sin embargo, su precio es mucho más elevado en comparación con el de la sal de gluconato. También se planteó la posibilidad de obtener la base desde la solución de la sal mediante precipitación, pero se encontró que este proceso presenta algunos problemas. Sánchez et al (2013) muestran tres de estudios en donde se describen otros métodos de obtención de la clorhexidina base a partir de las sales:

Tabla 44. Métodos de obtención de clorhexidina base a partir de sus sales reportados por Sánchez et al (2013).

Estudio	Descripción	Resultados
F.L. Rose et al, 1956, 4422	Adición de una solución acuosa de hidróxido de sodio a una solución de clorhidrato de clorhexidina. Recristalización del producto en metanol.	Intervalo de fusión: 133.5°C-134°C. Pureza: 61%. Productos de degradación: no reportado.
JP Patent No. 0416406	Precipitación con hidróxido de sodio a partir de una solución de clorhidrato de clorhexidina inmersa en una solución de metanol del 40-95% v/v. Filtrado y lavado del producto con una solución alcohólica.	Intervalo de fusión: 132.4-134°C. Pureza: 96-99.2°C. Productos de degradación: no reportados.
BR Patent Application No. PI 9300129 ^a	Precipitación con hidróxido de sodio a partir de una solución de clorhidrato de clorhexidina inmersa en una solución acuosa de isopropanol; centrifugación y lavado del sólido con metanol.	Intervalo de fusión: no reportado. Pureza: no reportado. Productos de degradación: <i>p</i> -cloroanilina 1000 ppm.

Como se observa estos métodos presentan algunas desventajas. El proceso de recristalización de F.L. Rose et al, (1956) no es eficiente desde que ofrece un producto con baja pureza (61%) y no es escalable a nivel industrial debido a que requiere grandes volúmenes de solvente (30 mL de metanol/g clorhexidina). Sánchez et al (2013) mencionan que en todos los métodos mencionados, a nivel laboratorio, arrojan productos con pureza relativamente aceptable debido a que el solvente utilizado para lavar permanece poco tiempo en contacto con el sólido a purificar, permitiendo



retirar rápidamente las impurezas. Sin embargo, cuando son escalados a nivel industrial el tiempo de contacto del producto con el solvente se vuelve significativo, disminuyendo el porcentaje de impurezas removidas por lavado (menos del 52%) y aumentando su costo.

Como se mencionó en la prueba de estabilidad fármaco, una de las impurezas de la precipitación con clorhexidina es la *p*-cloroanilina. De acuerdo a Rowe et al (2009) la cantidad de la impureza obtenida se incrementa con temperaturas mayores a 100°C, especialmente a pH alcalino. La presencia *p*-cloroanilina es indeseable en formas farmacéuticas de aplicación bucal ya que es muy tóxica si es inhalada, tragada o absorbida por la piel. Actúa como agente carcinogénico; la DL50 es de 310 mg/kg y 100 mg/kg para rata y ratón, respectivamente (Nicolay et al, 2011). Llaboutounne et al (2002) prepararon nanocápsulas de poli-(ϵ -caprolactona) cargadas con clorhexidina base preparando una solución del fármaco en Epikuron® 200 (fosfatidilcolina) incorporada en acetona obteniendo una eficiencia de encapsulamiento promedio de 60 %. Como se puede ver, la aplicación de clorhexidina base necesitó del uso de fosfolípidos para lograr un alto encapsulamiento.

Otra estrategia que se podría utilizar para aumentar el encapsulamiento del fármaco es el uso de agentes tenso activos en la emulsión primaria para aumentar su estabilidad, sin embargo, debido a su naturaleza química y estructura fuertemente catiónica presenta varias incompatibilidades que dificultan su formulación incluso en productos como shampoos. Rowe et al (2009) menciona que debe evitarse el uso de surfactantes aniónicos ya que se forman complejos insolubles y aunque se pueden utilizar compuestos catiónicos y no-iónicos, en altas concentraciones la actividad antimicrobiana del fármaco puede verse sustancialmente reducida debido a la formación de micelas.

También se podría utilizar la técnica de emulsificación evaporación empleando solventes orgánicos inmiscibles con agua, como diclorometano y cloroformo con el fin de disminuir la migración del fármaco hacia la fase acuosa, sin embargo, estos solventes pertenecen a la Clase I de la guía ICH debido a su mayor toxicidad. Una de las opciones más adecuadas podría ser utilizar un par iónico, manteniendo el pH de la fase acuosa secundaria para evitar la degradación del fármaco.

Con respecto a la eficiencia del proceso obtenida, el valor obtenido fue de 72.826 %. Piñón-Segundo (2008) reporta eficiencias del proceso mayores al 99 % para nanopartículas de PLGA y de CAP cargadas con triclosán, valor que puede ser atribuido a la alta eficiencia de encapsulamiento (63.8-89.4 %) provocada por el alto grado de lipofilia del triclosán y a su insolubilidad en agua. En este trabajo la eficiencia del proceso obtenida se puede explicar con base a la eficiencia de encapsulamiento obtenida.

3.3.2 Análisis de NPP por calorimetría diferencial de barrido

Se llevó a cabo en análisis de las NPP obtenidas por calorimetría diferencial de barrido (CDB). De acuerdo a Azevedo y Ricci-Junior (2011), el análisis por calorimetría diferencial de barrido permite investigar el estado físico del fármaco dentro de las nanopartículas y una posible interacción entre fármaco-polímero ya que estos aspectos pueden influir en las características de liberación del fármaco. La prueba se realizó al fármaco, PCL, PVAL, nanopartículas placebo y nanopartículas cargadas ya que se ha establecido que el análisis térmico debe estar basado en la comparación del comportamiento térmico de cada uno de los componentes (Goncalves et al, 2011). Los resultados se muestran en la figura 55.

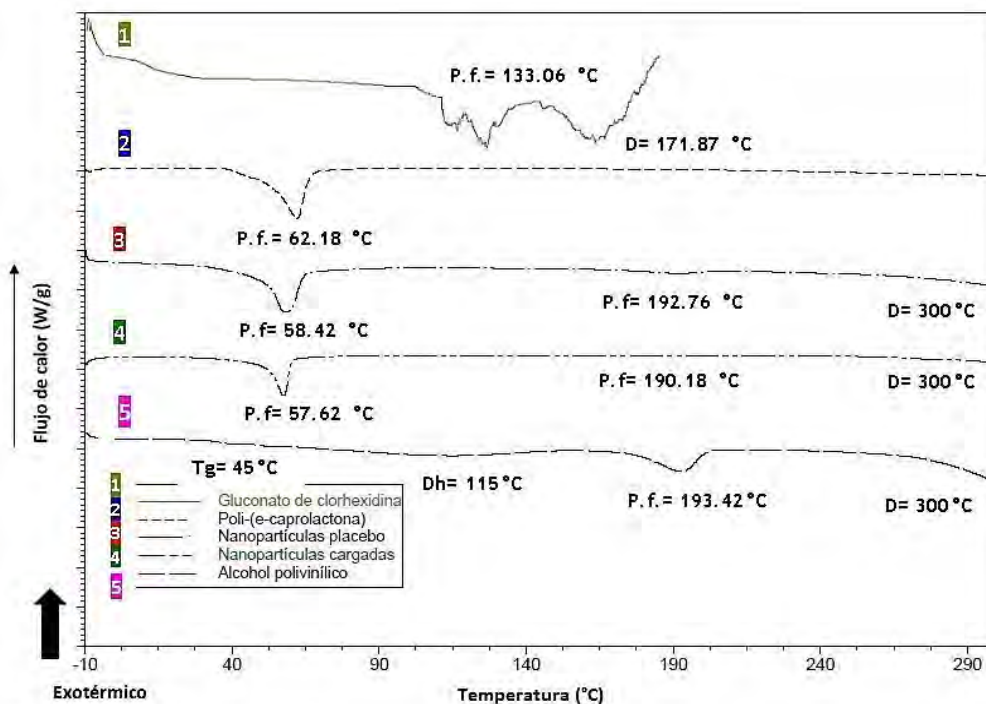


Figura 58. Calorimetría diferencial de barrido para evaluar las NPP; P.f.=Punto de fusión, D=Descomposición, Dh=Deshidratación, Tg°=Temperatura de transición vítrea.

Para el gluconato de clorhexidina se muestran las dos señales endotérmicas mencionadas para el análisis de CBD de laminilla orodispersables: una fusión a los 133.06 °C y una descomposición a los 171.87 °C, las cuales corresponden a lo reportado en la literatura. Adicionalmente, Goncalves et al (2011) prepararon sistemas nanoparticulado cargados con gluconato de clorhexidina y complejos de ciclodextrinas y los analizaron por calorimetría diferencial de barrido mostrando que la curva del fármaco muestra estabilidad de 25 °C a 174 °C, después de lo cual, una secuencia de eventos térmicos de descomposición fue observados. En el mismo trabajo, se observa una señal a los 131.17 °C que puede ser atribuida a la fusión del fármaco.

Para la poli-(ε-caprolactona) se aprecia una señal endotérmica con un pico de fusión a los 62.18 °C. Según Rowe et al (2009), éste polímero presenta un punto de fusión cercano a los 60° C por lo que se puede asegurar la identidad del material.

Para el alcohol polivinílico se aprecian cuatro señales térmicas: una transición vítrea a los 46.52 °C, una deshidratación a los 115° C, una fusión a los 193.42 °C y una descomposición que comenzó a los 250 °C. La transición vítrea corresponde a lo establecido por Rowe et al (2009), que menciona que dicho fenómeno suele presentarse para este material en temperaturas de 40 a 80 °C, dependiendo del tipo de muestra. La deshidratación de la muestra se observó ya que, según Attia y Abd El-kader (2013) este polímero es sensible a la temperatura en cuanto a absorción de agua se trata; después de un tratamiento térmico, su capacidad de absorción de agua es modificada. Por lo tanto, se puede decir que la muestra utilizada para el análisis se encontraba hidratada. Según Attia y Abd El-kader (2013), si se desea que esta señal no aparezca en el termograma, se



recomienda realizar un calentamiento a 100 °C por 15 minutos para la completa evaporación de solventes antes de realizar el estudio.

En cuanto a la temperatura de fusión, el valor encontrado fue de 193.42° C, lo cual corresponde con lo reportado en la literatura ya que según Rowe et al (2009), la fusión del material se presenta en un rango de 180 °C a 190 °C para muestras parcialmente hidrolizadas, mientras que para la muestra hidrolizadas el valor es cercano a los 228 °C. Con base a lo anterior, se puede decir que el estabilizante utilizado corresponde a una muestra parcialmente hidrolizada.

Ahora, para la señal obtenida cerca de los 300 °C se puede decir que se trata de una descomposición o disociación química del polímero. Attia y Abd El-kader (2013) mencionan una disociación del alcohol polivinílico a los 308 °C, en cuyos termogramas se observa una pérdida de la línea base después de dicha temperatura. La descomposición de este polímero es corroborada por Zheng y Ling (2007) que indica una degradación química en dos pasos sucesivos: pérdida de agua y pérdida de grupos acetato.

Para las nanopartículas placebo se obtuvo una endoterma de fusión a los 58.42°C, valor ligeramente más bajo que aquel encontrado para el polímero sólo. Azevedo y Ricci-Junior (2011) prepararon nanopartículas de PCL cargadas con naproxeno y las evaluaron mediante CDB, encontrando un punto de fusión de 60.2 °C para nanopartículas placebo. Lo anterior puede explicarse con base a una posible interacción del polímero con el alcohol polivinílico, componente presente tanto en las nanopartículas blanco como en las nanopartículas cargadas. De acuerdo a De Kesel et al (1999) el índice de cristalinidad es constante para el alcohol polivinílico, pero no para la poli-(ϵ -caprolactona), para la cual el valor de éste parámetro decrece con el aumento en el contenido de PVAL. Éste comportamiento generalmente se asocia a la interacción entre los componentes ya que existen registros que muestran que en algunas mezclas de PVAL con polímeros semi-cristalinos como el ácido poliacrílico se observó una completa supresión de la cristalinidad.

Para las nanopartículas cargadas se obtuvo un pico de fusión a los 57.62 °C, el cual puede atribuirse a la poli-(ϵ -caprolactona) mientras que no se observó el pico de fusión característico del fármaco, el cual aparece a temperaturas entre 134 y 135 °C. De acuerdo a Azevedo y Ricci-Junior (2011), la desaparición del pico de fusión del fármaco en el termograma de las nanopartículas cargadas indica la ausencia del mismo en estado cristalino en el sistema de liberación por lo que se puede decir que durante la formación de las nanopartículas, el polímero inhibe la recristalización del fármaco, formando una dispersión molecular dentro de la matriz polimérica. Tomando en cuenta lo anterior, se puede afirmar que el gluconato de clorhexidina se encuentra disperso o disuelto molecularmente dentro de la matriz polimérica de PCL en su forma amorfa y no cristalina, ya que no se detectó su punto de fusión característico. Para confirmar estos estudios se podría llevar a cabo un análisis con difracción de rayos X o espectro infrarrojo.

A pesar de que en este trabajo no se observó una interacción del fármaco con el polímero debido al bajo encapsulamiento, existe evidencia que indica que el fármaco puede establecer ciertas interacciones con el polímero lo cual se refleja en cambios en ciertos parámetros como su punto de fusión polímero o sus transiciones vítreas. En las nanopartículas preparadas por Azevedo y Ricci-Junior (2011) se demostró que existía una interacción entre el fármaco y el polímero al señalar que sus nanopartículas blanco presentaban una fusión a los 60.2 °C mientras que el lote cargado la presentaba a los 64.3 °C. Así mismo, Santino (2013) preparó nanopartículas de poli-(láctico-co-glicólico) cargadas con glicirrinato de amonio y mostró por calorimetría diferencial de barrido que



la degradación oxidativa de la etilcelulosa, utilizada como polímero formador de partículas, se presentaba a temperaturas de 208.72 °C y 207.54 °C para nanopartículas blanco y cargadas, respectivamente, lo cual se atribuyó a un bajo encapsulamiento del fármaco (alrededor de 4.5%). Piñón-Segundo (2003) evidenció que el triclosán incluido en nanoesferas de ácido poli-(láctico-co-glicólico) funcionaba como un plastificante no convencional al disminuir la temperatura de transición vítrea conforme aumentaba la carga del fármaco en las partículas.

Con respecto a otras señales observadas en los lotes de nanopartículas, para las partículas placebo y las cargadas se observó un evento endotérmico alrededor de los 190°C la cual se puede atribuir al proceso de fusión del alcohol polivinílico y uno que comenzó a los 300 °C que puede ser atribuido a la descomposición de este excipiente. Estas señales evidencian que el alcohol polivinílico se encuentra adsorbido sobre la superficie de las nanopartículas, tal como indican Piñón-Segundo (2008) y Galindo-Rodríguez et al (2004).

3.3.3 Liberación *in vitro* de gluconato de clorhexidina desde NPP

Se llevaron a cabo los estudios de liberación *in vitro* utilizando el método de diálisis. De acuerdo a D´Souza (2014), este método es el más versátil y popular, sin embargo, la premisa básica es que el fármaco difunda rápidamente a través de la membrana y entre al medio en donde se lleva a cabo el muestreo. Esto implica que la bolsa de diálisis utilizada no represente una barrera para la difusión del fármaco. Además, uno de los factores críticos a considerar es la solubilidad. Cuando el fármaco es disuelto desde la forma farmacéutica, la concentración debe ser menor al 15% de la solubilidad del fármaco en ese medio; **esto se conoce como condiciones “sink” y debe ser tomado en cuenta siempre que se desarrolla una prueba de liberación.** Una ausencia de condiciones “sink” podría generar una cinética poco predecible y una supresión en la liberación del fármaco. Cuando **se cumplen las condiciones “sink” es más probable que los resultados de la liberación reflejen las propiedades de la forma de dosificación** (Xuemei, 2011). En este trabajo se tomó como parámetro de solubilidad aquel indicado por Rowe et al (2009) quienes mencionan que las sales de clorhexidina forman precipitados de baja solubilidad en concentraciones mayores a 0.05 % en presencia de ácidos inorgánicos, ciertos ácidos orgánicos y sales. Los resultados se muestran en el gráfico 31.

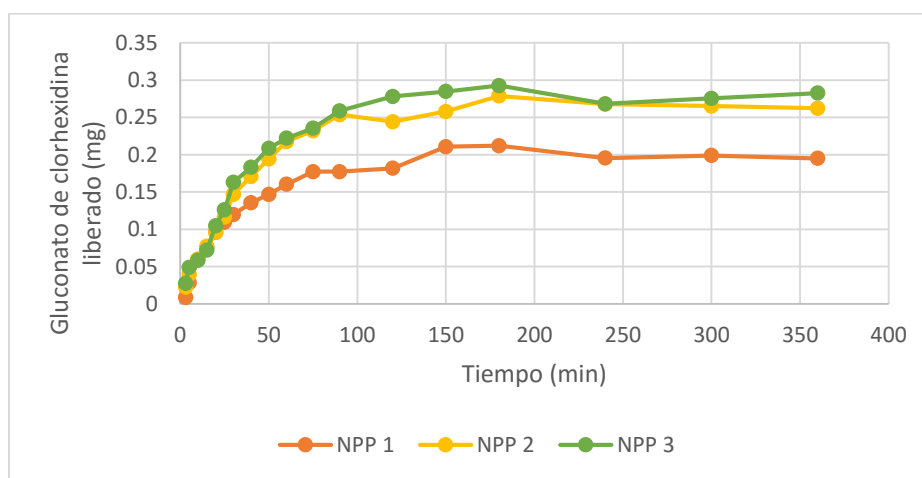


Gráfico 31. Liberación *in vitro* de gluconato de clorhexidina en saliva simulada desde NPP.



Tomando en cuenta la cantidad máxima de fármaco liberado en el equilibrio (M_{∞}), se calculó el porcentaje de fármaco liberado a cada tiempo. Para la investigación también se llevó a cabo una liberación con solución de gluconato de clorhexidina y se compararon los resultados con aquellos de las NPP. Los resultados porcentuales de ambas pruebas se muestran en el gráfico 32.

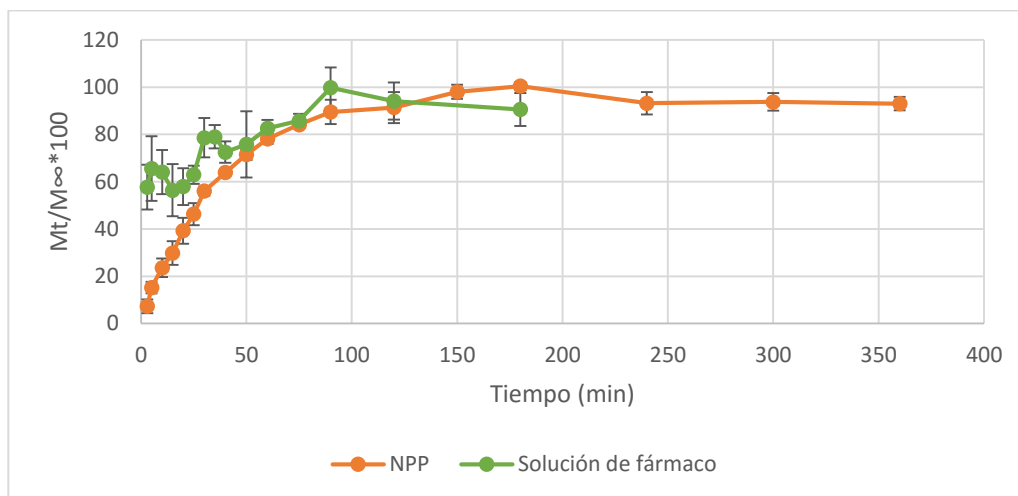


Gráfico 32. Liberación *in vitro* de gluconato de clorhexidina en saliva simulada desde NPP y desde solución.

Se encontró que la solución presentó la cantidad máxima liberada a los 90 minutos, mientras que en las nanopartículas este valor se alcanzó a los 180 minutos. Para determinar si la cantidad de fármaco liberada desde ambos sistemas era estadísticamente diferente se llevó a cabo una prueba de t de student de dos muestras suponiendo varianzas iguales.

Tabla 45. Prueba de t de student para fracción porcentual de fármaco liberado ($Mt/M_{\infty} * 100$) para solución y NPP a los 40 minutos.

	Solución	NPP
Media	75.136	63.889
Varianza	20.326	1.328
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	10.827	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	4.186	
P(T<=t) una cola	0.006	
Valor crítico de t (una cola)	2.131	
P(T<=t) dos colas	0.013	
Valor crítico de t (dos colas)	2.776	

Se llevó a cabo el siguiente planteamiento de hipótesis:



H_0 = La media de la fracción porcentual liberada de gluconato de clorhexidina a los 40 minutos para la solución y para las NPP es igual.

H_a = La media de la fracción porcentual liberada de gluconato de clorhexidina a los 40 minutos para la solución y para las NPP es diferente.

El criterio para el contraste de hipótesis fue el siguiente:

Si $|t_{calculada}| \leq t_{crítica}$ No se rechaza H_0

Si $|t_{calculada}| > t_{crítica}$ Se rechaza H_0

$$|t_{calculada}| = |4.186| < t_c = 2.776$$

Como t calculada es menor a t crítica, se dice que las velocidades de liberación son diferentes para la solución de fármaco y para las nanopartículas. Adicionalmente, se encontró que 51.71% del fármaco en promedio de la solución fue liberado a los tres minutos de comenzada la prueba en comparación del 7.348 % de las NPP, con lo que además se confirmó que la membrana de diálisis utilizada no presentó una limitante para la liberación del fármaco.

A pesar de que se comprobó que las nanopartículas poliméricas permitieron reducir la velocidad de liberación del fármaco, se puede decir que el fármaco se liberó muy rápido ya que la dosis máxima se alcanzó a los 180 minutos. De acuerdo a Llabot, Palma y Allemandi (2008) las nanopartículas poliméricas tienen la capacidad de administrar una amplia gama de compuestos para las diferentes vías de administración por periodos de tiempo sostenido. Piñón-Segundo (2008) reportó que al menos el 75 % de triclosán cargado en nanopartículas de PLGA con cargas de fármaco que iban de 0.84 %-11.46 % se liberó en 30 minutos y aproximadamente el 90 % se había liberado para partículas con 16.18 % de fármaco. Reyes y Rivera (2015) reportaron que la cantidad máxima liberada de clotrimazol se había liberado a las 33 horas desde nanopartículas de CAP cargadas con 60 % de activo. Estos autores atribuyen la velocidad de liberación del fármaco en partículas con mayor carga a un aumento de la porosidad del sistema además de que a mayor fármaco cargado, se reduce la barrera difusional del polímero. En el presente trabajo se puede decir que la rápida liberación del fármaco se debió a su alta solubilidad en el medio de disolución y no a la carga de fármaco.

Para fármacos hidrofílicos, se puede citar el trabajo de Cohen-Sela et al (2009) quienes reportaron que el 89.2 % de alendronato de había liberado a los 240 minutos utilizando la técnica de muestreo y separación. Con respecto a sistemas cargados con gluconato de clorhexidina los reportes son escasos pero se puede mencionar el trabajo de Yue et al (2004) en donde los sistemas acoplados con ciclodextrinas lipofílicas mantuvieron una liberación de más de dos semanas, lo cual puede ser explicado con base a estos excipientes utilizados. Lboutoune et al (2002) reportaron una rápida liberación de clorhexidina base correspondiente al 50% del total encapsulado a las 4 horas, para registrar después una meseta de entre 4 y 12 horas. Con el propósito de diferenciar el comportamiento de liberación entre gluconato de clorhexidina y su forma base, desde 1996 Medlicott et al prepararon laminillas bucales de PCL cargadas con acetato de clorhexidina mostraron que la liberación era más rápida con la forma base debido a que la PCL se degrada en presencia de bases fuertes debido a la hidrólisis de sus enlaces éster, además de que la forma base posee un coeficiente de partición octanol-agua mucho mayor (0.754) que el de la sal (0.037). Esta



información podría sugerir que si las nanopartículas se hubieran cargado con la forma base se podría esperar una liberación aún más rápida que con el gluconato.

Se puede decir que otro factor que propició la rápida liberación del fármaco fue la gran área superficial que presentan las nanopartículas. Hua et al (2014) prepararon nanopartículas (diámetro- 220.9 ± 7.4 nm) y micropartículas (diámetro- $1.45 \mu\text{m}$) cargadas con ciprofloxacino reportando 63.4 % y 41.3 % liberado a los 14 días lo cual atribuyeron a que, según sus cálculos, el área superficial teórica para nanopartículas era 7 veces mayor que aquella para las micropartículas.

Si se compara este resultado con otros reportados para encapsulamiento de sustancias hidrofílicas de bajo peso molecular se podría mencionar el trabajo de Hoffart et al (2002), en donde la heparina de bajo peso molecular (8000 Da) encapsulada en partículas de PCL alcanzó la dosis máxima liberada **hasta las 24 horas, iniciando con un “burst” en los primeros 30 minutos. A pesar del** carácter altamente hidrofílico de esta proteína, su peso molecular sigue siendo mucho más elevado que el del gluconato de clorhexidina, cuyo valor equivale a tan sólo 897.77 Da. En este trabajo se cita además que la liberación de la heparina desde nanopartículas de Eudragit® RL se vio limitada debido a las fuertes interacciones entre el fármaco y el polímero en contraste con la presente investigación, en donde las interacciones entre PCL y gluconato de clorhexidina son débiles. Estas interacciones débiles se pueden explicar a la forma dicatiónica del gluconato de clorhexidina que se presenta en valores de pH de 5 a 8 (como se puede ver en la figura 12) y la estructura alifática de la poli- ϵ -caprolactona que se puede ver en la figura 25.

Para caracterizar el proceso de liberación, se llevó a cabo el ajuste a modelos cinéticos. Se evaluaron seis modelos: orden 0 (Mt vs t), orden 1 ($\ln Mt$ vs t), ley de potencia de Korsmeyer-Peppas ($\ln Mt/M^\infty$ vs $\ln t$), ecuación de Higuchi (Mt/M^∞ vs \sqrt{t}), ecuación de Hixson-Crowell ($^3\sqrt{M^\infty - Mt}$ vs t) y modelo de Weibull ($\ln(-\ln(1 - Mt/M^\infty))$ vs $\ln t$). Los resultados se muestran en la tabla 47.

Tabla 46. Ajuste de la liberación *in vitro* a modelos cinéticos.

Prueba	Orden 0		Orden 1		Higuchi	
	r^2	K_0 (mg/min)	r^2	K_1 (min^{-1})	r^2	K_H ($\text{mg}/\text{min}^{1/2}$)
1	0.7748	0.001	0.454	0.017	0.989	0.989
2	0.7833	0.0014	0.5849	0.017	0.9782	0.9782
3	0.835	0.0018	0.6101	0.0106	0.9501	0.9501

Tabla 46. Ajuste de la liberación *in vitro* a modelos cinéticos (continuación).

Prueba	Korsmeyer-Peppas		Hixson-Crowell		Weibull	
	r ²	n	r ²	K _{HC} (mg/min ^{1/3})	r ²	B
1	0.9745	0.7506	0.9342	-0.0212	0.9892	0.8672
2	0.9882	0.7201	0.7942	-0.5573	0.9859	0.9169
3	0.9636	0.7086	0.8341	-0.5848	0.9821	0.9333

Se observa que el mejor ajuste se obtuvo con los modelos de Korsmeyer-Peppas, Higuchi y Weibull ($r^2 > 0.95$), entre los cuales el mejor fue de Weibull ($r^2 > 0.98$).

Para los modelos de orden 0 y orden 1 se obtuvieron valores máximos del coeficiente de determinación igual a 0.835 y 0.6101, respectivamente. El modelo cinético de orden 0 se aplica a aquellas formas farmacéuticas que no se desintegran y liberan el fármaco lentamente como sistemas que contienen fármacos de baja solubilidad en agua incluidos en formas recubiertas, sistemas osmóticos, etc. Por su parte el modelo cinético de orden 1 explica la liberación de fármacos hidrofílicos incluidos en matrices porosas, en donde la liberación es dependiente de la concentración del fármaco en el sistema (Suvakanta et al, 2010). Se puede decir que la liberación del fármaco no se puede explicar por ninguno de estos dos modelos debido al bajo coeficiente de determinación.

Otro modelo con el que se obtuvo un bajo ajuste fue con el de Hixson y Crowell ya que su coeficiente de determinación máximo fue de 0.9342. De acuerdo a Viseras (2008), el modelo de Hixson y Crowell se ha empleado para el ajuste de datos de liberación asumiendo que la forma geométrica inicial se mantiene constante y se produce una disminución de superficie asociada a la disolución de la forma farmacéutica. Se puede decir que este modelo no permite explicar la liberación del fármaco ya que no existe una disminución de la superficie asociada a las nanopartículas, las cuales presentan alta hidrofobicidad debido a las propiedades de la PCL.

Para el modelo de Higuchi se obtuvo un coeficiente de determinación máximo de 0.989. Higuchi fue el primero en postular un modelo matemático para describir la liberación de fármacos desde sistemas matriciales en 1961. Para estudiar la disolución del fármaco desde sistemas planos heterogéneos matriciales y la concentración del fármaco es menor que su solubilidad y la liberación ocurre a través de poros, el modelo está dado por la siguiente ecuación:

$$f_t = Q = \sqrt{\frac{D\delta}{\tau} (2C - \delta C_s) C_s t}$$

En donde D es el coeficiente de difusión del fármaco en el solvente, δ es la porosidad de la matriz, τ es la tortuosidad y Q , A , C_s y t son la fracción liberada, el área superficial de la matriz y la solubilidad del fármaco, respectivamente. Higuchi basó su modelo en la primera ley de Fick



planteando un estado estacionario ($C \gg C_s$ y condiciones “sink”), por lo que el transporte del fármaco está regido por procesos de difusión (Viseras, 2008). Con base a que se demostró por calorimetría diferencial de barrido que el gluconato de clorhexidina se encontraba disperso molecularmente en la matriz de PCL se puede utilizar este modelo para explicar la liberación basada en un proceso de difusión.

En el caso del modelo de Korsmeyer-Peppas el valor máximo para el coeficiente de determinación fue de 0.9882. Este modelo fue desarrollado con base en el modelo de Higuchi presenta varias limitaciones. Korsmeyer y Peppas desarrollaron una expresión simple relacionando el valor exponencial del fármaco liberado con el tiempo y adicionando un valor n conocido como exponente de difusión el cual es utilizado para caracterizar el mecanismo de liberación del fármaco. Posteriormente, este parámetro fue relacionado con la geometría de la matriz y si el sistema es hinchable o no hinchable. Los mecanismos se resumen en la siguiente tabla (Freire et al, 2014).

Tabla 47. Mecanismos de transporte desde sistemas matriciales de acuerdo al modelo Korsmeyer-Peppas.

Forma geométrica	Exponente de difusión		Mecanismo de liberación del fármaco	Velocidad de liberación en función del tiempo
	Matriz hinchable	Matriz no hinchable		
Película	0.5	0.5	Difusión fickiana	Dependiente del tiempo $f(t^{1/2})$
	$0.5 < n < 1.0$	$0.5 < n < 1.0$	Transporte anómalo	Dependiente del tiempo $f(t^{n-1})$
	1.0	1.0	Transporte Caso II	Independiente del tiempo
	> 1	> 1	Transporte súper Caso II	Dependiente del tiempo $f(t^{n-1})$
Cilíndrica	0.45	0.5	Difusión	Dependiente del tiempo $f(t^{1/2})$
	$0.45 < n < 0.89$	$0.45 < n < 1.0$	Transporte anómalo	Dependiente del tiempo $f(t^{n-1})$
	0.89	1.0	Transporte Caso II	Independiente del tiempo
	> 1	> 1	Transporte súper Caso II	Dependiente del tiempo $f(t^{n-1})$
Esférica	0.43	0.43	Difusión	Dependiente del tiempo $f(t^{1/2})$
	$0.43 < n < 0.85$	$0.43 < n < 1.0$	Transporte anómalo	Dependiente del tiempo $f(t^{n-1})$
	0.85	1.0	Transporte Caso II	Independiente del tiempo
	> 1	> 1	Transporte súper Caso II	Dependiente del tiempo $f(t^{n-1})$

El exponente de difusión promedio de acuerdo al modelo de Korsmeyer-Peppas fue de 0.7262, lo cual indica que la liberación de gluconato de clorhexidina sigue un transporte anómalo dependiente del tiempo que implica procesos de difusión-erosión. Sin embargo, la mayoría de los reportes señalan a la difusión fickiana como el mecanismo prevalente de liberación para nanopartículas de PCL. Azevedo y Ricci-Junior (2011) prepararon nanopartículas de PCL cargadas con naproxeno y sus estudios demostraron ajustarse a un fenómeno de difusión fickiana, obteniendo un exponente de 0.4978. Por su parte, Kumar y Sawant (2013) prepararon un sistema nanoparticulado con el mismo polímero y cargado con exemestano obteniendo un exponente de 0.3057. Lokhande et al (2013) incluyeron glipezida en NPP de PCL encontrando un exponente de 0.4176.

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo, se podría pensar que las nanopartículas preparadas sufren erosión. Ferrari et al (2013) prepararon NPP de PCL-PEG y mencionaron que no ocurre degradación del polímero en su medio de prueba (buffer de fosfatos) al no observar cambios significativos en el tamaño e índice de polidispersión (PDI) durante un mes. A pesar de estas observaciones, Kreuter (1994) indicó que en el caso de nanopartículas poliméricas, sobre todo



aquellas hechas de poliésteres, su pequeño tamaño incrementa considerablemente el área superficial expuesta al medio de disolución, lo cual facilita significativamente la erosión del polímero en la superficie. Además, Lokhande et al (2013) indicaron que, gracias a la estructura semicristalina de la PCL, el medio de disolución puede penetrar dentro de la parte amorfa de la matriz polimérica lo cual facilita la liberación del fármaco por difusión. Si se toma en cuenta que la PCL presenta regiones amorfas en su superficie que permiten penetrar el medio de disolución y que el gluconato de clorhexidina es altamente afín a este medio, se puede explicar el exponente de difusión obtenido, además que las nanopartículas preparadas por Ferrari et al (2013) presentaban un recubrimiento de PEG, lo que limitó la penetración del medio.

Con respecto al modelo de Weibull se encontró un coeficiente de determinación máximo de 0.9892. Viseras (2008) menciona que se trata de un modelo semiempírico que fue planteado para el estudio estadístico de poblaciones de distinto origen y fue propuesto por Langenbeucher en 1972 para el análisis de datos de liberación de fármacos. Este modelo incluye el parámetro “b”, conocido como el “parámetro de forma”, el cual, si toma un valor igual a 1, el proceso es exponencial, si el valor es mayor a 1 el proceso es sigmoideo y si b es menor a 1 el proceso es exponencial con brusco aumento inicial o “burst”.

Con respecto al alto coeficiente de determinación en el ajuste al modelo de Weibull se puede decir que los datos de liberación pertenecen a una sola población por lo que la liberación corresponde a un solo proceso. Para el parámetro “b” se obtuvo un valor promedio de 0.9058, lo cual de acuerdo a Viseras (2008), indica que la liberación presenta un efecto inicial “burst” y que coincide con el hecho de que el fármaco fue liberado rápidamente.

4 Incorporación de nanopartículas poliméricas en laminillas orodispersables

4.1 Determinación de tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta

Como parte final de la investigación se incorporaron las nanopartículas poliméricas cargadas con gluconato de clorhexidina en las laminillas orodispersables. Para las nanopartículas poliméricas se utilizó el lote 5 y para las laminillas se siguieron las condiciones de preparación indicadas para el lote 1, ya que en ambos casos estos lotes presentaban las mejores características de preparación de acuerdo a los análisis de optimización. Como primera evaluación, se determinó el tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta de las partículas obtenidas a partir de la disolución de una laminilla. Los resultados se muestran en la tabla 50 y en los gráficos 33 y 34.

Tabla 48. Tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta de NPP en laminillas orodispersables.

Lote	Tamaño de partícula (nm)	Índice de polidispersión	Potencial zeta (mV)
Nanopartículas poliméricas en laminillas	581.4	0.064	-1.35
	592.7	0.043	-1.25
	616.3	0.102	-1.32



Tabla 48. Tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta de NPP en laminillas orodispersables (continuación).

Lote	Tamaño de partícula (nm)	Índice de polidispersión	Potencial zeta (mV)
PROMEDIO	596.8	0.086	-1.30
	Desviación estándar=17.807		
	Coefficiente de variación=2.983 %		

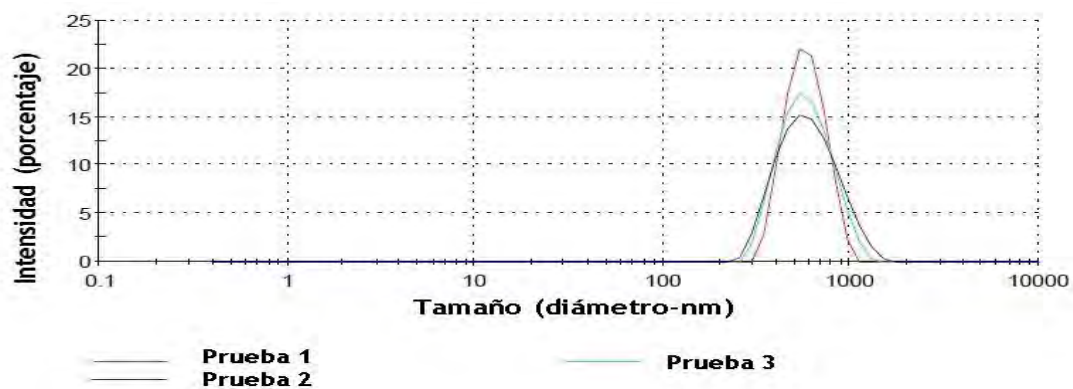


Gráfico 33. Distribución de tamaño de partícula para NPP en gel.

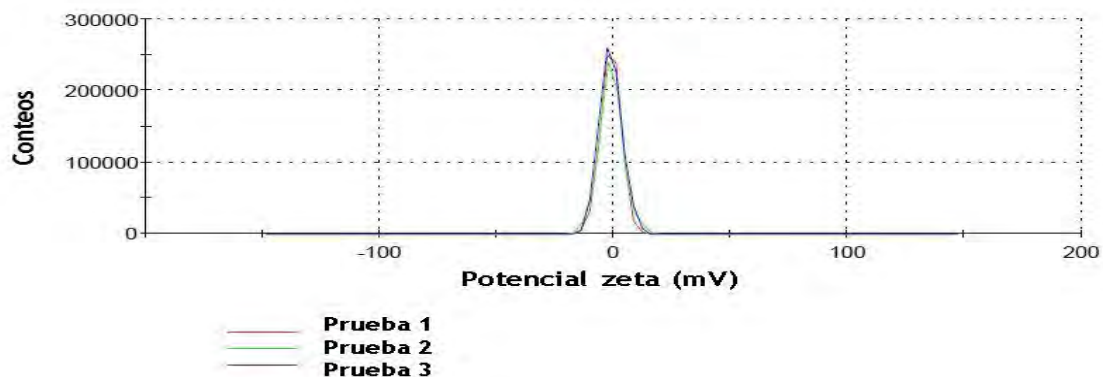


Gráfico 34. Distribución de potencial zeta de NP en gel.

El tamaño de partícula promedio fue de 596.8nm. Este parámetro aumentó con respecto a las partículas obtenidas en la resuspensión del liofilizado (380 nm), lo cual puede atribuirse al poco tiempo de sonicación empleado para su inclusión en las laminillas (40 segundos). Sin embargo, se

utilizó este tiempo en la preparación ya que, tal como se indicó en el análisis de liberación desde nanopartículas, el fármaco migra rápidamente hacia medios acuosos. Con respecto al grado de variación entre los tamaños de las partículas, se obtuvo una desviación estándar de 17.807 nm y un coeficiente de variación de 2.983 %; el índice de polidispersión promedio fue de 0.086. De acuerdo a los resultados y con base en los criterios de la técnica de dispersión de luz dinámica se puede decir que las partículas pertenecen a una población monodispersa, con lo que se demostró que a pesar del secado en estufa al que fueron expuestas las laminillas en que se incluyeron, las partículas no presentaron problemas de agregación considerables que elevaran su tamaño del rango submicrónico, con lo que además se demuestra la efectividad del manitol como agente crioprotector.

Con respecto al potencial zeta encontrado, el valor fue de -1.30, el cual no varió considerablemente con respecto al de las partículas suspendidas en agua desionizada (-4.52), con lo que se puede decir que el gel de HPMC no afecta el valor de este parámetro.

4.2 Análisis de laminillas con nanopartículas por colorímetro

Se obtuvieron laminillas opacas, suaves y flexibles; los resultados se muestran en la figura 46.

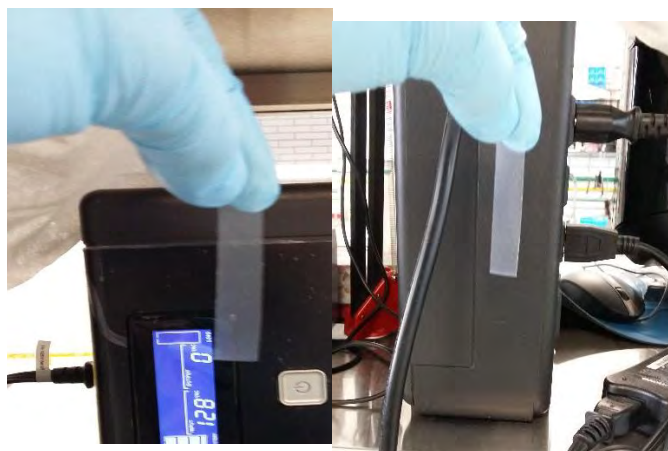


Figura 59. Laminillas orodispersables con nanopartículas.

Las laminillas se analizaron las laminillas en colorímetro. Se calcularon los parámetros L^* , a^* y b^* y se compararon con aquellos obtenidos para las laminillas sin nanopartículas. Los resultados se muestran en la tabla 51 y el gráfico 35.

Tabla 49. Evaluación de laminillas con NPP en colorímetro.

Lote	L^*	a^*	b^*
Laminillas con nanopartículas	10.873	-0.213	-2.493

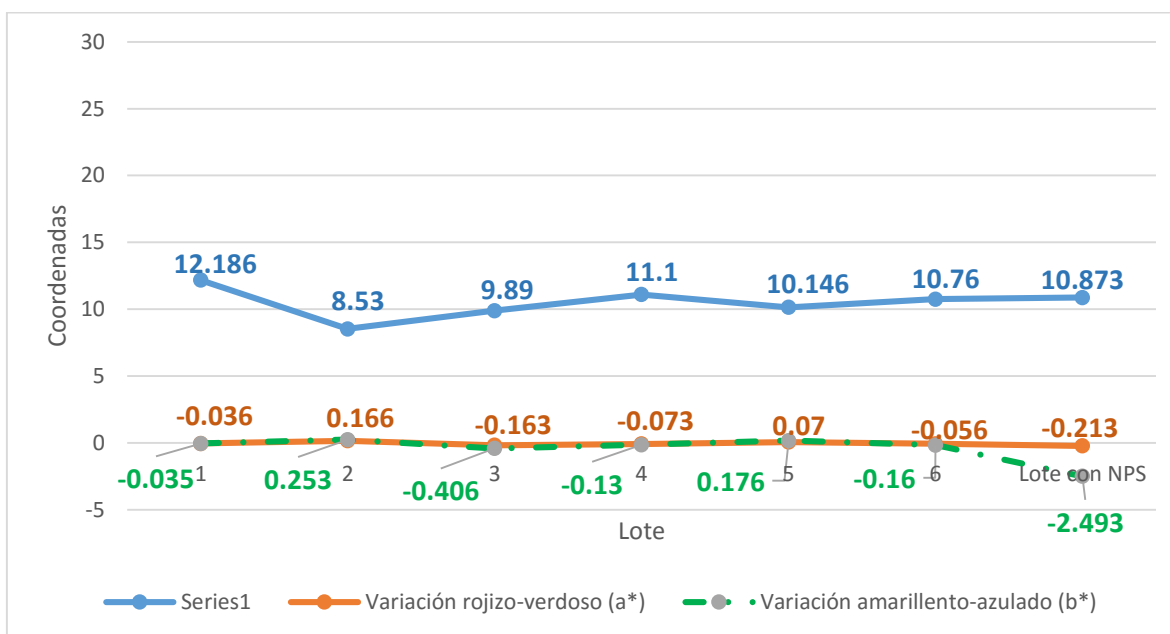


Gráfico 35. Parámetros del CIE para laminillas orodispersables.

Se encontró que las laminillas no cambiaron su valor de luminosidad con respecto a aquellas sin nanopartículas al igual que con los parámetros de cromaticidad a excepción de un valor ligeramente desplazado hacia el azul ($b^* = -2.493$) y el verde (-0.213). Zuñiga et al (2013) prepararon laminillas de HPMC en donde incluyeron emulsiones aceite en agua con diferentes tamaños de partícula (2.71-3.79 μm) analizando el efecto de la microestructura en las propiedades ópticas de las películas y encontraron índices de blancura con valores mayores a 90, lo cual atribuyeron a la presencia de los glóbulos de la emulsión lo que provocó a que mayor cantidad de luz fuera dispersada y menor cantidad pudiera ser transmitida a través de las emulsiones. Este trabajo da una idea acerca de lo que se observó en la presente en investigación ya que, de acuerdo a Jai (2015) una propiedad interesante de las partículas coloidales en suspensión es que, debido a su forma y tamaño, pueden dispersar la luz blanca en el proceso conocido como efecto Tyndall. Los colores observados en las laminillas con nanopartículas fueron azul y verde, colores que comprende longitudes de onda de 450 a 570 nm, lo cual coincide con el tamaño de partícula encontrado (596.8 nm) y permite decir que el color observado se debió a la dispersión de luz en ese espacio del espectro electromagnético.

4.3 Liberación *in vitro* de gluconato de clorhexidina desde laminillas con nanopartículas

Los estudios de liberación desde la forma farmacéutica final se llevaron a cabo utilizando la técnica de diálisis con el fin de evitar que la laminilla flotara en el medio de disolución además de mantener las nanopartículas contenidas dentro de la membrana evitando la necesidad de filtrar las muestras para cuantificar el fármaco, pues esta técnica puede llevar a errores. Los resultados se muestran en el gráfico 36.

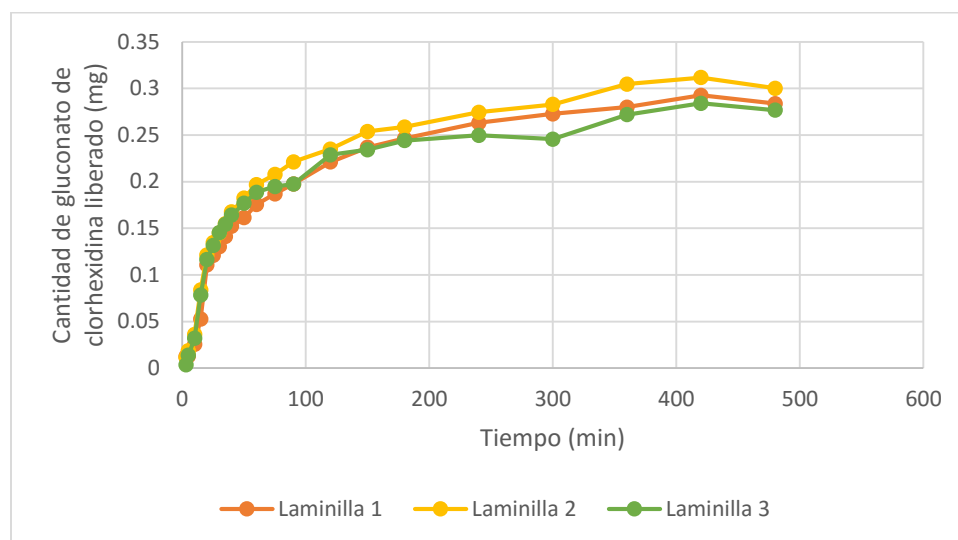


Gráfico 36. Liberación *in vitro* de gluconato de clorhexidina desde laminillas con NPP.

Como se puede ver, la cantidad máxima liberada desde una laminilla fueron 0.3 mg en 7 horas. Esto muestra que existió una prolongación del tiempo de liberación de 4 horas más con respecto a las nanopartículas. Se encontraron escasos reportes en la literatura de nanopartículas incluidas en laminillas orodispersables para comparar, sin embargo se puede mencionar el trabajo de Shen et al (2014) en donde prepararon nanopartículas de herpetrion preparadas por homogeneización de alta presión e incluidas en laminillas de HPMC en donde las laminillas con fármaco presentaron el máximo de liberación a los 10 minutos con respecto a las laminillas convencionales que reportaron sólo el 20 % de la dosis liberada para el mismo tiempo. Mazzarino, Borsali y Lemos-Senna (2014) incluyeron nanopartículas de PCL cargadas con curcumina incluidas en laminillas de quitosán reportando una disminución en el tiempo de liberación para laminillas con nanopartículas en comparación con laminillas con fármaco únicamente, lo cual atribuyeron al carácter altamente hidrofóbico del fármaco. En estos dos reportes el objetivo de las nanopartículas era aumentar precisamente a velocidad de liberación del fármaco debido a su carácter fuertemente lipofílico, en contraste con la presente investigación, en donde se deseaba prolongar direccionar el fármaco, protegerlo del medio biológico y aumentar su tiempo de liberación. No se encontraron reportes de laminillas con nanopartículas poliméricas como el del presente trabajo.

Regresando al gráfico 36, se observa un claro efecto “burst” registrado, de acuerdo a los datos del anexo (anexo de datos liberación), antes de los 20 minutos. De acuerdo a Freire et al (2014), un efecto “burst” se presenta con la liberación de fármaco existente en la superficie del sistema matricial o a cambios en su estructura permitiendo una liberación inmediata del fármaco. Con base a que se explicó que el fármaco es rápidamente liberado de las nanopartículas, se puede decir que este efecto “burst” se observó gracias a que, en el proceso de preparación, una parte de fármaco migró hacia el agua desionizada donde fueron resuspendidas y quedó atrapada dentro de la matriz de HPMC la cual, al hincharse rápidamente, permitió su inmediata liberación mientras la fracción restante mantuvo la liberación hasta 7 horas más.

Para determinar si existían diferencias significativas entre las características de liberación del fármaco desde solución, desde nanopartículas y desde laminillas con nanopartículas, se tomó en



cuenta la cantidad máxima liberada (M_{∞}) para calcular el porcentaje liberado en cada laminilla. Y se realizó un análisis de varianza para el porcentaje liberado a los 40 minutos.

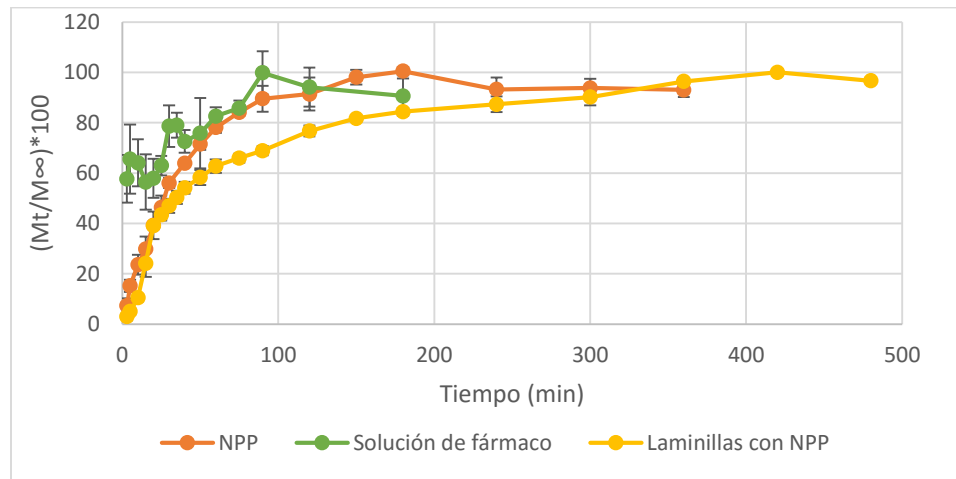


Gráfico 37. Liberación *n vitro* de gluconato de clorhexidina desde solución, nanopartículas y laminillas con nanopartículas.

Tabla 50. Análisis de varianza para el porcentaje de fármaco liberado a los 40 minutos para solución, nanopartículas y laminillas con nanopartículas.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	662.990	2	331.495	36.670	0.0004	5.143
Dentro de los grupos	54.239	6	9.039			
Total	717.229	8				

El planteamiento de hipótesis es el siguiente:

H_0 =El porcentaje de gluconato de clorhexidina liberado a los 40 minutos para la solución de fármaco, nanopartículas y laminillas con nanopartículas es igual para todos los sistemas.

H_a =El porcentaje de gluconato de clorhexidina liberado a los 40 minutos para la solución de fármaco, nanopartículas y laminillas con nanopartículas es diferente para al menos uno de los sistemas.

El estadístico de contraste es el siguiente:

Si $f_{cal} < f_c$ No se rechaza la H_0

Si $f_{cal} \geq f_c$ Se rechaza la H_0

$$F_{cal} = 36.670 \cdot F_{crítica} = 5.143$$



Como F calculada es mayor a F crítica, se dice que la cantidad liberada de al menos un sistema es diferente. Para encontrarlas diferencias, se hizo una prueba de Tukey.

Tabla 51. Prueba de Tukey para cantidad de fármaco liberado.

Comparación de las medias	Diferencia entre las medias	Diferencia honestamente significativa (HSD)
Solución y nanopartículas	11.247	7.533
Solución y laminillas	21.006	
Nanopartículas y laminillas	9.758	

Los resultados indican que la cantidad liberada a los 40 minutos es estadísticamente diferente para los tres sistemas ($F_{calculada}=36.670 > F_{crítica}=5.143$, $p=0.0004$), lo cual se corroboró con la prueba de Tukey (Diferencias de medias: 11.247, 21.006, 9.753; DHS=7.533).

Para analizar el mecanismo de liberación, se realizó el ajuste a los modelos cinéticos de orden 0 (**Mt vs t**), orden 1 (**ln Mt vs t**), ecuación de Higuchi (**Mt/M ∞ vs \sqrt{t}**), ecuación de Hixson-Crowell (**$\sqrt[3]{M/M\infty}$ -Mt vs t**) ley de potencia de Korsmeyer-Peppas (**ln Mt/M ∞ vs lnt**) y modelo de Weibull (**ln(-ln(1-Mt/M ∞)) vs lnt**), tomando en cuenta la cantidad máxima de fármaco liberado.

Tabla 52. Ajuste de la liberación *in vitro* a modelos cinéticos.

Prueba	Orden 0		Orden 1		Higuchi	
	r^2	K_0 (mg/min)	r^2	K_1 (min ⁻¹)	r^2	K_H (mg/min ^{1/2})
1	0.7158	0.0006	0.3995	0.0049	0.9601	0.1107
2	0.6927	0.0006	0.3671	0.0045	0.9677	0.1139
3	0.6407	0.0005	0.2887	0.0048	0.9651	0.1248
Prueba	Korsmeyer-Peppas		Hixson-Crowell		Weibull	
	r^2	n	r^2	K_{HC} (mg/min ^{1/3})	r^2	B
1	0.9558	1.0329	0.9337	-0.0089	0.9511	0.9699
2	0.9661	1.0616	0.932	-0.0139	0.9353	0.8836
3	0.942	1.3715	0.8704	-0.0069	0.8723	0.9618

Para los modelos de orden 0, orden 1 y Hixson-Crowell, los coeficientes de determinación más altos fueron 0.7156, 0.3995 y 0.9337 respectivamente, indicando claramente que dichos modelos no permiten explicar satisfactoriamente la liberación. Para los modelos de Higuchi, Korsmeyer-Peppas y Weibull los coeficientes de determinación más altos fueron de 0.9677, 0.9661 y 0.9511, respectivamente, valores de ajuste menores obtenidos para las nanopartículas solas (0.989, 0.9882 y 0.9892). A pesar de que, como se mencionó anteriormente el modelo de Higuchi fue el primero propuesto para analizar la liberación de fármacos desde sistemas matriciales y se ha convertido en un estándar para el análisis de sistemas farmacéuticos, no es válido para explicar la liberación desde varios sistemas de liberación ya que tiene ciertas restricciones: la difusión se da en un estado pseudoestacionario con condiciones *sink* perfectas, la difusión en un solo sentido, el hinchamiento de la matriz puede ser despreciable y la difusión del fármaco es constante. Como en esta investigación se utilizaron laminillas de HPMC que es conocido como un excipiente con alto índice de hinchamiento y que presenta efecto “burst” para la mayoría de las formas farmacéuticas (Tiwari y Rajabi-Siahboomi, 2008), se puede explicar el bajo ajuste de los datos de liberación desde laminillas con nanopartículas para este modelo.

Aunque el ajuste al modelo de Korsmeyer-Peppas también fue bajo, el exponente de difusión promedio encontrado fue de 1.155, lo cual de acuerdo a las tablas 45 y 46 indica un transporte Super caso II para matrices hinchables, dependiente del tiempo y permite explicar los fenómenos involucrados en la liberación. De acuerdo a Freire et al (2014) el Súper transporte caso II explica el mecanismo de liberación por una combinación de procesos de difusión y relajación/disolución de cadenas poliméricas en contraste con la simple difusión fickiana. De acuerdo a Viseras (2008), en el extremo del gel en contacto con el disolvente, la concentración polimérica es muy baja y la asociación entre cadenas muy débil, lo que determina su disolución en el medio. Cabe mencionar que este mecanismo de liberación ha sido utilizado para explicar la liberación de fármacos desde tabletas embebidas en matrices de HPMC.

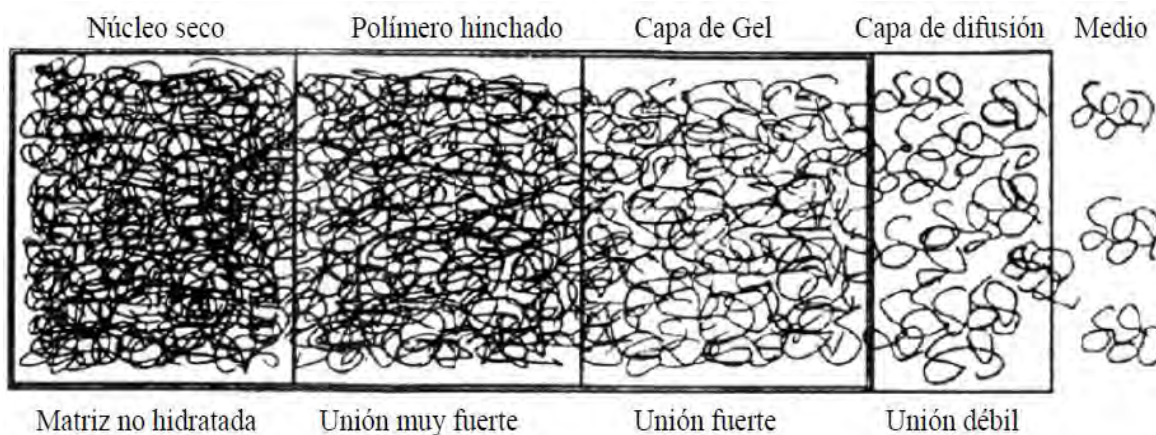


Figura 60. Representación del nivel de disociación de las cadenas de polímero en una matriz hidrofílica (Tomada de Viseras, 2008).

Tomando en cuenta lo anterior, se podría decir que el exponente de difusión obtenido se debe al hinchamiento progresivo de la HPMC. De acuerdo a Tiwari y Rajabi-Siahboomi (2008), el mecanismo de liberación del fármaco desde matrices hidrofílicas está basado en la disolución del fármaco (si es que es hidrofílico), la difusión del fármaco a través de la porción hidratada de la matriz y erosión de la capa externa de la matriz. Normalmente cuando la matriz hidrofílica es expuesta a un medio



acuoso, la superficie **se hidrata y forma una estructura gelatinosa conocida como “la capa de gel”**, la cual aumenta su espesor mientras más agua penetra en la matriz, formando una barrera de difusión para la liberación del fármaco. Con base a lo anterior, se puede decir que el retardo en la liberación se debió a que las nanopartículas quedaron atrapadas en la matriz de HPMC debido a la alta viscosidad de esta capa hidratada. Existen algunos reportes que mencionan la prolongación del tiempo de liberación combinando matrices hidrofílicas de HPMC con materiales hidrofóbicos. Ganesh et al (2008) prepararon tabletas de zidovudina encontrando que las tabletas con matriz de HPMC K4 M y Carbopol 934 liberaron el fármaco en un total de 6 horas, comparadas con las tabletas que contenían etilcelulosa hidrofóbica que retardaron la liberación del fármaco hasta 12 horas lo cual atribuyeron a la formación de una estructura más rígida que limitó la liberación del fármaco. Si la HPMC impidió la rápida migración de las nanopartículas hacia la saliva simulada debido a alguna interacción, esto podría explicar el aumento en el tiempo de liberación.

Contrastando los resultados con respecto a las características de liberación desde laminillas de HPMC, Juliano et al (2008) reportaron para laminillas cargadas con acetato de clorhexidina que el 80 % de la dosis se liberó en los primeros 30 minutos mientras que el resto de la dosis se liberó en las siguientes 3 horas. Con base en estos datos, se puede decir que la prolongación del tiempo de liberación de gluconato de clorhexidina se debió a la barrera que ofrece la HPMC para la liberación de las nanopartículas, además de la barrera que ofrecen las nanopartículas para la liberación del fármaco.

Con respecto al modelo de Weibull, se mencionó anteriormente que este es un modelo semiempírico que permite analizar si los datos pertenecen o no a diferentes poblaciones. Con base en el coeficiente de determinación máximo para este modelo ($r^2 > 0.9551$), se puede decir que los datos **presentan dos tendencias originadas por el efecto “burst” reportado, ya que después de este evento la velocidad de liberación disminuyó. Además, el valor promedio del parámetro “b” fue muy alto (0.9374)**, lo que confirma el brusco inicio del proceso. Para analizar los mecanismos que **rigen la liberación sin el efecto “burst”, se ajustaron los datos a los modelos cinéticos a partir de los 25 minutos.**

Tabla 53. Ajuste a modelos cinéticos eliminando **el efecto “burst”** (análisis a partir de los 25 minutos).

Prueba	Orden 0		Orden 1		Higuchi	
	r^2	K_0 (mg/min)	r^2	K_1 (min ⁻¹)	r^2	K_H (mg/min ^{1/2})
1	0.8656	0.0004	0.7878	0.0021	0.9869	0.054
2	0.8648	0.0004	0.7837	0.0019	0.966	0.048
3	0.8449	0.0003	0.7765	0.0017	0.9748	0.0465

Tabla 53. Ajuste a modelos cinéticos **eliminando el efecto “burst”** (análisis a partir de los 25 minutos) (continuación).

Prueba	Korsmeyer-Peppas		Hixson-Crowell		Weibull	
	r ²	n	r ²	K _{HC} (mg/min ^{1/3})	r ²	B
1	0.9924	0.3654	0.9465	-0.0008	0.997	0.66
2	0.9804	0.3345	0.9158	-0.0134	0.9974	0.5748
3	0.9827	0.3077	0.9307	-0.0058	0.9665	0.4994

Como en las liberaciones desde nanopartículas, los coeficientes de determinación más altos se encontraron con los modelos de Higuchi, Korsmeyer-Peppas y Weibull, con valores de 0.9869, 0.9924 y 0.9974, respectivamente. Con los modelos de orden 0, orden 1 y Hixson-Crowell el ajuste fue menor a 0.95 en todos los casos, indicando que no son satisfactorios para explicar el proceso.

Con respecto al modelo de Higuchi, se puede decir que la liberación obedece a procesos de difusión **del fármaco, en los cuales no existe la interferencia del efecto “burst”**. Para el modelo de Korsmeyer-Peppas, el coeficiente de difusión promedio fue de 0.3358. Este resultado no coincide para lo obtenido para las nanopartículas solas ($n_{\text{promedio}}=0.7262$, difusión-erosión), ya que indica que el fármaco es liberado desde el sistema por difusión fickiana. Sin embargo, como se discutió anteriormente, la mayoría de los reportes para nanopartículas de PCL indican que la liberación obedece a un proceso de difusión fickiana y se indicó que el efecto de erosión obtenido para las nanopartículas solas se debió a la rápida migración del fármaco gracias a su alta solubilidad en agua. Así, en este análisis de liberación desde laminillas eliminando el efecto **“burst”** que igualmente se debió a la solubilidad del fármaco en agua, se puede decir que la difusión del fármaco obedece a un proceso de difusión fickiana.

Para el modelo de Weibull se obtuvo un coeficiente de determinación máximo de 0.9974, lo cual indica que los datos pertenecen a una sola población. Además, se encontró un valor promedio del **parámetro “b”** de 0.5780, valor mucho menor al encontrado para las nanopartículas solas (0.9058).

5 Comparación de las características de la forma farmacéutica obtenida con otras utilizadas en el tratamiento de enfermedades periodontales

Como se mencionó en el análisis del contenido químico de laminillas sólo con fármaco, de la dosis de gluconato de clorhexidina administrada normalmente en un enjuague bucal, el 70% se pierde. Precisamente por esta razón actualmente la investigación con respecto a tratamientos **periodontales se ha enfocado a los dispositivos “intrapocket” ya que permiten liberar el fármaco** en el sitio de acción generando concentraciones altas concentraciones de activo evitando



reacciones adversas que generalmente se presentarían con las terapias convencionales. En la presente investigación la principal premisa fue que las nanopartículas desarrolladas tienen el potencial de penetrar en la bolsa periodontal y liberar el fármaco de manera específica.

De acuerdo a Bascones y Morante (2006) la pauta terapéutica de un antiséptico bucal viene determinada por la concentración mínima inhibitoria para las bacterias asociadas a patologías dentales. Esta concentración debe estar dada en el volumen fisiológico en donde se van a aplicar las nanopartículas. De acuerdo a Lindhe, Karring y Araújo (2008) el volumen de fluido gingival crevicular en una bolsa periodontal después de una acumulación de placa de 21 días asciende a 0.5 μ L (0.005 mL). Tomando en cuenta que la laminilla desarrollada tiene un área superficial de 5 cm² y puede colocarse sobre cinco piezas dentales penetrando en un volumen total de 0.025 mL de fluido gingival crevicular, se calcularon las concentraciones aproximadas de fármaco. Los resultados se presentan en la tabla 56 y en el gráfico 38.

Tabla 54. Aproximación de la concentración de gluconato de clorhexidina sobre el volumen de fluido gingival crevicular supuesto obtenida desde la forma farmacéutica preparada.

Tiempo (min)	Cantidad promedio de gluconato de clorhexidina liberada (μ g)	Volumen de fluido en 5 bolsas periodontales (mL)	Concentración aproximada de gluconato de clorhexidina (μ g/mL)
3	9.144 \pm 4.867	0.025	365.789 \pm 194.719
5	14.993 \pm 3.096	0.025	599.736 \pm 123.845
10	31.203 \pm 5.215	0.025	1248.157 \pm 208.613
15	71.592 \pm 16.605	0.025	2863.684 \pm 664.147
20	116.059 \pm 5.184	0.025	4642.368 \pm 207.390
25	129.111 \pm 7.294	0.025	5164.473 \pm 291.793
30	140.026 \pm 8.66	0.025	5601.052 \pm 346.500
35	150.019 \pm 7.781	0.025	6000.789 \pm 311.241
40	161.263 \pm 8.077	0.025	6450.526 \pm 323.114
50	173.559 \pm 10.922	0.025	6942.368 \pm 436.881
60	187.006 \pm 10.805	0.025	7480.263 \pm 432.214
75	196.44 \pm 10.414	0.025	7857.631 \pm 416.573
90	205.381 \pm 13.674	0.025	8215.263 \pm 546.977
120	228.269 \pm 6.974	0.025	9130.789 \pm 278.962
150	241.684 \pm 10.618	0.025	9667.368 \pm 424.729
180	249.638 \pm 7.88	0.025	9985.526 \pm 315.229
240	262.427 \pm 12.449	0.025	10497.105 \pm 497.999
300	267.026 \pm 19.284	0.025	10681.052 \pm 771.368
360	285.473 \pm 17.066	0.025	11418.947 \pm 682.655
420	296.092 \pm 14.087	0.025	11843.684 \pm 563.506

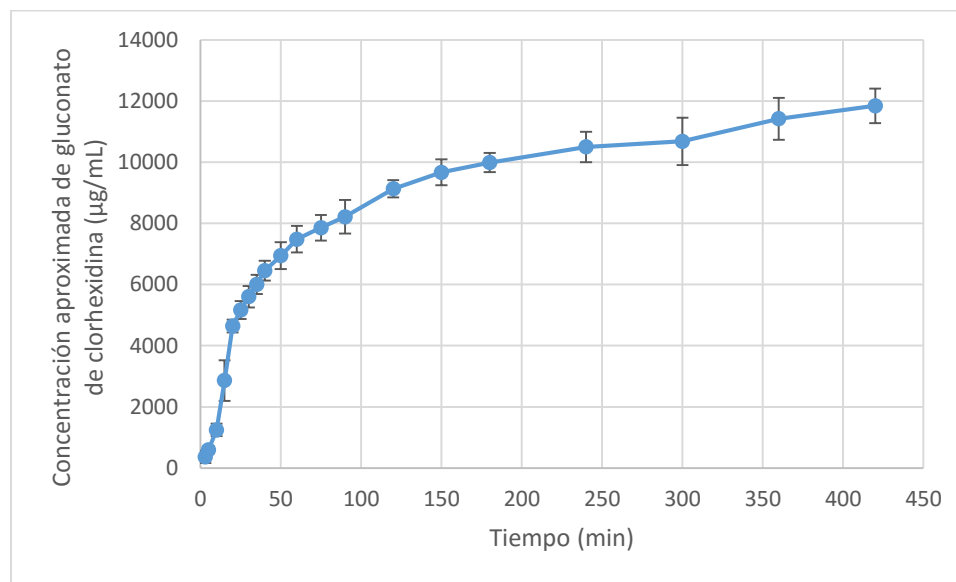


Gráfico 38. Concentración aproximada de gluconato de clorhexidina sobre el volumen de fluido gingival crevicular supuesto obtenida desde la forma farmacéutica preparada.

La concentración aproximada al principio de la liberación *in vitro* fue de $365.789 \pm 194.719 \mu\text{g/mL}$ y al final fue de $11843.684 \pm 563.506 \mu\text{g/mL}$. De acuerdo a Solmaz y Korachi (2013) la CMI para gluconato de clorhexidina es de 1.5, 3, 6 y 6 $\mu\text{g/mL}$ para *S. mutans*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* y *P. gingivalis*, respectivamente, los cuales son algunos de los microorganismos responsables de la formación del biofilm subgingival. Además, Kobuger et al (2010) indicaron que la CMI para este fármaco va de 4 $\mu\text{g/mL}$ para *S. aureus* y 32 $\mu\text{g/mL}$ para *P. aeuruginosa*.

Se pueden comparar los resultados obtenidos en este trabajo con algunos de los dispositivos **“intrapocket”**. Uno de los más utilizados es el PerioChip®, el cual contiene 2.5 mg de gluconato de clorhexidina y se libera de manera bifásica con un efecto **“burst”** hasta las 24 horas en donde se libera el 40 % de la dosis (1 mg), seguido de una meseta de 7 a 10 días para el resto (1.5 mg) (U.S. National Institutes of Health, 2014). Con respecto a Arestin® (microesferas cargadas con clorhidrato de minociclina), en cada bolsa periodontal se coloca una unidad de dosificación equivalente a 1 mg de minociclina, la cual mantiene concentraciones efectivas (>1 $\mu\text{g/mL}$) que aparecen a los tres días de administración por 14 días, tiempo que varió ampliamente entre cada paciente (FDA, 2003).

ActiSite®, fibras que contienen tetraciclina, liberan el fármaco con una velocidad aproximada de $2\mu\text{g/cm}^2\text{h}$, generando concentraciones en el fluido gingival-crevicular de 1590 $\mu\text{g/mL}$ en un periodo de tiempo de 10 días (RxList Inc, 2015). Cabe mencionar que este producto ya no está en existencia en los Estados Unidos y sólo se puede encontrar en su forma genérica. Atridox® consiste en un gel bioabsorbible que contiene doxiciclina, el cual alcanza niveles de fármaco de 1500 $\mu\text{g/mL}$ a 2000 $\mu\text{g/mL}$ a las dos horas de aplicación; estos niveles se mantienen encima de 1000 $\mu\text{g/mL}$ en las siguientes 18 horas y se mantienen concentraciones mayores a la MIC (<6 $\mu\text{g/mL}$) hasta el séptimo día.

A diferencia de los dispositivos mencionados, la laminilla desarrollada en esta investigación presenta la ventaja de que puede colocarse cómodamente por el paciente sobre la superficie



gingival afectada, en donde poco a poco y gracias a la hidratación que presenta la HPMC, las nanopartículas son liberadas y puede penetrar en la bolsa periodontal en donde el fármaco es liberado a su vez en el sitio de acción requerido. Una de las principales desventajas de los dispositivos mencionados anteriormente es que requieren de la atención del profesional odontólogo para ser colocados dentro de la bolsa periodontal. La forma farmacéutica preparada ofrece entonces facilidad de aplicación además que se demostró que la doble barrera que ofrecen las nanopartículas y las laminillas permiten prolongar el tiempo de liberación del fármaco, así como disminuir la dosis requerida en cada administración y protegen al fármaco del medio biológico, manteniendo concentraciones efectivas durante el tiempo de liberación.



VIII. CONCLUSIONES

1. Se desarrolló un sistema analítico para cuantificar gluconato de clorhexidina en saliva simulada demostrando que es específico, lineal, preciso, exacto y reproducible.
2. Se determinó que el sistema analítico colorimétrico empleado para cuantificar alcohol polivinílico residual en las nanopartículas poliméricas es lineal.
3. Se desarrollaron laminillas orodispersables por el método de moldeo con disolvente realizando pruebas de preformulación con diferentes polímeros encontrando que Pharmacoat® 615 no presenta incompatibilidades con el gluconato de clorhexidina. Se seleccionaron las variables preparativas para las laminillas de Pharmacoat® 615 encontrando que las condiciones que permitían obtener mejores resultados eran 3 % p/v de polímero y secado en estufa. Se comprobó mediante MEB y DSC que las laminillas tienen una superficie homogénea libre de cristales.
4. Se prepararon nanopartículas poliméricas de PCL cargadas con gluconato de clorhexidina por la técnica de doble emulsificación- difusión y doble emulsificación utilizando ultrasonido en la emulsión primaria, encontrando que con ambas técnicas se obtienen tamaños nanométricos menores a 500 nm por lo que la adición de un exceso de agua en la preparación no es necesario. Se determinó que era necesaria la adición de manitol como agente crioprotector en proporción de 1 % p/v en el proceso de liofilización para mantener a las partículas en un tamaño menor a 600 nm. Se evaluaron las nanopartículas preparadas encontrando un valor de estabilizante residual de 3.25 %, eficiencia de encapsulamiento de 10.989% y eficiencia del proceso de 72.826 %. Se determinó mediante calorimetría diferencial de barrido que el gluconato de clorhexidina se encuentra disperso y/o disuelto a nivel molecular en la matriz de PCL. Se encontró mediante estudios de liberación *in vitro* utilizando la técnica de diálisis que la cantidad máxima liberada se presentó a las 3 horas, ajustándose a los modelos de Higuchi, Korsmeyer-Peppas y Weibull.
5. Se incluyeron las nanopartículas en las laminillas y se encontró un tamaño de partícula no mayor a 600 nm, además de observar un efecto Tyndall evaluado mediante colorimetría.
6. Se encontró que la liberación *in vitro* desde laminillas con nanopartículas prolongaba el tiempo de liberación hasta 7 horas, presentando un proceso bifásico con un efecto **“burst”**. El proceso en general mostró un mejor ajuste a los modelos de Higuchi, Korsmeyer-Peppas y Weibull, aunque los ajustes fueron mejores al analizar los datos eliminando el efecto **“burst”** (a partir de los 25 minutos).
7. Se determinó que la cantidad liberada puede mantener concentraciones efectivas del fármaco con respecto a las reportadas en la literatura.



IX. PERSPECTIVAS

Con base en los resultados obtenidos en esta investigación, se hacen las siguientes recomendaciones:

1. Adicionar a las laminillas excipientes que mejoren sus propiedades organolépticas como colorantes y saborizantes.
Evaluar las laminillas obtenidas de acuerdo a sus propiedades mecánicas, además de realizar estudios de tiempo de residencia *ex vivo* en mandíbula de cerdo.
2. Aumentar la eficiencia de encapsulamiento del gluconato de clorhexidina utilizando alguna de las siguientes estrategias:
 - a. Emplear ácido poli-(láctico-co-glicólico) como formador de nanopartículas;
 - b. Modificar el proceso de obtención a emulsificación- evaporación, por iónico o agregar agentes estabilizantes a la emulsión primaria;
 - c. Modificar las propiedades de la fase acuosa secundaria como su viscosidad para disminuir la migración del fármaco;
 - d. Obtener y caracterizar clorhexidina base desde la solución de sus sales asegurando que no presenta productos de degradación significativos y evaluar la posibilidad de incluirla en las nanopartículas poliméricas.
3. Adicionar excipientes a las nanopartículas poliméricas para proporcionarle características de mucoadhesión.
4. Realizar estudios en modelos animales para evaluar la efectividad de la forma farmacéutica obtenida en la disminución de los síntomas de enfermedades periodontales.



X. REFERENCIAS

1. Scheid, y Rickne, C. (2012). *Woelfel´s dental anatomy*. (8ª ed.). Lippincott Williams & Wilkins: China.
2. Palumbo, A. (2011). The Anatomy and Physiology of the Healthy Periodontium. En Fotinos, P. (Ed.) *Gingival Diseases - Their Aetiology, Prevention and Treatment* (pp 1-22). InTech: Rijek.
3. Wolf., H.F. y Hassell, T.M. (2006). *Color Atlas of Dental Hygiene: Periodontology*. Stufgart: Thieme Verlag.
4. Lindhe, J., Karring, T. y Araújo, M. (2008). The Anatomy of Periodontal Tissues. En Lindhe, J., Lang, P. y Karring, T. (Ed.), *Clinical Periodontology and Implant Dentistry* (Volume 1- Basic concepts) (5th ed.) (pp. 3-48). Oxford: Blackwell Munksgaard.
5. Romero, M.R. (2011). Diferencias histológicas en la encía de niños y adultos jóvenes con gingivitis inducida por biopelícula, *Universitas Odontológica*, 30 (65), 79-88.
6. Ferro, M.B. y Gómez, M. (2007). *Periodoncia. Fundamentos de la Odontología*. (2ª ed). Pontificia Universidad Javeriana: Bogotá.
7. Repka, M., Chen, L. y Chan, R. (2011). Buccal Drug Delivery. En Wilson (Ed.) y Crowley (Ed.), *Controlled Release in Oral Drug Delivery* (pp. 329-359). Springer: Missisipi.
8. Percival, S. (2009). *Microbiology and Aging: Clinical Manifestations*. Springer: Nueva York.
9. Botero, J.E., y Bedoya, E. (2010). Determinantes del Diagnóstico Periodontal. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*, 3 (2), 94-99.
10. Zamora, A.A., Guerrero, F., Torres, J.M. y de la Porrilla, L.M. (2009). Enfermedad periodontal. *Revista Nacional de Odontología México*. Recuperado en diciembre de 2014 de <http://goo.gl/3nWgik>
11. Hughes, F. (2015). Periodontum and Periodontal Disease. En Vishwakarma, A., *et al.* (Ed.), *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences* (pp. 433-444). Boston: Academic Press.
12. AlJehani, Y. (2014). Risk factors of periodontal disease: review of literature. *International Journal of Dentistry*, 2014, 1-9.
13. Ciancio, S. G. (1996). Medications as risk for periodontal disease, *Journal of Periodontology*, 67 (10), 1055-1059.
14. Highfield, J. (2009). Diagnosis and classification of periodontal disease, *Australian Dental Journal*, 54 (1), 11-26.
15. Jain, *et al.* (2008). Recents approaches for the treatment of periodontitis, *Drug Discovery Today*, 13 (21-22), 932-942.
16. Reddy, S. (2008). *Clinical Periodontology and Periodontics* (2ª ed). Nueva Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers.
17. Frías, J. (2014). Biofilm Control Strategies in Dental Health. En K. Rumbaugh (Ed.) e I. Ahmad (Ed.). *Antibiofilm Agents: From Diagnosis to Treatment and Prevention*. (pp. 291-326). Texas: Springer.
18. Petersen, P. y Ogawa, H. (2012). The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontology 2000*, 60, 15-39.
19. Hau, H. (2014). A mini-review on novel interperiodontal pocket drug delivery materials for the treatment of periodontal diseases. *Drug Delivery and Translational Research*, 4, 295-301.
20. Mejía, A.M., González, M. y Lomelí, G. (2014). Resultados del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales (SIVEPAB) 2013. Recuperado el 14 de septiembre de 2015 de <http://goo.gl/gvqnm2>
21. Leonardi, M. y Walsh, M. (2010). *Dental Hygiene: Theory and Practice*. (3ª ed.). Missouri: Sander Elsevier.
22. Vicentini, *et al.* (2013). Evaluatuon of the use of systemic antimicrobial agents by professionals for the treatment of periodontal diseases, *Brazilian Journal of Oral Sciences*, 12 (4), 285-291.



23. FDA. (2015). FDA's Strategy on Antimicrobial Resistance - Questions and Answers. Recuperado el 3 de agosto de 2015 de <http://goo.gl/TKFNj>
24. Lorenzo, P., et al. (2008). *Farmacología Básica y Clínica Velázquez*. (18ª ed.). Hong Kong: Médica Panamericana.
25. Slots, J. (2002). Selection of antimicrobial agents in periodontal therapy. *Journal of Periodontal Research*. 37, 389-398.
26. Ramu, C. y Padmanabhan, T.V. (2012). Indications of antibiotic prophylaxis in dental practice-a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2 (9), 749-754.
27. Dumitrescu, A.L. (2010). The use of chemical supragingival plaque control in periodontal therapy. En A.L. Dumitrescu (Ed.), *Antibiotics and Antiseptics in Periodontal Therapy*. (pp. 205-239). Berlín: Springer.
28. Bascones, A. y Morante, S. (2006). Antisépticos orales. Revisión de la literatura y perspectiva actual. *Avances en Periodontología e Implantología*. 18 (1), 31-59.
29. Rowe, R.C. (Ed.), Sheskey, P. J. (Ed.) Quinn, M.E. (Ed.). (2009). *Handbook of pharmaceutical excipients*. (6th ed.). Washington, D.C.: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association.
30. Baruch, et al. (2012). Eficacia de la clorhexidina en el tratamiento de gingivitis: tabletas o colutorio. *Revista médica de la Universidad Veracruzana*. Recuperado el 13 de septiembre de 2015 de <http://goo.gl/NwyazO>
31. Maya, J.J., et al. (2011). Papel de la clorhexidina en la prevención de las infecciones asociadas a la atención en salud. *Infectio*, 15 (2), 98-107.
32. Koburguer, T., et al. (2010). Standardized comparison of antiseptic efficacy of triclosán, PVP-iodine and chlorhexidine gluconate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65, 1712-1719.
33. Solmaz, G. y Korachi, M. (2012). Inhibition and Disruption Properties of Chlorhexidine Gluconate on Single and Multispecies Oral Biofilms. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 6 (1); 61-66.
34. Dodwad, V., Vaish, S., Mahajan, A y Chhokra, M. (2012). Local Drug Delivery in Periodontics: A Strategic Intervention. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4 (4), 30-34.
35. Mombelli, A. (2012). Antimicrobial Advances in Treating Periodontal Diseases. En Kinane (Ed.) y Mombelli (Ed.), *Periodontal Diseases*. (pp. 133-148). Suiza: Karger AG.
36. Tabary, N. (2014). A chlorhexidine-loaded biodegradable cellulosic device for periodontal pockets treatment. *Acta Biomaterialia*, 10, 318-329.
37. Ganem-Quintanar, A., 1997. Étude de la perméabilité de la muqueuse orale: evaluation de différentes approches pour augmenter le passage des principes actifs, Ph.D. thesis. Université de Genève/Université Claude Bernard, Lyon, Genève.
38. Piñón-Segundo, E., Mendoza-Muñoz, N. y Quintanar-Guerrero, D. (2013). Nanoparticles as dental drug-delivery systems. En Subramani (Ed.), Ahmed (Ed.) y Hartsfield (Ed.), *Nanobiomaterials in clinical dentistry*. Waltham: Elsevier.
39. Piñón-Segundo, E., Ganem-Quintanar, A., Alonso-Pérez, V. y Quintanar-Guerrero, D. (2004). Preparation and characterization of triclosan nanoparticles for periodontal treatment. *International Journal of Pharmaceutics*. 294; 217-232.
40. Quintanar-Guerrero, D., Allémann, H y Doelker, E. (1998). Preparation Techniques and Mechanisms of Formation of Biodegradable Nanoparticles from Performed Polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 24 (12), 1113-1128.
41. Fattal, Elias y Vauthier, Christine. (2006). Drug Delivery: Nanoparticles. En Swarbrick. J. (Ed.), *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. New York: Informa Healthcare.
42. Nagavarma, B.V.N., Hemant, Y., Ayaz, V. y Shivakumar, H.G. (2012). Different techniques for preparation of polymeric Nanoparticles-A review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5 (3), 16-23.



43. Devasier, B. y Sanghyo, K. (2014). Polymeric nanoparticles for smart drug delivery. En Demir, S. (Ed.), *Application of nanotechnology in drug delivery* (pp. 258-310). Lisboa; InTech.
44. García-Fuentes, M. y Alonso, M.J. (2012). Chitosan-based drug nanocarriers: Where do we stand?. *Journal of Controlled Release*, 161, 496-504.
45. Chakravarthi, S. y Robinson, D. (2007). Nanoparticles Prepared Using Natural and Synthetic Polymers. En Thassu (Ed.), Deleers (Ed.) y Pathak (Ed.), *Nanoparticulate Drug Delivery Systems* (pp. 51-60). Northwest Florida: Taylor & Francis.
46. Makadia, H.K. y Siegel, S.J. (2011). Poly Lactic-co-Glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers*, 3 (3), 1377-1397.
47. Kumari, A., Kumar, S. y Yadav, S.C. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75, 1-18.
48. Ann, M. y Werner, D. (2010). The return of a forgotten polymer-Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*, 35, 1217-1256.
49. Lal Pal, S., Jana, U., Manna, P.K., Mohanta, G.P. y Manavalan, R. (2011). Nanoparticles: An overview of preparation and characterization. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1 (6), 228-234.
50. Pattnaik, S., Swain, K., Venkateshwar, J. y Kumar, S. (2012). Pharmaceutical Nanoencapsulation Strategies: A Mechanistic Review. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 2 (1); 280-284.
51. García, N. (2011). *Desarrollo de un sistema nanoparticulado de aplicación vaginal*. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en la base de datos de TESIUNAM: Búsqueda de texto completo.
52. Prasad, J y Geckeler, K.E. (2011). Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*, 36, 887-913.
53. Vauthier, C. y Kawthar, B. (2011). Processing and Scale-up of Polymeric Nanoparticles. En Prokop, A. (Ed.), *Intracellular Delivery: Fundamentals and Applications* (pp. 433-456). Massachusetts: Springer Science+Business Media.
54. Sosnik, A. y Seremeta, K.P. (2015). Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers, *Advances in Colloid and Interface Science*, xxx, 1-15.
55. Rocha, F., et al. (2009). Nanosistemas a base de poliésteres. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*, pp. 41-101.
56. Honary, S. y Zahir, F. (2013). Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems-A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12 (2); 255-264.
57. Kharia, A.A., Singhai, A.K. y Verma, R. (2012). Formulation and evaluation of polymeric nanoparticles of an antiviral drug for gastroretention. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, 4 (4), 1557-1562.
58. Galindo-Rodríguez, S., Alléman, E., Fessi, H y Doelker, E. (2004). Physicochemical Parameters Associated with Nanoparticle Formation in the Salting-out, Emulsification-Diffusion, and Nanoprecipitation Methods, *Pharmaceutical Research*, 21 (8): 1428-1439.
59. Azevedo, V. y Ricci-Junior, E. (2011). Encapsulation of naproxen in nanostructured system: structural characterization and in vitro release studies. *Química Nova*, 34 (6), 933-939.
60. D´Souza, S. (2014). A review of *In vitro* drug release test methods for nano-sized forms. *Advances in Pharmaceutics*, 2014, 1-12.
61. Secretaría de Salud: Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. (2009). *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. (9^a ed). México: Secretaría de Salud: Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.
62. Saraswathi, K. y Sai, P. (2015). Oral Bio Dissolving Films in Dentistry: A New Perspective in Treatment Modality, *IJSS Case Reports & Reviews*, 1 (10): 70-74.



63. Prasanna, P., *et al.* (2013). Mouth Dissolving Films: Innovative Vehicle for Oral Drug Delivery, *International Journal of Pharmaceutical Research & Review*, 2 (10); 41-47.
64. Bala, R., Pawar, P., Khanna, S. y Arora, S. (2013). Orally dissolving strips: A new approach to oral drug delivery system, *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 3 (2), 67-76.
65. Bhupinder, B., Jangra, S., Kaur, M. y Singh, H. (2011). Orally Fast Dissolving Films: Innovations in Formulation and Technology. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 9 (2); 50-57.
66. Irfan, M., *et al.* (2015). Orally disintegrating films: A modern expansion in drug delivery system. *Saudi Pharmaceutical Journal*. Recuperado el 13 de septiembre de 2015 de <http://goo.gl/r3TVZe>
67. Morales, J.O. y McConville, J.T. (2011). Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 77, 187-199.
68. Panda, B.P., Dey, N.S. y Rao, M.E.B. (2012). Development of Innovative Orally Fast Disintegrating Film Dosage Forms: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, 5 (2); 1666-1674.
69. Másquio, F.A., Correa, M.A. y Nunes, H.R. (2010). Analytical methods for the determination of chlorhexidine: A review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 40, 89-101.
70. Moffat, A., *et al.* (Ed). (2011). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. (4^a ed, Vol. 2). Londres: Pharmaceutical Press.
71. Juliano, C. *et al.* (2008). Preparation, *In Vitro* Characterization and Preliminary *In Vivo* Evaluation of Buccal Films Containing Chlorhexidine, *AAPS PharmSciTech*, 9 (4), 1153-1158.
72. Duffó, G.S. y Quezada, C. (2004). Development of an Artificial Saliva Solution for Studying the Corrosion Behavior of Dental Alloys, *Corrosion*, 60 (6), 594-602.
73. Aguilar, G., *et al.* (1992). Validación de métodos analíticos. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, SSA. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, AC.
74. Nicolay, A., *et al.* (2011). Rapid HPLC Method for Determination of Parachloroaniline in Chlorhexidine Antiseptic Agent in Mouthrinses, Ophthalmic and Skin Solution, *American Journal of Analytical Chemistry*, 2, 422-428.
75. Curtis, J., *et al.* (2012). Effect of Formulation Conditions on Hypromellose Performance Properties in Films Used for Capsules and Tablet Coatings, *AAPS PharmSciTech*, 13 (4): 1170-1178.
76. Sakhare, A. (2012). Effect of Glycerin as Plasticizer in Orodissolving Films of Losartan Potassium, *International Journal of Science and Research*, 3 (8), 772-778.
77. Semalty, M., Semalty, A. y Kumar, G. (2008). Formulation and characterization of mucoadhesive buccal films of glipizide, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 70, 43-48.
78. Gordon, S. (2015). Gels as Vaccine Delivery Systems. En Foged, C., Rades, T., Perrie, Y, y Hook, S. (Ed.). *Subunit Vaccine Delivery* (pp. 203-221). Nueva York: Springer.
79. Perumal, V.A., Lutchman, D., Mackraj, I. y Govender, T. (2008). Formulation of monolayered films with drug and polymers of opposing solubilities, *International Journal of Pharmaceutics*, 358, 184-191.
80. Perioli, L., *et al.* (2004). Development of mucoadhesive patches for buccal administration of ibuprofen, *Journal of Controlled Release*, 99 (2004) 73-82.
81. Alanazi, F.K., Abdel, A.A., Mahorus, G.M. y Alsarra, I.A. (2007). Formulation and physicochemical characterization of buccoadhesive films containing ketorolac. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 17 (1); 1-10.
82. Minako, N., *et al.* (2012). Development of fast dissolving oral film containing dexamethasone as an antiemetic medication: Clinical usefulness. *International Journal of Pharmaceutics*, 424, 12-17.



83. Shen, B., *et al.* (2013). Development and characterization of an orodispersible films containing drug nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85, 1348-1356.
84. Torres, M., Díaz, M. y Acosta, A. (2009). La clorhexidina, bases estructurales y aplicaciones en la estomatología. *Gaceta Médica Espirituana*, 11 (1), 1-8.
85. Jones, E., *et al.* (2013). Monolayered multipolymeric buccal films with drug and polymers of opposing solubilities for ARV therapy: Physico-mechanical evaluation and molecular mechanics modelling. *International Journal of Pharmaceutics*, 455, 197-212.
86. Murata, Y., Isobe, T., Kofuji, K., Nishida, N., Kamaguchi, R. (2010). Preparation of fast dissolving films for oral dosage from natural polysaccharides. *Materials*, 3, 4291-4299.
87. Preis, M., Dorothee, G., Grytzan, D. y Breitreutz, J. (2014). Comparative study on novel test systems to determine disintegration time of orodispersible films, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 66, 1102-1111.
88. Silvano, M.C. (2008). Aggregation and gelation in hydroxypropylmethyl cellulose aqueous solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 327, 333-340.
89. Rajesh, K., Prasanna, R. y Nagaraju, R. (2014). Design and Characterization of Fast Dissolving Films of Valsartan, *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11 (12), 175-184.
90. Anroop, B., *et al.* (2013). *In vitro* techniques to evaluate buccal films, *Journal of Controlled Release*, 166, 10-21.
91. Yodkhum, K. y Phaechamund, T. (2010). Modified Starch as Gel Base of Chlorhexidine Gluconate for Periodontitis Treatment, *Journal of Metals, Materials and Minerals*, 20 (3), 151-157.
92. Patel, R.S., Poddar, S.S. (2009). Development and characterization of mucoadhesive buccal patches of salbutamol sulphate. *Current Drug Delivery*, 6 (1), 140-146.
93. Buchi, N., *et al.* (2013). Development and evaluation of mouth dissolving films of salbutamol sulfate, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5 (3), 53-60.
94. Chaudary, H., Gauri, S., Tahnee, P y Kumar, V. (2013). Development and optimization of fast dissolving oro-dispersible films of granisetron HCl using Box-Behnken statistical design. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 51, 193-201.
95. Becerril, M. (2013). *Desarrollo de los manuales de prácticas de laboratorio para las asignaturas de Tecnología de formas cosméticas I y de Tecnología de formas cosméticas II para la Licenciatura en Farmacia.* (Tesis inédita de licenciatura) Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en la base de datos de TESIUNAM: Búsqueda de texto completo.
96. Zuñiga, R., *et al.* (2013). Optical properties of emulsion-based hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) films: effect of their microstructure. En: Inside Food Symposium, 9-12. Leuven, Bélgica, 9-12 abril.
97. Cabrero, D. y Martínez, M. (2011). *Desarrollo de guías de limpieza, uso y calibración de calorímetro diferencial de barrido y analizador termogravimétrico con aplicaciones farmacéuticas.* (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en: <http://tesis.unam.mx/F>
98. Auda, S., El-Badry, M. y Ibrahim, M. (2014). Design, formulation and characterization of fast dissolving films containing dextrometorfan, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 9 (1): 133-141.
99. Hielscher, T. (2007). Ultrasonic Production of Nano-Size Dispersions and Emulsions. Recuperado el 25 de agosto de 2015 de <http://arxiv.org/abs/0708.1831>
100. Wu, T.Y., *et al.* (2011). *Advances in Ultrasound Technology for Environmental Remediation.* Londres: Springer.



101. NanoComposix. (2012). Nanocomposix's Guide to Dynamic Light Scattering Measurement and Analysis. Recuperado el 10 de octubre de 2015 de <https://goo.gl/AbhQiS>
102. Fuminori, I., et al. (2011). Technique to encapsulate a low molecular weight hydrophilic drug in biodegradable polymer particles in a liquid-liquid system. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 384, 368-373.
103. Martínez, U.R., Reyes, F.R., Quintanar-Guerrero, D., Ganem, F.A. y Piñón-Segundo, E. (2014). Modificación del método de emulsificación-difusión para obtener nanopartículas biodegradables con potencial uso vaginal. En: XIX Reunión Nacional de Estudiantes de Farmacia, Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, AC, México-D.F., 1, 2 y 3 de octubre de 2014.
104. Piñón-Segundo, E. (2008). Diseño, elaboración y caracterización de vectores farmacéuticos a partir de nanopartículas poliméricas y sonogeles de SiO₂. (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en: Disponible en la base de datos de TESIUNAM: Búsqueda de texto completo.
105. Dave, R., Patel, R., Patel, J. y Chauhan, H. (2012). Effect of cryoprotectant on lyophilisation of doxorubicin-HCl loaded chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*, 3 (6), 1769-1772.
106. Barresi, A., Vanni, M., Fissore, D. y Zelenkova, T. (2015). Synthesis and Preservation of Polymer Nanoparticles for Pharmaceutical Applications. En Kumar, V. (Ed.) y Kumari, M. (Ed.), *Handbook of Polymers for Pharmaceutical Technologies, Processing and Applications* (229-272). Scrivener Publishing Wiley: New Jersey.
107. Reyes, O. y Rivera M. (2015). *Preparación y caracterización de nanopartículas poliméricas de clotrimazol por el método de desplazamiento del solvente para aplicación vaginal*. (Tesis inédita de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en la base de datos de TESIUNAM: Búsqueda de texto completo.
108. Cohen-Sela, E., et al. (2009). A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 133, 90-95.
109. Hoffart, V., et al. (2002). Low Molecular Weight Heparin-Loaded Polymeric Nanoparticles: Formulation, Characterization and Release Characteristics. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28 (9), 1091-1099.
110. Yue, I.C., et al. (2004). A novel polymeric chlorhexidine delivery device for the treatment of periodontal disease. *Biomaterials*, 25(17), 374-350.
111. Peltonen, L., et al. (2004). Improved Entrapment Efficiency of Hydrophilic Drug Substance During Nanoprecipitation of Poly(l)actide Nanoparticles, *AAPS PharmSciTech*, 5 (1), 1-6.
112. Santino, R. (2013). *Desarrollo y caracterización de nanopartículas poliméricas cargadas con un fármaco hidrofílico modelo (ácido glicirricínico) por los métodos de desplazamiento de solvente y doble emulsión*. (Tesis de licenciatura). Disponible en la base de datos de TESIUNAM: Búsqueda de texto completo.
113. Sanchez, L., Bou, R. y Bosch, J. (2013). Agency reviews patent application approval request for di(4-chloro-phenyldiguanido) derivate which is free of potential genotoxicity and process for reducing the residual amount of p-chloro. En Ashton (Ed.), *Biguanides-Advances in research and application*. Atlanta: ScholarlyBrief.
114. Lboutounne, H., et al. (2002). Sustained ex vivo skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly (ϵ -caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a digluconate. *Journal of Controlled Release*, 82, 319-334.
115. Goncalves, C., et al. (2011). Preparation and evaluation of antimicrobial activity of nanosystems for the control of oral pathogens *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 2581-2590.
116. Attia, G. y Abd El-kader, M.F.H. (2013). Structural, optical and thermal characterization of PVA/2HEC Polyblend Films. *International Journal of Electrochemistry Sciences*, 8, 5672-5687.



117. Zheng, P. y Ling, X. (2007). A thermal degradation mechanism of polyvinyl alcohol/silica nanocomposites. *Polymer Degradation and Stability*, 92, 1061-1071.
118. De Kessel, C., Lefèvre, C., Nagy, J.B. y David, C. (1999). Blends of polycaprolactone with polyvinylalcohol: a DSC, optical microscopy and solid state NMR study. *Polymer*, 40, 1969-1978.
119. Piñón-Segundo, E. (2003). *Desarrollo tecnológico y caracterización de partículas submicrónicas poliméricas como vectores terapéuticos para el tratamiento de enfermedades periodontales*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en la base de datos de TESIUNAM: Búsqueda de texto completo.
120. Xuemei, M. (2010). Dissolution testing: *in vitro* characterization of oral controlled release dosage forms. En H. Wen (Ed.), K. Park (Ed.), *Oral controlled release formulation design and drug delivery* (pp. 245-257). New Jersey: Wiley.
121. Llabot, J.M., Palma, S.D. y Allemandi, D.A. (2008). *Nanopartículas poliméricas sólidas*. *Farmacotecnia*, 53, 40-47.
122. Hua, X., et al. (2014). Externally Controlled Triggered-Release of Drug form PLGA Micro and Nanoparticles. *PLOS ONE*, 9(12): 1-17.
123. Suvakanta, D., et al. (2010). Kinetic Modelling on Drug Release from Controlled Drug Delivery Systems, *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, 67(3): 217-233.
124. Viseras, M.T. (2008). *Desarrollo galénico de preparados obtenidos por interacción del ácido 5-amino salicílico con Halloysita*. (Tesis inédita de doctorado). Recuperado el 17 de octubre de 2015 de <http://goo.gl/ujexET>
125. Freire, R.M., Longhinotti, E., Sousa, E.H.S. y Fehire, P.B.A. (2014). Inorganic Nanoparticles Materials for Controlled Drug Delivery Systems. En Tiwari, A. (Ed.) y Tiwari, A. (Ed.), *Bioengineered Nanomaterials* (327-349). Boca Raton: CRC Press.
126. Kumar, A. y Sawant, K. (2013). Encapsulation of exemestane in polycaprolactone nanoparticles: optimization, characterization and release kinetics. *Cancer Nanotechnology*, 4, 57-71.
127. Lokhande, A., Mishra, S., Kulkarni, R. y Naik, J. (2013). Formulation and evaluation of glipizide loaded nanoparticles. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5 (4), 147-151.
128. Ferrari, R., et al. (2013). Synthesis of surfactant free PCL-PEG brushed nanoparticles with tunable degradation kinetics. *International Journal of Pharmaceutics*, 453, 551-559.
129. Kreuter, J. (1994). Nanoparticles. En Kreuter, J (Ed.), *Colloidal Drug Delivery System Vol 66s* (pp. 219-315). New York: Marcel Dekker.
130. Jai, G.E. (2015). *A Laboratory Curse in Nanoscience and Nanotechnology*. Boca Raton: CRC Press.
131. Shen, C., et al. (2014). Formulation and optimization of a novel oral fast dissolving film containing drug nanoparticles by Box-Behnken design-response surface methodology. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 40 (5), 649-656.
132. Shen, B., et al. (2013). Development and characterization of an orodispersible films containing drug nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85, 1348-1356.
133. Mazzarino, L., Borsali, R. y Lemos-Senna. (2014). Mucoadhesive films containing chitosan-coated nanoparticles: a new strategy for buccal curcumin release. *Pharmaceutical Nanotechnology*, 103, 3764-3771.
134. Tiwari, S. y Rjabi-Siahboomi, A.R. (2008). Extended release: Improving formulation of HPMC matrices. Colorcon, Inc. Recuperado el 10 de octubre de 2015 de <https://goo.gl/ctnwFt>
135. Ganesh, S., Radhakrishnan, M., Ravi, M y Kalyani, J. (2008). *In vitro* evaluation of the effect of combination of hydrophilic and hydrophobic polymers on controlled release zidovudine matrix tablets. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 70 (4); 461-465.



136. U.S. National Institutes of Health (2004). *The efficacy of chlorhexidine gluconate chip (PerioChip®) in therapy of peri-implantitis*. Recuperado el 10 de octubre de 2015 de <https://goo.gl/qWHC2d>
137. FDA-Drug Approval Package-Arestin (Minocycline Hydrochloride) Microspheres. Recuperado el 10 de octubre de 2015 de <http://goo.gl/rVncCp>
138. ActiSite®.RxList. (2015). Recuperado el 15 de octubre de 2015 de <http://goo.gl/svp7jY>
139. Chlorhexidine gluconate data sheet. (s.f.). Recuperado el 10 de octubre de 2015 de <http://goo.gl/hH7RPs>



XI. ANEXOS

Anexo A. Sistema analítico para cuantificar gluconato de clorhexidina y sistema analítico para cuantificar alcohol polivinílico.

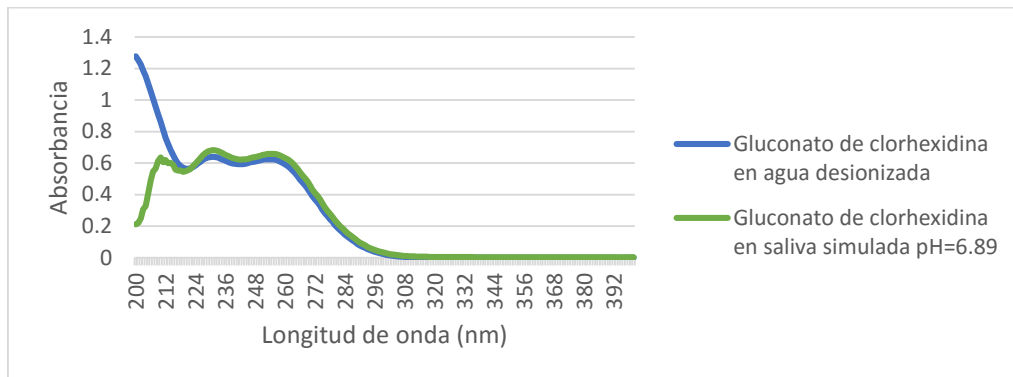


Gráfico 39. Espectro de absorción de gluconato de clorhexidina en agua desionizada y en saliva simulada pH=6.89 (20 µg/mL)

Tabla 55. Coeficientes de absorptividad de gluconato de clorhexidina en agua desionizada y en saliva simulada pH=6.89 a 231 y 254 nm.

Longitud de onda (nm)	Coefficiente de absorptividad específico en agua (mL/µg*cm)	Coefficiente de absorptividad específico en saliva simulada (mL/µg*cm)
231	0.032	0.0341
254	0.0312	0.0329

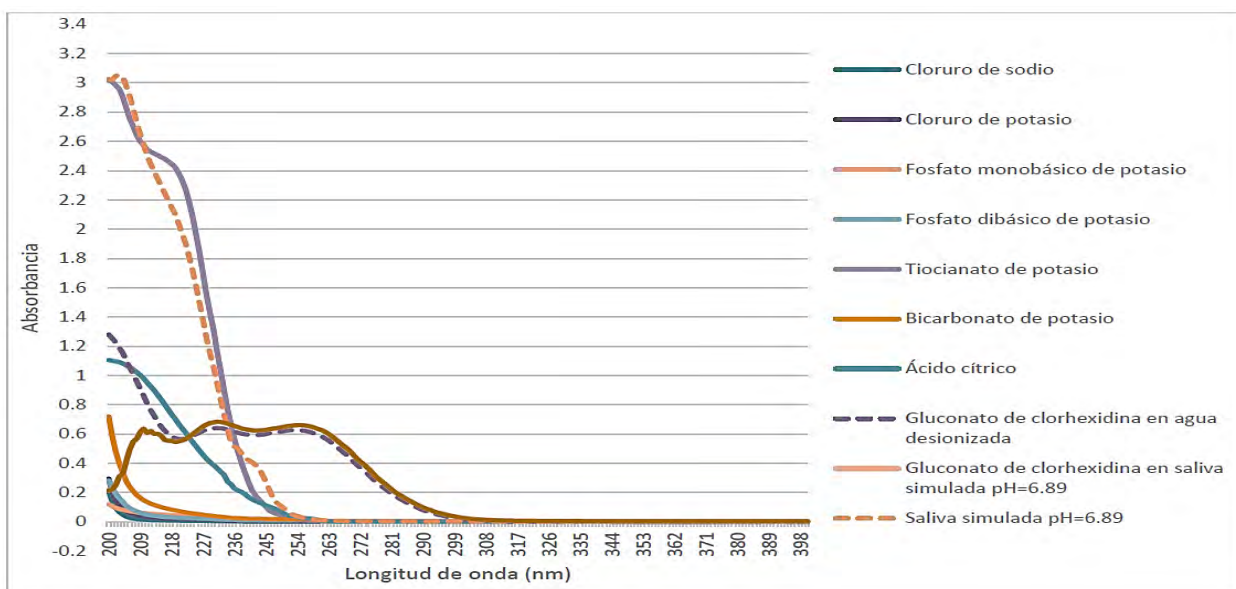


Gráfico 40. Comparación de los espectros de absorción de gluconato de clorhexidina, saliva simulada y cada componente de la saliva simulada.



Tabla 56. Coeficientes de absorptividad e gluconato de clorhexidina en agua desionizada y saliva simulada a 263 nm.

Longitud de onda (nm)	Coefficiente de absorptividad específico en agua (mL/ μ g*cm)	Coefficiente de absorptividad específico en saliva simulada (mL/ μ g*cm)
263	0.0277	0.0306

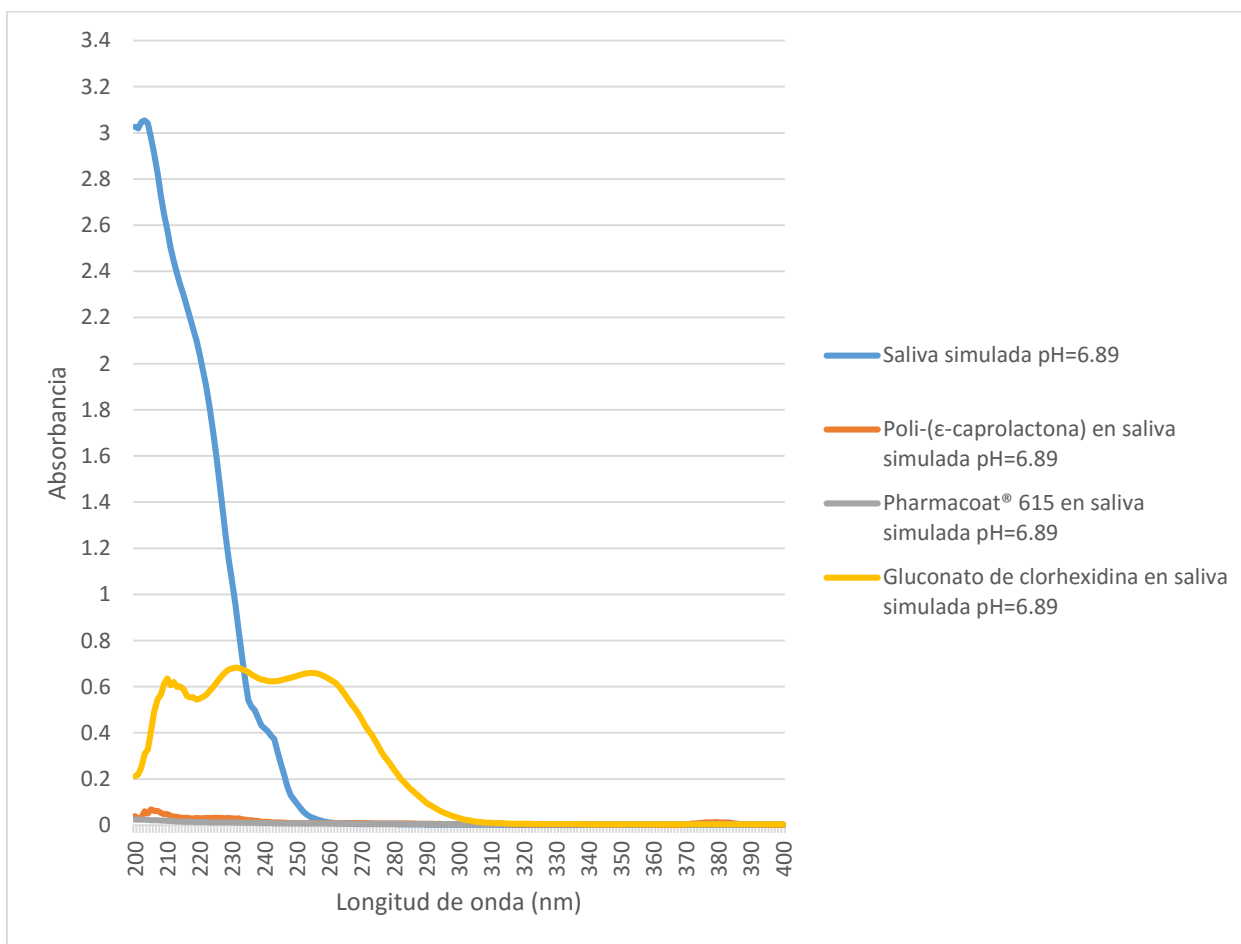


Gráfico 41. Comparación del espectro de absorción de gluconato de clorhexidina con excipientes y saliva simulada.



Linealidad del sistema

Tabla 57. Curva de calibración de gluconato de clorhexidina en saliva simulada pH=6.89 ($\lambda=263$ nm).

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia	Absorbancia/Concentración
7.9413	0.248	0.0312
7.9413	0.242	0.0304
7.9413	0.239	0.0300
15.8826	0.47	0.0295
15.8826	0.488	0.0307
15.8826	0.473	0.0297
23.8239	0.724	0.0303
23.8239	0.726	0.0304
23.8239	0.726	0.0304
31.7653	0.962	0.0302
31.7653	0.956	0.0300
31.7653	0.975	0.0306
39.7066	1.203	0.0302
39.7066	1.207	0.0303
39.7066	1.218	0.0306
47.7066	1.44	0.0301
47.7066	1.441	0.0302
47.7066	1.448	0.0303
55.5891	1.67	0.0300
55.5891	1.704	0.0306
55.5891	1.706	0.0306
	PROMEDIO	0.03037
	DESVEST	0.0003
	CV	1.1785

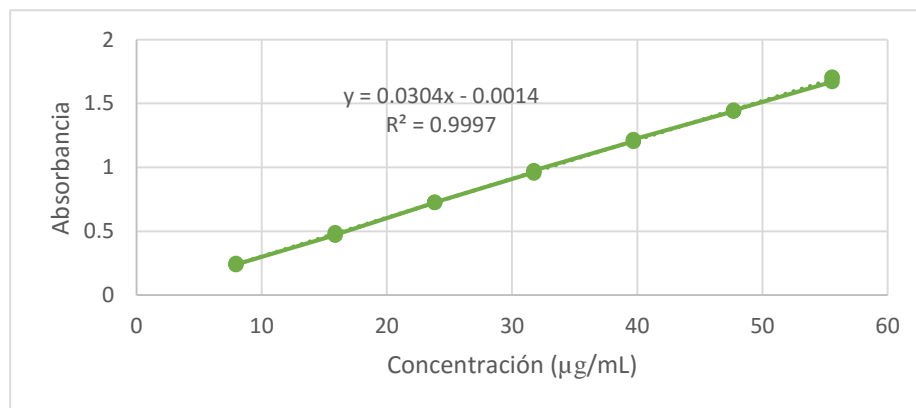


Gráfico 42. Curva de calibración de gluconato de clorhexidina en saliva simulada pH=6.89.



Tabla 58. Parámetros de la regresión de gluconato de clorhexidina.

Parámetro	Valor	
Coefficiente de correlación (r)	0.9998	
Coefficiente de determinación (r ²)	0.9997	
Pendiente (b ₁)	0.0304	
Intervalo de confianza de la pendiente (ICB ₁)	LS	0.0306
	LI	0.0301
Ordenada al origen (b ₀)	0.0024	

Tabla 59. Análisis de varianza de un factor para evaluar la linealidad del sistema de gluconato de clorhexidina.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	6.0939E-07	6	1.0156E-07	0.72799968	0.63482588	2.847726
Dentro de los grupos	1.9532E-06	14	1.3951E-07			
Total	2.5626E-06	20				

Se llevó a cabo el siguiente planteamiento de hipótesis:

H₀=Existe una relación lineal entre la concentración de gluconato de clorhexidina y su absorbancia.

H_a=No existe una relación lineal entre la concentración de gluconato de clorhexidina y su absorbancia.

Si $f_{cal} < f_c$ No se rechaza la H₀

Si $f_{cal} \geq f_c$ Se rechaza la H₀

$$F_{cal} = 0.7279 \cdot F_{crítica} = 2.8477$$

Como F calculada es menor que F_{crítica} no se rechaza la H₀ y se acepta que existe una relación lineal entre la concentración de gluconato de clorhexidina y su absorbancia.

Tabla 60. Prueba del intercepto para curva de calibración de gluconato de clorhexidina.

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	-0.00140454	0.00462417	-0.303739	0.7646
Pendiente	0.0304168	0.000130163	233.682	0.0000



Planteamiento de hipótesis

H_0 =El intercepto en la relación lineal entre la concentración de gluconato de clorhexidina y su absorbancia es igual a 0.

H_a =El intercepto en la relación lineal entre la concentración de gluconato de clorhexidina y su absorbancia no es igual a 0.

Si $P \leq 0.05$ entonces se rechaza H_0

Si $P > 0.05$ entonces no se rechaza H_0

Como $p > 0.05$ entonces no se rechaza la H_0 y se dice que el intercepto es igual a cero.

Límites de detección y cuantificación (con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión).

Tabla 61. Tres niveles de concentración por triplicado ($\lambda=263 \text{ nm}$) para gluconato de clorhexidina

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia	Absorbancia/Concentración
7.914	0.238	0.0300
7.914	0.246	0.0310
7.914	0.242	0.0305
31.656	0.971	0.0306
31.656	0.953	0.0301
31.656	0.97	0.0306
55.938	1.701	0.0304
55.938	1.693	0.0302
55.938	1.705	0.0304
	PROMEDIO	0.0304
	DESVEST	0.000315
	CV	1.034641

Tabla 62. Parámetros de la regresión

Parámetro	Valor	
Coefficiente de correlación (r)	0.9999	
Coefficiente de determinación (r^2)	0.9999	
Pendiente (b_1)	0.0303	
Intervalo de confianza de la pendiente (ICB_1)	LS	0.0306
	LI	0.0300
Ordenada al origen (b_0)	-0.0014	
Desviación estándar de A/C ($S_{y/x}$)	0.0065	



Fórmulas:

Límite de detección

$$LD=(3.3 \times S_{y/x})/b_1$$

Límite de cuantificación

$$LC=(10 \times S_{y/x})/b_1$$

Tabla 63. Límite de cuantificación y detección para gluconato de clorhexidina.

Límite	Valor (µg/mL)
Detección	0.7114
Cuantificación	2.1560

Tabla 64. Precisión del sistema para gluconato de clorhexidina

Solución	A263
1	0.962
2	0.969
3	0.96
4	0.957
5	0.961
6	0.967
PROMEDIO	0.9626
DESVEST	0.0045
CV	0.4676

Tabla 65. Repetibilidad del sistema analítico para gluconato de clorhexidina

Parámetro	Día 1	Día 2
Coficiente de determinación (r ²)	0.9997	0.9999
CV _{y/x}	1.1785 %	1.0346 %

Tabla 66. Exactitud del sistema analítico para gluconato de clorhexidina.

Concentración corregida día 1	Concentración corregida día 2	Recobro (%)
8.111	7.782	95.944
7.914	8.046	101.66
7.815	7.914	101.26
31.59	31.89	100.93
31.40	31.30	99.685



Tabla 66. Exactitud del sistema analítico para gluconato de clorhexidina (continuación).

Concentración corregida día 1	Concentración corregida día 2	Recobro (%)
32.02	31.86	99.486
54.88	55.90	101.85
56.00	55.64	99.353
56.07	56.03	99.941
	PROMEDIO	100.01
	DESVEST	1.7997
	CV	1.7995

Sistema analítico para cuantificar alcohol polivinílico

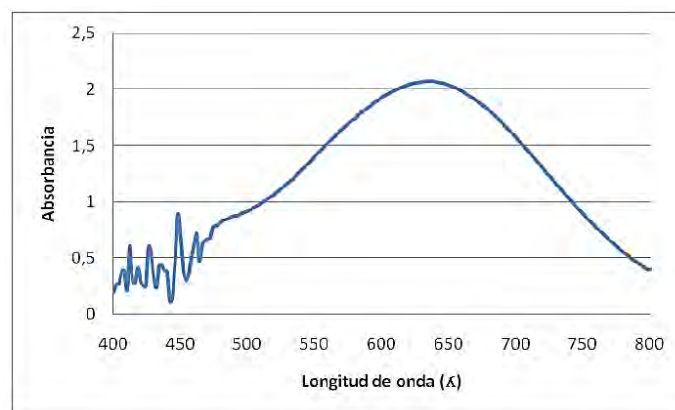


Gráfico 43. Espectro de absorción de alcohol polivinílico en agua desionizada (Tomado de García, 2011).

Tabla 67. Curva de calibración de alcohol polivinílico en agua desionizada ($\lambda=640$ nm).

Concentración (mg/mL)	Absorbancia	Absorbancia/Concentración
0.02526	0.208	8.2343
0.02526	0.214	8.4718
0.02526	0.209	8.2739
0.05052	0.413	8.1749
0.05052	0.417	8.2541
0.05052	0.416	8.2343
0.07578	0.627	8.2739
0.07578	0.629	8.3003
0.07578	0.619	8.1683
0.10105	0.846	8.3720
0.10105	0.85	8.4116

Tabla 67. Curva de calibración de alcohol polivinílico en agua desionizada ($\lambda=640$ nm) (continuación).

Concentración (mg/mL)	Absorbancia	Absorbancia/Concentración
0.10105	0.843	8.3424
0.12631	1.052	8.3287
0.12631	1.058	8.3762
0.12631	1.062	8.4078
0.15157	1.241	8.1876
0.15157	1.238	8.1678
0.15157	1.243	8.2008
0.1768	1.504	8.5067
0.1768	1.512	8.5520
0.1768	1.504	8.5067
	PROMEDIO	8.3212
	DESVEST	0.1207
	CV	1.4514

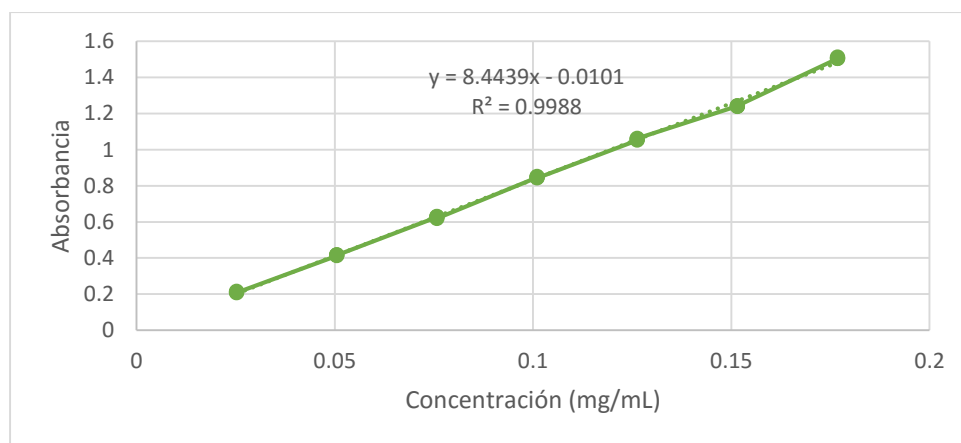


Gráfico 44. Curva de calibración de alcohol polivinílico en agua desionizada.

Tabla 68. Parámetros de la curva de calibración para alcohol polivinílico.

Parámetro	Valor
Coeficiente de correlación (r)	0.9993
Coeficiente de determinación (r^2)	0.9988
Pendiente (b_1)	8.4439
Intervalo de confianza de la pendiente (ICB_1)	LS 8.5864
	LI 8.3014
Ordenada al origen (b_0)	-0.01009



Tabla 69. Análisis de varianza para curva de calibración de alcohol polivinílico.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.23871368	6	0.03978561	10.5005792	0.00016725	2.847726
Dentro de los grupos	0.05304456	14	0.0037889			
Total	0.29175823	20				

Se llevó a cabo el siguiente planteamiento de hipótesis:

H_0 =Existe una relación lineal entre la concentración de alcohol polivinílico y su absorbancia.

H_a =No existe una relación lineal entre la concentración de alcohol polivinílico y su absorbancia.

Si $f_{cal} < f_c$ No se rechaza la H_0

Si $f_{cal} \geq f_c$ Se rechaza la H_0

$$F_{cal} = 10.5005 \cdot F_{crítica} = 2.8477$$

Como F calculada es mayor que $F_{crítica}$ se rechaza la H_0 y se acepta que no existe una relación lineal entre la concentración de alcohol polivinílico y su absorbancia.

Tabla 70. Prueba del intercepto para curva de calibración de alcohol polivinílico.

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	-0.0100918	0.00769249	-1.3119	0.2052
Pendiente	8.44393	0.0680953	124.002	0.0000

Planteamiento de hipótesis

H_0 =El intercepto en la relación lineal entre la concentración de alcohol polivinílico y su absorbancia es igual a 0.

H_a =El intercepto en la relación lineal entre la concentración de alcohol polivinílico su absorbancia no es igual a 0.

Si $P \leq 0.05$ entonces se rechaza H_0

Si $P > 0.05$ entonces no se rechaza H_0



Como $p > 0.05$ entonces no se rechaza la H_0 y se dice que el intercepto es igual a cero.

Límites de detección y cuantificación

Fórmulas:

Límite de detección

$$LD = (3.3 \times S_{y/x}) / b_1$$

Límite de cuantificación

$$LC = (10 \times S_{y/x}) / b_1$$

Tabla 71. Límites de detección y cuantificación par alcohol polivinílico.

Límite	Valor ($\mu\text{g/mL}$)
Detección	0.0061
Cuantificación	0.0186

ANEXO B. Determinación de las condiciones de proceso para laminillas orodispersables.

Evaluaciones a laminillas orodispersables

Tabla 72. Evaluación del lote 1-3 % p/v-Secado en estufa

Laminilla	Masa (mg)	mgCHX/laminilla	mgCHX/cm ²	%CHX/laminilla	Tiempo de desintegración (s)	pH	Evaluación en colorímetro		
							L*	a*	b*
1	79.4	3.63733553	0.72746711	105.028168	34	7.27	12.16	12.01	12.39
2	79	3.46052632	0.69210526	99.9227973	27	7.29	-0.02	-0.08	-0.01
3	74.5	3.69901316	0.73980263	106.809112	31	7.31	-0.37	-0.37	-0.32
4	79.8	3.20148026	0.64029605	92.442835	28	7.19			
5	84.7	3.25493421	0.65098684	93.9863193	35	7.21			
6	89.5	3.33305921	0.66661184	96.2421809	27	7.21			
7	85.6	3.40296053	0.68059211	98.2605835					
8	91.6	3.16447368	0.63289474	91.374269					
9	88	3.32483553	0.66496711	96.0047218					
10	96.5	3.37417763	0.67483553	97.4294765					
PROMEDIO	84.86	3.38527961	0.67705592	97.7500464	30.3333333	7.24666667			
DESVEST	6.74918925	0.17447276	0.03489455	5.03790599	3.55902608	0.04966555			
CV	7.95332224	5.15386558	5.15386558	5.15386558	11.733053	0.68535715			



Tabla 73. Evaluación del lote 2-4 % p/v-Secado en estufa

Laminilla	Masa (mg)	mgCHX/laminilla	mgCHX/cm ²	%CHX/laminilla	Tiempo de desintegración (s)	pH	Evaluación en colorímetro		
							L*	a*	b*
1	96.3	3.14391447	0.62878289	90.7806212	47	7.42	8.27	7.84	9.48
2	87.8	3.29194079	0.65838816	95.0548854	48	7.45	0.1	0.16	0.24
3	94.2	3.78536184	0.75707237	109.302432	50	7.47	0.16	-0.13	0.73
4	95	3.28782895	0.65756579	94.9361558	52	7.42			
5	87.4	3.29605263	0.65921053	95.1736149	47	7.61			
6	86.4	3.62088816	0.72417763	104.55325	46	7.51			
7	101.9	3.47697368	0.69539474	100.397716					
8	96.1	3.37417763	0.67483553	97.4294765					
9	89.7	3.27960526	0.65592105	94.6986967					
10	90.7	3.49342105	0.69868421	100.872634					
PROMEDIO	92.55	3.40501645	0.68100329	98.3199482	48.3333333	7.48			
DESVEST	4.95832633	0.19075924	0.03815185	5.50817865	2.25092574	0.07211103			
CV	5.35745687	5.60230019	5.60230019	5.60230019	4.65708773	0.96405114			

Tabla 74. Evaluación del lote 3-5 % p/v-Secado en estufa

Laminilla	Masa (mg)	mgCHX/laminilla	mgCHX/cm ²	%CHX/laminilla	Tiempo de desintegración (s)	pH	Evaluación en colorímetro		
							L*	a*	b*
1	96.1	3.30838816	0.66167763	95.5298036	52	7.27	9.06	10.01	10.6
2	99.5	3.61266447	0.72253289	104.315791	59	7.29	-0.08	-0.22	-0.19
3	109.5	3.35773026	0.67154605	96.9545583	73	7.31	-0.48	-0.26	-0.48
4	96.2	3.29194079	0.65838816	95.0548854	78	7.19			
5	103.7	3.50575658	0.70115132	101.228822	69	7.21			
6	96.2	3.33717105	0.66743421	96.3609105	75	7.21			
7	102.8	3.60855263	0.72171053	104.197061					
8	106.2	3.25904605	0.65180921	94.1050489					
9	101.1	3.51809211	0.70361842	101.585011					
10	104.6	3.62088816	0.72417763	104.55325					
PROMEDIO	101.59	3.44202303	0.68840461	99.3885143	67.6666667	7.24666667			
DESVEST	4.61457835	0.14554669	0.02910934	4.20266491	10.1126983	0.04966555			
CV	4.54235491	4.22852172	4.22852172	4.22852172	14.9448743	0.68535715			



Tabla 75. Evaluación del lote 4-3 % p/v-Secado en desecador

Laminilla	Masa (mg)	mgCHX/laminilla	mgCHX/cm ²	%CHX/laminilla	Tiempo de desintegración (s)	pH	Evaluación en colorímetro		
							L*	a*	b*
1	128.7	3.67023026	0.73404605	105.978005	7.45	26	10.49	10.18	12.63
2	112.4	3.06167763	0.61233553	88.40603	7.47	35	-0.08	-0.07	-0.07
3	167.8	3.12746711	0.62549342	90.305703	7.49	31	-0.14	-0.18	-0.08
4	120.3	3.30427632	0.66085526	95.411074	7.38	28			
5	121.5	3.60444079	0.72088816	104.078332	7.36	29			
6	127.4	3.234375	0.646875	93.3926715	7.45	27			
7	134.3	3.54276316	0.70855263	102.297388					
8	124.2	3.67023026	0.73404605	105.978005					
9	118	2.95065789	0.59013158	85.2003319					
10	118.9	3.66611842	0.73322368	105.859275					
PROMEDIO	127.35	3.38322368	0.67664474	97.6906816	7.43333333	29.3333333			
DESVEST	15.500914	0.27957704	0.05591541	8.0727952	0.05163978	3.26598632			
CV	12.1718995	8.2636287	8.2636287	8.2636287	0.69470553	11.1340443			

Tabla 76. Evaluación del lote 5-4 % p/v-Secado en desecador

Laminilla	Masa (mg)	mg CHX/laminilla	mgCHX/cm ²	%CHX/laminilla	Tiempo de desintegración (s)	pH	Evaluación en colorímetro		
							L*	a*	b*
1	152.8	3.625	0.725	104.67198	51	7.34	9.3	9.58	11.56
2	157.7	3.65789474	0.73157895	116.901124	50	7.37	0.44	-0.09	-0.14
3	159.1	3.68667763	0.73733553	106.452923	49	7.3	0.96	-0.25	-0.18
4	150.5	3.47286184	0.69457237	100.278986	48	7.38			
5	136.5	3.37006579	0.67401316	97.310747	56	7.32			
6	133.5	3.50575658	0.70115132	101.228822	57	7.34			
7	157.9	3.47286184	0.69457237	100.278986					
8	150.3	3.43174342	0.68634868	99.0916904					
9	141.8	3.42351974	0.68470395	98.8542313					
10	159.9	3.63322368	0.72664474	104.909439					
PROMEDIO	150	3.52796053	0.70559211	102.997893	51.8333333	7.34166667			
DESVEST	9.61734544	0.11266081	0.02253216	5.71917	3.76386326	0.02994439			
CV	6.41156363	3.19336921	3.19336921	5.55270583	7.26147253	0.40786914			



Tabla 77. Evaluación del lote 6-5 % p/v-Secado en desecador

Laminilla	Masa (mg)	mgCHX/laminilla	mgCHX/cm ²	%CHX/laminilla	Tiempo de desintegración (s)	Evaluación en colorímetro			
						pH	L*	a*	b*
1	169.2	3.23848684	0.64769737	93.5114011	100	7.32	11.61	10.9	9.77
2	176.1	3.52631579	0.70526316	101.82247	75	7.3	-0.09	-0.11	0.03
3	165.8	3.55098684	0.71019737	102.534848	85	7.35	-0.25	-0.17	-0.07
4	156.8	3.87171053	0.77434211	96.5983696	70	7.33			
5	175.1	3.14391447	0.62878289	90.7806212	78	7.33			
6	177.7	3.19736842	0.63947368	92.3241055	85	7.52			
7	157.8	3.34539474	0.66907895	96.5983696					
8	158.9	3.27960526	0.65592105	94.6986967					
9	177	3.43174342	0.68634868	99.0916904					
10	189.2	3.38240132	0.67648026	97.6669357					
PROMEDIO	170.36	3.39679276	0.67935855	96.5627508	82.1666667	7.35833333			
DESVEST	10.5589562	0.21413404	0.04282681	3.87488287	10.496031	0.08084965			
CV	6.19802546	6.30400674	6.30400674	4.01281327	12.7740742	1.09874955			

Tabla 78. Prueba de t de student para tiempo de desintegración de Lote 1 (3 % p/v-Estufa) y lote 4 (3 % p/v-Desecador).

	Variable 1	Variable 2
Media	30.3333333	29.3333333
Varianza	12.6666667	10.6666667
Observaciones	6	6
Varianza agrupada	11.6666667	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	10	
Estadístico t	0.50709255	
P(T<=t) una cola	0.3115421	
Valor crítico de t (una cola)	1.81246112	
P(T<=t) dos colas	0.62308419	
Valor crítico de t (dos colas)	2.22813885	

Planteamiento de hipótesis

H_0 =No existen diferencias significativas entre el tiempo de desintegración de laminillas preparadas con 3 % p/v de filmógeno obtenidas por secado con estufa y aquellas obtenidas en desecador.

H_a =Existen diferencias significativas entre el tiempo de desintegración de laminillas preparadas con 3 % p/v de filmógeno obtenidas por secado con estufa y aquellas obtenidas en desecador.



Estadístico de contraste:

Si $|t_{\text{calculada}}| \leq t_{\text{crítica}}$ No se rechaza H_0

Si $|t_{\text{calculada}}| > t_{\text{crítica}}$ Se rechaza H_0

Resultado: $|0.0507| \leq 2.228$

Como $|t_{\text{calculada}}| \leq t_{\text{crítica}}$, entonces no se rechaza la hipótesis nula y se dice que no existen diferencias significativas en el tiempo de desintegración laminillas obtenidas por secado con estufa y aquellas obtenidas en desecador preparadas con 3 % p/v de filmógeno.

Tabla 79. Prueba de t de student para tiempo de desintegración de Lote 2 (4 % p/v-Estufa) y lote 5 (4 % p/v-Desecador).

	Variable 1	Variable 2
Media	48.3333333	51.8333333
Varianza	5.06666667	14.1666667
Observaciones	6	6
Varianza agrupada	9.61666667	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	10	
Estadístico t	-1.95486329	
P(T<=t) una cola	0.03955383	
Valor crítico de t (una cola)	1.81246112	
P(T<=t) dos colas	0.07910767	
Valor crítico de t (dos colas)	2.22813885	

Planteamiento de hipótesis

H_0 =No existen diferencias significativas entre el tiempo de desintegración de laminillas preparadas con 4 % p/v de filmógeno obtenidas por secado con estufa y aquellas obtenidas en desecador.

H_a =Existen diferencias significativas entre el tiempo de desintegración de laminillas preparadas con 4 % p/v de filmógeno obtenidas por secado con estufa y aquellas obtenidas en desecador.

Estadístico de contraste:

Si $|t_{\text{calculada}}| \leq t_{\text{crítica}}$ No se rechaza H_0

Si $|t_{\text{calculada}}| > t_{\text{crítica}}$ Se rechaza H_0

Resultado: $|-1.954| \leq 2.228$



Como $|t_{\text{calculada}}| \leq t_{\text{crítica}}$, entonces no se rechaza la hipótesis nula y se dice que no existen diferencias significativas en el tiempo de desintegración laminillas obtenidas por secado con estufa y aquellas obtenidas en desecador preparadas con 4 % p/v de filmógeno.

Tabla 80. Prueba de t de student para tiempo de desintegración de lote (5 % p/v-Estufa) y lote 6 (5 % p/v-Desecador).

	Variable 1	Variable 2
Media	67.6666667	82.1666667
Varianza	102.266667	110.166667
Observaciones	6	6
Varianza agrupada	106.216667	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	10	
Estadístico t	-2.43686963	
Media	67.6666667	82.1666667
Varianza	102.266667	110.166667
Observaciones	6	6
Varianza agrupada	106.216667	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	10	
Estadístico t	-2.43686963	
P(T<=t) una cola	0.01751805	

Planteamiento de hipótesis

H_0 =No existen diferencias significativas entre el tiempo de desintegración de laminillas preparadas con 5 % p/v de filmógeno obtenidas por secado con estufa y aquellas obtenidas en desecador.

H_a =Existen diferencias significativas entre el tiempo de desintegración de laminillas preparadas con 5 % p/v de filmógeno obtenidas por secado con estufa y aquellas obtenidas en desecador.

Estadístico de contraste:

Si $|t_{\text{calculada}}| \leq t_{\text{crítica}}$ No se rechaza H_0

Si $|t_{\text{calculada}}| > t_{\text{crítica}}$ Se rechaza H_0

Resultado: $|-2.436| > 2.228$

Como $|t_{\text{calculada}}| > t_{\text{crítica}}$, entonces se rechaza la hipótesis nula y se dice que existen diferencias significativas en el tiempo de desintegración laminillas obtenidas por secado con estufa y aquellas obtenidas en desecador preparadas con 5 % p/v de filmógeno.



ANEXO C. Datos de la liberación *in vitro* de gluconato de clorhexidina desde diferentes sistemas.

Resultados de la liberación para nanopartículas

Tabla 81. Liberación *in vitro* desde nanopartículas, 1.

Tiempo (min)	t ½	Ln t	Mt	Ln (Mt)	Mt/M∞	Mt/M∞*100	Ln Mt/M∞	(M∞-Mt*100)1/3	ln(-ln(1-Mt/M∞))
3	1.73205081	1.09861229	0.00848684	-4.7692383	0.04002979	4.00297892	-3.21813137	4.5774743	-3.17658211
5	2.23606798	1.60943791	0.02808553	-3.57250091	0.13247067	13.2470675	-2.02139398	4.42561318	-1.94530467
10	3.16227766	2.30258509	0.05942763	-2.82299598	0.28030162	28.0301617	-1.27188905	4.15864289	-1.10986392
15	3.87298335	2.7080502	0.07488158	-2.59184736	0.35319307	35.319307	-1.04074043	4.01326176	-0.82929403
20	4.47213595	2.99573227	0.09625658	-2.34073796	0.45401228	45.4012284	-0.78963102	3.79301446	-0.50139199
25	5	3.21887582	0.10924342	-2.21417667	0.51526717	51.526717	-0.66306974	3.6455333	-0.32204967
30	5.47722558	3.40119738	0.11976316	-2.12223917	0.56488549	56.4885491	-0.57113224	3.51662191	-0.18312069
40	6.32455532	3.68887945	0.13541447	-1.99941503	0.63870787	63.8707869	-0.4483081	3.30539952	0.01832912
50	7.07106781	3.91202301	0.14682237	-1.9185318	0.69251535	69.2515353	-0.36742487	3.13242584	0.1653
60	7.74596669	4.09434456	0.16040132	-1.83007638	0.75656302	75.6563016	-0.27896945	2.89789273	0.34586987
75	8.66025404	4.31748811	0.17733553	-1.72971171	0.83643641	83.6436409	-0.17860478	2.53844832	0.59360923
90	9.48683298	4.49980967	0.17719737	-1.73049109	0.83578476	83.5784762	-0.17938416	2.54132802	0.59172879
120	10.9544512	4.78749174	0.18189474	-1.70432713	0.85794078	85.7940785	-0.1532202	2.42115723	0.66907646
150	12.2474487	5.01063529	0.21076974	-1.55698904	0.99413516	99.413516	-0.00588211	0.84083065	1.63418227
180	13.4164079	5.19295685	0.21201316	-1.55110694	0.99999999	99.999999	-9.9299E-09	0	1.63418227
240	15.4919334	5.48063892	0.19549342	-1.63222855	0.92208154	92.208154	-0.08112162	1.18213672	1.63418227
300	17.3205081	5.70378247	0.19900658	-1.61441739	0.93865201	93.8652011	-0.06331046	-0.70561189	1.63418227
360	18.973666	5.88610403	0.19521711	-1.63364298	0.92077824	92.0778244	-0.08253605	0.72364622	1.63418227



Tabla 82. Liberación *in vitro* desde nanopartículas, 2.

Tiempo (min)	$t^{1/2}$	$\ln t$	Mt	$\ln (Mt)$	Mt/M_{∞}	$Mt/M_{\infty} * 100$	$\ln Mt/M_{\infty}$	$(M_{\infty} - Mt * 100) / 3$	$\ln(-\ln(1 - Mt/M_{\infty}))$
3	1.73205081	1.09861229	0.02230263	-3.8030506	0.07998867	7.99886737	-2.52587023	2.94921836	-2.48447517
5	2.23606798	1.60943791	0.03933553	-3.23562719	0.14107737	14.1077369	-1.95844682	2.88244184	-1.88337206
10	3.16227766	2.30258509	0.05982237	-2.81637563	0.21455369	21.455369	-1.53919527	2.79778737	-1.42087266
15	3.87298335	2.7080502	0.07705263	-2.56326656	0.27635025	27.635025	-1.2860862	2.72240047	-1.12871762
20	4.47213595	2.99573227	0.09546711	-2.34897354	0.342394	34.2393995	-1.07179317	2.6369251	-0.86952809
25	5	3.21887582	0.11605263	-2.15371147	0.41622425	41.6224249	-0.8765311	2.53429921	-0.61945377
30	5.47722558	3.40119738	0.14680263	-1.91866624	0.52650952	52.6509518	-0.64148587	2.36344929	-0.29085581
40	6.32455532	3.68887945	0.17084211	-1.76701551	0.6127274	61.2727398	-0.48983514	2.21028425	-0.0527402
50	7.07106781	3.91202301	0.19419079	-1.63891415	0.69646775	69.6467753	-0.36173379	2.03787473	0.17585689
60	7.74596669	4.09434456	0.21763816	-1.52492142	0.78056204	78.056204	-0.24774105	1.82899755	0.41652751
75	8.66025404	4.31748811	0.23220395	-1.46013921	0.83280243	83.280243	-0.18295884	1.67052325	0.58142151
90	9.48683298	4.49980967	0.25367763	-1.37169099	0.90981807	90.9818074	-0.09451062	1.35982297	0.87793496
120	10.9544512	4.78749174	0.24426316	-1.40950912	0.87605294	87.6052943	-0.13232875	1.51189377	0.73615914
150	12.2474487	5.01063529	0.25803947	-1.35464271	0.92546188	92.5461876	-0.07746234	1.27615088	0.95414303
180	13.4164079	5.19295685	0.27882237	-1.27718037	0.99999999	99.9999994	-5.6629E-09	0.00540492	2.94387709
240	15.4919334	5.48063892	0.26782895	-1.31740676	0.96057195	96.0571949	-0.04022639	1.03207433	1.17349641
300	17.3205081	5.70378247	0.26522368	-1.32718172	0.95122814	95.1228139	-0.05000135	1.10789596	1.10545607
360	18.973666	5.88610403	0.26222368	-1.33855738	0.9404686	94.0468601	-0.06137702	1.1840169	1.03718054



Tabla 83. Liberación *in vitro* desde nanopartículas, 3.

Tiempo (min)	$t^{1/2}$	$\ln t$	Mt	$\ln (Mt)$	Mt/M_{∞}	$Mt/M_{\infty} * 100$	$\ln Mt/M_{\infty}$	$(M_{\infty} - Mt * 100) / 3$	$\ln(-\ln(1 - Mt/M_{\infty}))$
3	1.73205081	1.09861229	0.02723684	-3.60318473	0.09304207	9.30420719	-2.3747035	2.98323987	-2.32627125
5	2.23606798	1.60943791	0.04871053	-3.02186013	0.16639698	16.6396981	-1.7933789	2.90054018	-1.70375966
10	3.16227766	2.30258509	0.05824342	-2.84312414	0.19896171	19.8961706	-1.61464291	2.8622675	-1.50576946
15	3.87298335	2.7080502	0.07221711	-2.62807835	0.24669633	24.6696334	-1.39959712	2.80424414	-1.26129526
20	4.47213595	2.99573227	0.10484211	-2.25529982	0.35814455	35.8144555	-1.02681859	2.65850942	-0.81330065
25	5	3.21887582	0.12631579	-2.06897024	0.43149946	43.1499464	-0.84048901	2.55310937	-0.57136677
30	5.47722558	3.40119738	0.16288816	-1.81469146	0.55643204	55.6432043	-0.58621023	2.35042203	-0.20714194
40	6.32455532	3.68887945	0.183375	-1.69622204	0.62641586	62.6415862	-0.46774081	2.21967097	-0.01550759
50	7.07106781	3.91202301	0.20859868	-1.56734304	0.71258091	71.2580911	-0.33886181	2.03390656	0.22059141
60	7.74596669	4.09434456	0.22217763	-1.50427807	0.7589671	75.8967104	-0.27579684	1.91801162	0.35264212
75	8.66025404	4.31748811	0.23565789	-1.44537412	0.80501619	80.5016187	-0.21689289	1.78714029	0.49154417
90	9.48683298	4.49980967	0.25890789	-1.3512829	0.88443906	88.4439057	-0.12280167	1.50116865	0.76916205
120	10.9544512	4.78749174	0.27811184	-1.27973194	0.95004046	95.004046	-0.05125071	1.13509429	1.09745889
150	12.2474487	5.01063529	0.28488158	-1.2556817	0.97316613	97.3166134	-0.02720047	0.92268517	1.28594641
180	13.4164079	5.19295685	0.29273684	-1.22848122	1.00000001	100.000001	7.1917E-09	-0.00594888	#NUM!
240	15.4919334	5.48063892	0.26832237	-1.31556615	0.91659925	91.6599251	-0.08708492	1.3465292	0.90990961
300	17.3205081	5.70378247	0.27558553	-1.28885726	0.94141047	94.1410471	-0.06037603	1.19701372	1.0428174
360	18.973666	5.88610403	0.28255263	-1.26389044	0.96521036	96.5210363	-0.03540921	1.00610296	1.21147531



Resultados de la liberación para laminillas con nanopartículas

Tabla 84. Liberación *in vitro* desde laminilla con nanopartículas, 1.

Tiempo (min)	t 1/2	Ln t	Mt	Ln (Mt)	Mt/M ∞	Mt/M ∞ *100	Ln Mt/M ∞	(M ∞ -Mt*100)1/3	ln(-ln(1-Mt/M ∞))
3	1.73205081	1.09861229	0.01243421	-4.38730369	0.04249005	4.24900516	-3.15848531	3.03732607	-3.12785295
5	2.23606798	1.60943791	0.01269079	-4.36687879	0.04336683	4.33668305	-3.1380604	3.03639871	-3.10696916
10	3.16227766	2.30258509	0.02567763	-3.66213503	0.08774533	8.77453288	-2.43331665	2.98870019	-2.3785245
15	3.87298335	2.7080502	0.05267763	-2.94356436	0.18000944	18.0009441	-1.71474598	2.884341	-1.60740934
20	4.47213595	2.99573227	0.11076316	-2.20036107	0.37849868	37.8498682	-0.97154269	2.62980979	-1.05762122
25	5	3.21887582	0.12088816	-2.11288948	0.41309772	41.3097724	-0.88407109	2.58007452	-0.64609089
30	5.47722558	3.40119738	0.13002632	-2.04001842	0.44432454	44.432454	-0.81120004	2.53347948	-0.54685977
35	5.91607978	3.55534806	0.14103947	-1.95871547	0.48195859	48.1958586	-0.72989709	2.47494269	-0.43248645
40	6.32455532	3.68887945	0.15215132	-1.88287975	0.51992985	51.9929854	-0.65406137	2.41293276	-0.32156072
50	7.07106781	3.91202301	0.16138816	-1.8239429	0.55149389	55.1493892	-0.59512452	2.358847	-0.23189859
60	7.74596669	4.09434456	0.17546053	-1.74034118	0.59958184	59.958184	-0.5115228	2.27133699	-0.09823106
75	8.66025404	4.31748811	0.18696711	-1.67682259	0.638902	63.8901999	-0.4480042	2.19441458	0.00975174
90	9.48683298	4.49980967	0.19758553	-1.62158374	0.67518715	67.5187154	-0.39276536	2.11830286	0.10948173
120	10.9544512	4.78749174	0.22103289	-1.50944374	0.75531125	75.5311251	-0.28062536	1.92744348	0.33573043
150	12.2474487	5.01063529	0.23688158	-1.44019493	0.80946921	80.9469206	-0.21137655	1.77323126	0.50025092
180	13.4164079	5.19295685	0.24621711	-1.40154159	0.84137047	84.1370467	-0.17272321	1.66816243	0.60561423
240	15.4919334	5.48063892	0.26315132	-1.33502607	0.89923787	89.923787	-0.10620769	1.43397891	0.82688506
300	17.3205081	5.70378247	0.27268421	-1.29944089	0.93181358	93.1813577	-0.07062251	1.25895331	0.98458598
360	18.973666	5.88610403	0.27994737	-1.27315366	0.95663316	95.6633162	-0.04433528	1.08267033	1.14079462
420	20.4939015	6.04025471	0.29263816	-1.22881839	0.99999999	99.9999993	-7.1941E-09	0.00594888	2.93119412
480	21.9089023	6.1737861	0.28174342	-1.26675848	0.96277061	96.2770614	-0.03794009	1.02897686	1.19108721



Tabla 85. Liberación *in vitro* desde laminilla con nanopartículas, 2.

Tiempo (min)	t 1/2	Ln t	Mt	Ln (Mt)	Mt/M ∞	Mt/M ∞ *100	Ln Mt/M ∞	(M ∞ -Mt*100)1/3	Ln(-Ln(1-Mt/M ∞))
3	1.73205081	1.09861229	0.01144737	-4.46999541	0.03673909	3.67390887	-3.303914	3.10770943	-3.2852569
5	2.23606798	1.60943791	0.01851316	-3.98927356	0.05941597	5.94159745	-2.82319216	3.0831285	-2.79272134
10	3.16227766	2.30258509	0.03603947	-3.32314045	0.11566479	11.5664786	-2.15705905	3.02040189	-2.09622897
15	3.87298335	2.7080502	0.08376316	-2.47976201	0.26882878	26.882878	-1.31368061	2.83486331	-1.16120832
20	4.47213595	2.99573227	0.121125	-2.11093221	0.38873756	38.8737564	-0.9448508	2.67055584	-0.70881144
25	5	3.21887582	0.13480263	-2.00394356	0.43263444	43.2634441	-0.83786215	2.60503412	-0.56783442
30	5.47722558	3.40119738	0.14482895	-1.93220191	0.46481282	46.4812815	-0.7661205	2.55482405	-0.46978171
35	5.91607978	3.55534806	0.15475658	-1.86590185	0.49667447	49.6674473	-0.69982045	2.50308393	-0.37612262
40	6.32455532	3.68887945	0.16754605	-1.78649702	0.5377209	53.7720903	-0.62041562	2.4331031	-0.25930654
50	7.07106781	3.91202301	0.18250658	-1.70096906	0.58573509	58.5735092	-0.53488765	2.34576846	-0.12641434
60	7.74596669	4.09434456	0.196875	-1.62518627	0.63184898	63.1848982	-0.45910487	2.25528326	-0.00073822
75	8.66025404	4.31748811	0.20759211	-1.57218016	0.66624437	66.624437	-0.40609875	2.18273976	0.09289472
90	9.48683298	4.49980967	0.22117105	-1.50881888	0.70982453	70.9824531	-0.34273748	2.08327207	0.21290691
120	10.9544512	4.78749174	0.23494737	-1.44839375	0.75403812	75.4038124	-0.28231235	1.97158282	0.33831249
150	12.2474487	5.01063529	0.25385526	-1.370991	0.81472096	81.4720963	-0.2049096	1.79391222	0.52229497
180	13.4164079	5.19295685	0.25865132	-1.3522744	0.83011337	83.0113375	-0.18619299	1.74279173	0.57246092
240	15.4919334	5.48063892	0.2745	-1.29280402	0.88097801	88.0978009	-0.12672261	1.54787124	0.75539261
300	17.3205081	5.70378247	0.28284868	-1.26284321	0.90777221	90.7772207	-0.09676181	1.42171659	0.86856737
360	18.973666	5.88610403	0.30461842	-1.18869536	0.97763982	97.7639819	-0.02261396	0.88651115	1.33512567
420	20.4939015	6.04025471	0.31158553	-1.16608142	0.99999999	99.9999988	-1.1824E-08	0.00716883	2.90433647
480	21.9089023	6.1737861	0.30019737	-1.20331513	0.96345093	96.3450929	-0.03723372	1.0442822	1.1966761



Tabla 86. Liberación *in vitro* desde laminilla con nanopartículas, 3.

Tiempo (min)	t 1/2	Ln t	Mt	Ln (Mt)	Mt/M ∞	Mt/M ∞ *100	Ln Mt/M ∞	(M ∞ -Mt*100)1/3	Ln(-Ln(1-Mt/M ∞))
3	1.73205081	1.09861229	0.00355263	-5.64006666	0.01238646	1.23864575	-4.39115154	3.04833972	-4.38492611
5	2.23606798	1.60943791	0.01377632	-4.28480441	0.04803193	4.80319294	-3.03588929	3.01121533	-3.01137836
10	3.16227766	2.30258509	0.03189474	-3.44531427	0.11120286	11.1202862	-2.19639916	2.94307887	-2.13803501
15	3.87298335	2.7080502	0.07833553	-2.54675406	0.27312139	27.3121387	-1.29783894	2.75225276	-1.14257739
20	4.47213595	2.99573227	0.11628947	-2.15167273	0.40545004	40.5450041	-0.90275762	2.5739324	-0.65402161
25	5	3.21887582	0.13164474	-2.02764837	0.45898706	45.8987062	-0.77873326	2.49423232	-0.4872522
30	5.47722558	3.40119738	0.14354605	-1.94109937	0.50048169	50.0481695	-0.69218426	2.42876123	-0.36512334
35	5.91607978	3.55534806	0.15258553	-1.88003001	0.53199835	53.1998347	-0.6311149	2.37656747	-0.27538012
40	6.32455532	3.68887945	0.16241447	-1.81760373	0.56626755	56.6267546	-0.56868862	2.31708336	-0.17993153
50	7.07106781	3.91202301	0.17510526	-1.74236798	0.61051473	61.0514725	-0.49345287	2.23544866	-0.05876406
60	7.74596669	4.09434456	0.18700658	-1.67661148	0.65200936	65.2009357	-0.42769637	2.15306368	0.05409008
75	8.66025404	4.31748811	0.19308553	-1.64462205	0.67320396	67.3203962	-0.39570693	2.10843369	0.11191612
90	9.48683298	4.49980967	0.19571053	-1.63111862	0.68235618	68.2356178	-0.3822035	2.08856417	0.13699689
120	10.9544512	4.78749174	0.22715132	-1.48213889	0.79197633	79.1976327	-0.23322378	1.81372709	0.45114147
150	12.2474487	5.01063529	0.23707895	-1.43936208	0.82658959	82.6589594	-0.19044697	1.70697072	0.56081176
180	13.4164079	5.19295685	0.24680921	-1.39913967	0.86051472	86.0514725	-0.15022455	1.58748808	0.6779301
240	15.4919334	5.48063892	0.24055263	-1.42481637	0.8387008	83.8700797	-0.17590126	1.66626892	0.60130282
300	17.3205081	5.70378247	0.24830921	-1.39308049	0.86574456	86.5744562	-0.14416538	1.56739448	0.6971447
360	18.973666	5.88610403	0.27461842	-1.2923727	0.95747316	95.7473161	-0.04345759	1.06845291	1.14981855
420	20.4939015	6.04025471	0.28681579	-1.24891512	1	99.9999998	-1.835E-09	0.00374756	3.00152569
480	21.9089023	6.1737861	0.279375	-1.27520031	0.97405725	97.4057251	-0.0262852	0.90616305	1.29523749

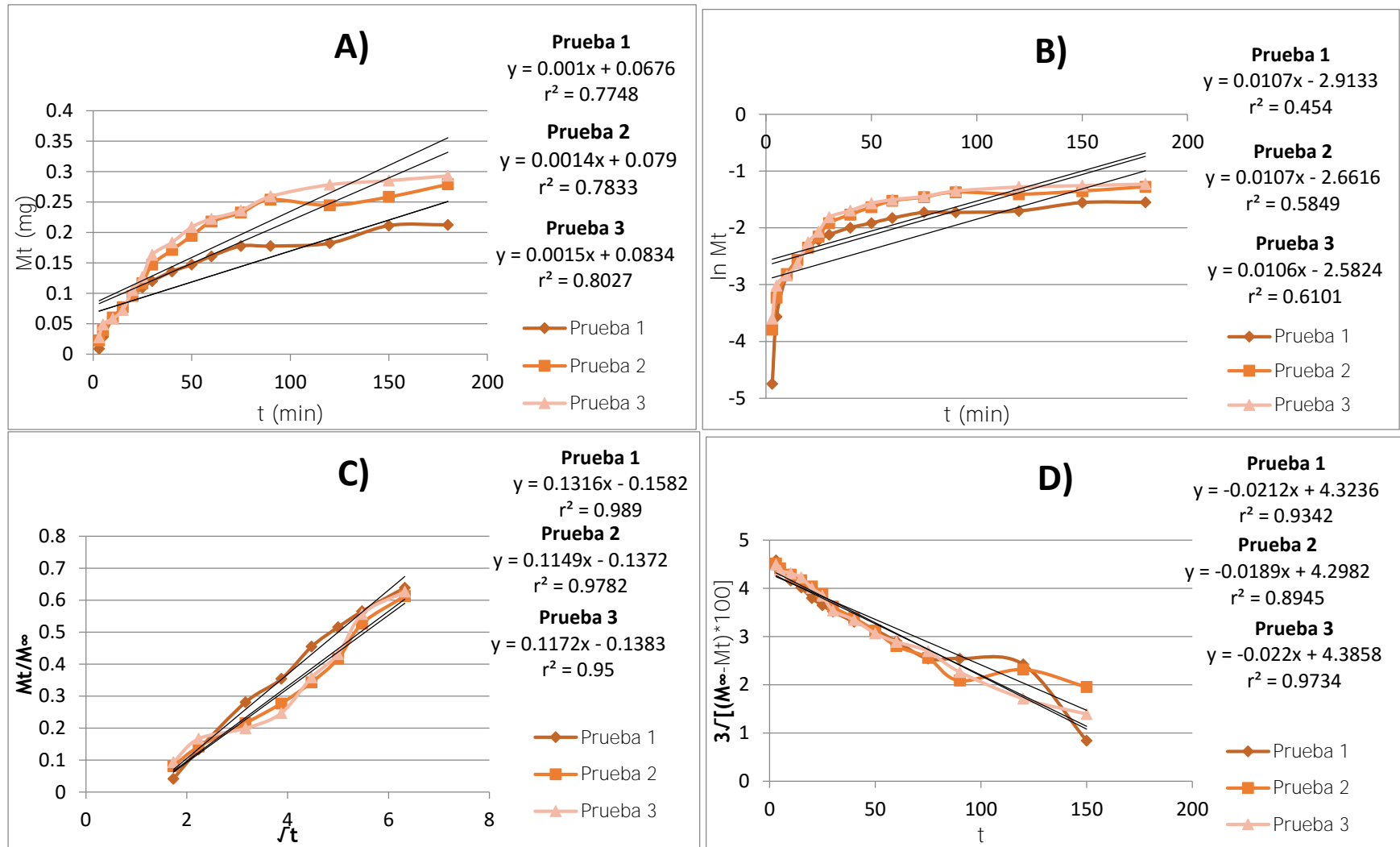


Figura 61. Ajuste de la liberación *in vitro* de gluconato de clorhexidina desde NPP a los modelos de: A) Orden 0, B) Orden 1, C) Higuchi, D) Hixson-Crowell, E) Korsmeyer-Peppas y F) Weibull.

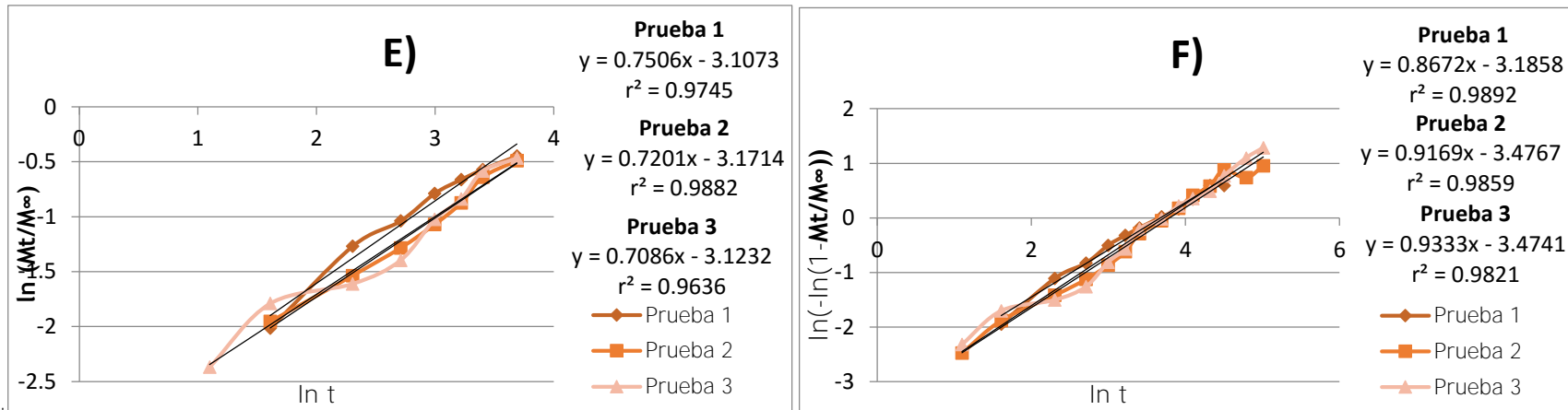


Figura 61. Ajuste de la liberación *in vitro* de gluconato de clorhexidina desde NPP a los modelos de: A) Orden 0, B) Orden 1, C) Higuchi, D) Hixson-Crowell, E) Korsmeyer-Peppas y F) Weibull (continuación).

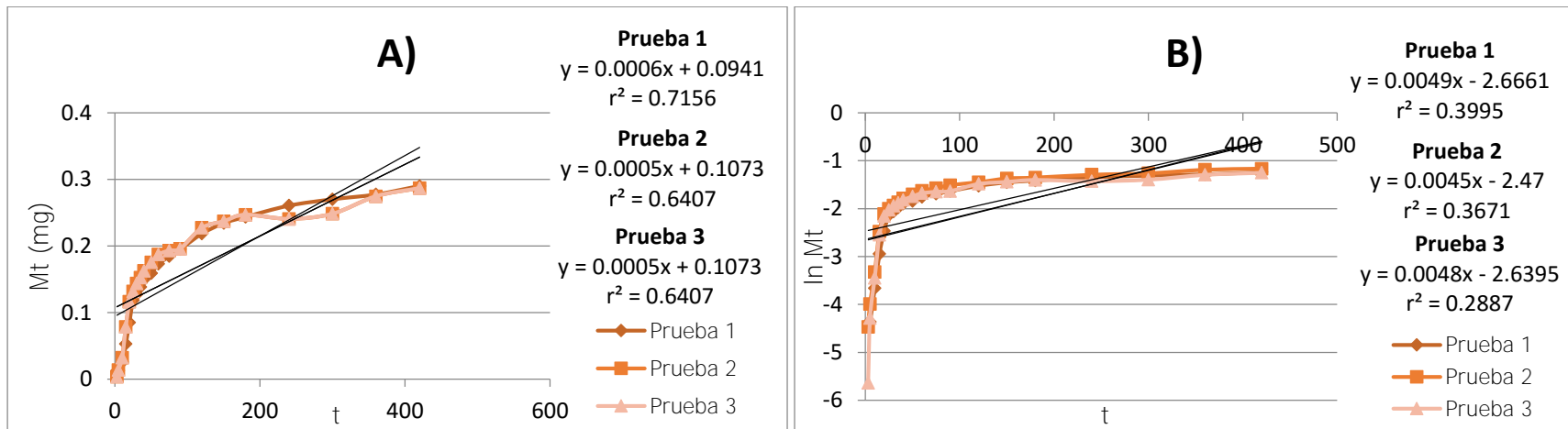


Figura 62. Ajuste de la liberación *in vitro* de gluconato de clorhexidina desde laminillas con NPP a los modelos de: A) Orden 0, B) Orden 1, C) Higuchi, D) Hixson-Crowell, E) Korsmeyer-Peppas y F) Weibull.

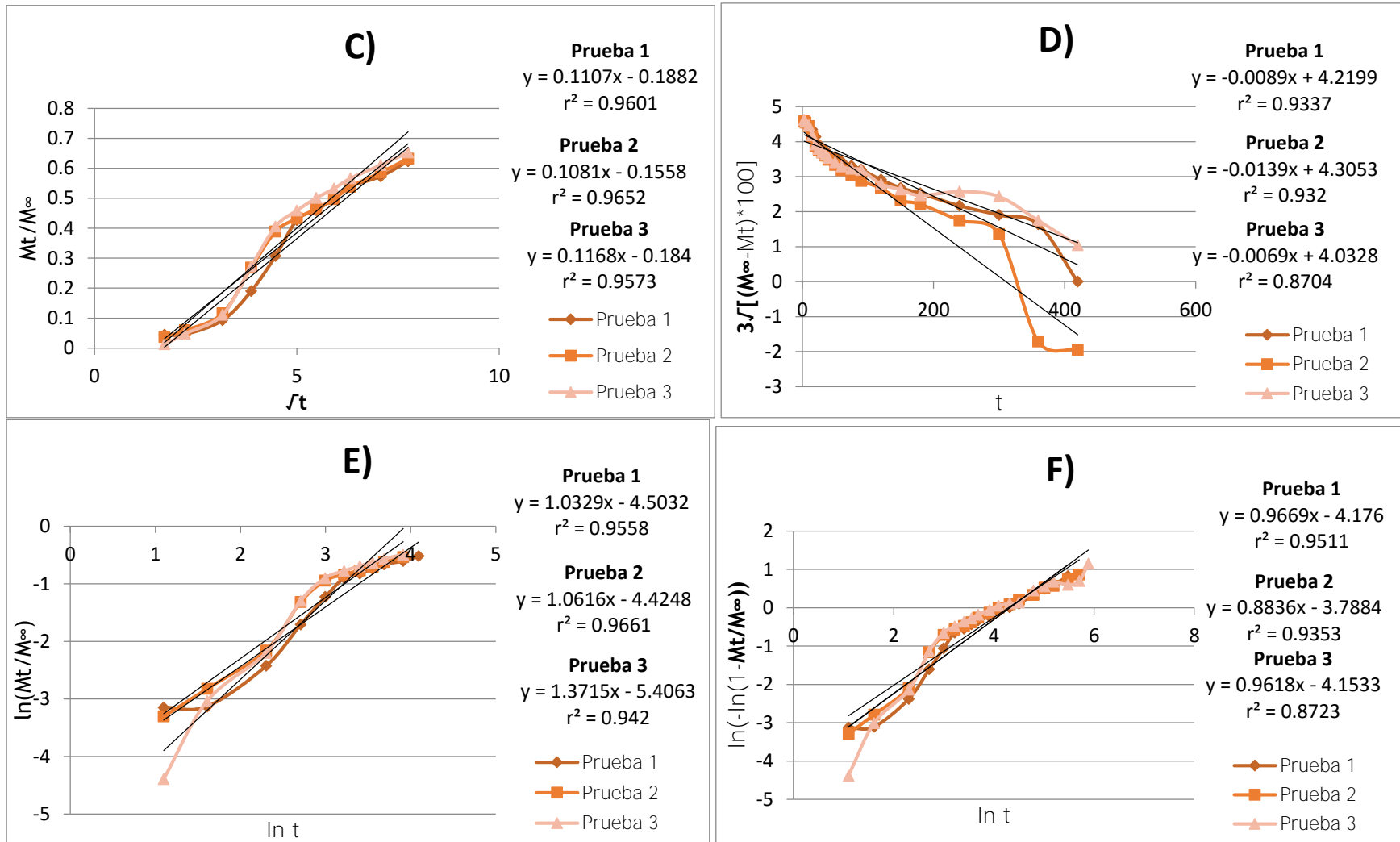


Figura 62. Ajuste de la liberación *in vitro* de gluconato de clorhexidina desde laminillas con NPP a los modelos de: A) Orden 0, B) Orden 1, C) Higuchi, D) Hixson-Crowell, E) Korsmeyer-Peppas y F) Weibull (continuación).

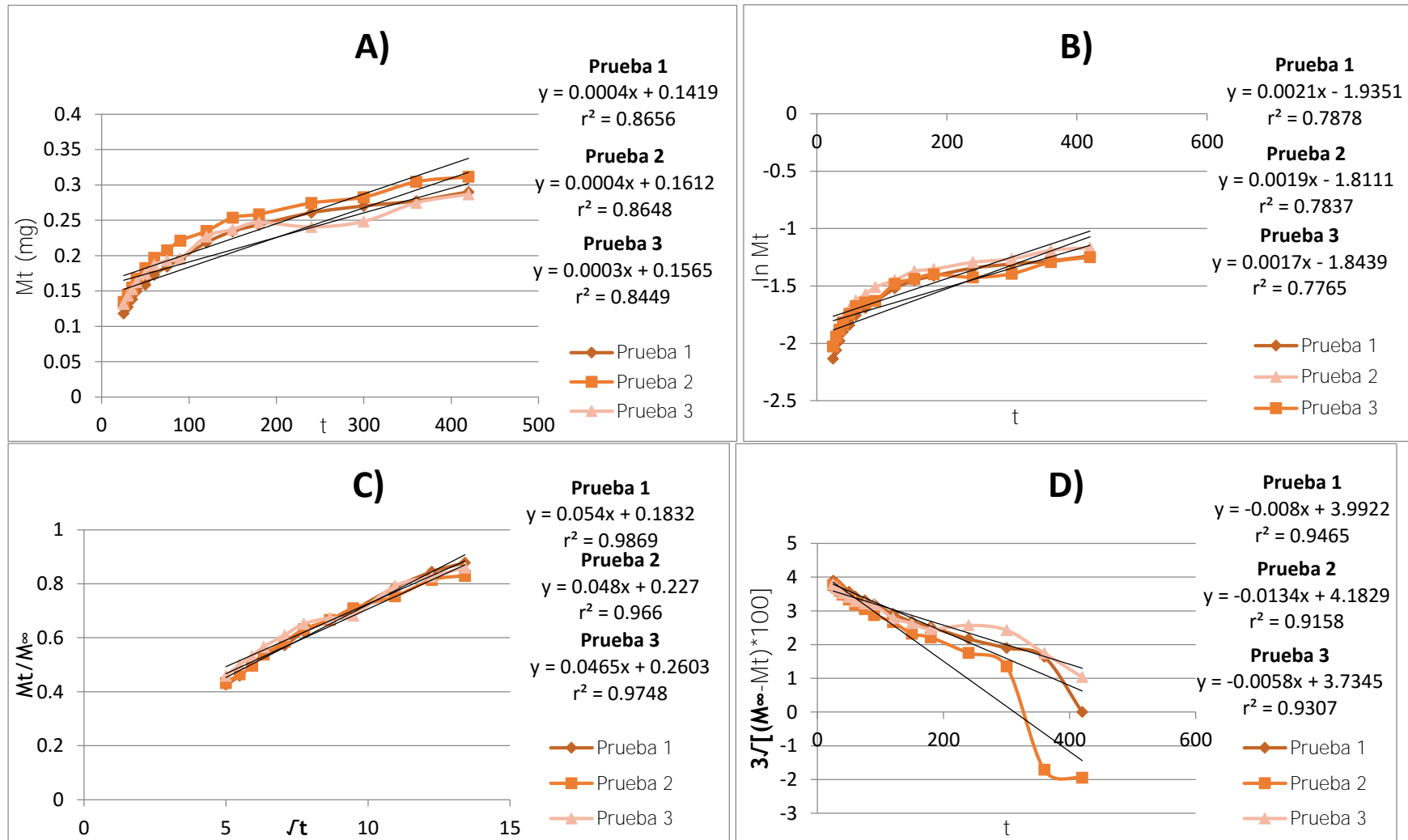


Figura 63. Ajuste de la liberación *in vitro* de gluconato de clorhexidina desde laminillas con NPP a partir de los 25 minutos a los modelos de: A) Orden 0, B) Orden 1, C) Higuchi, D) Hixson-Crowell, E) Korsmeyer-Peppas y F) Weibull.

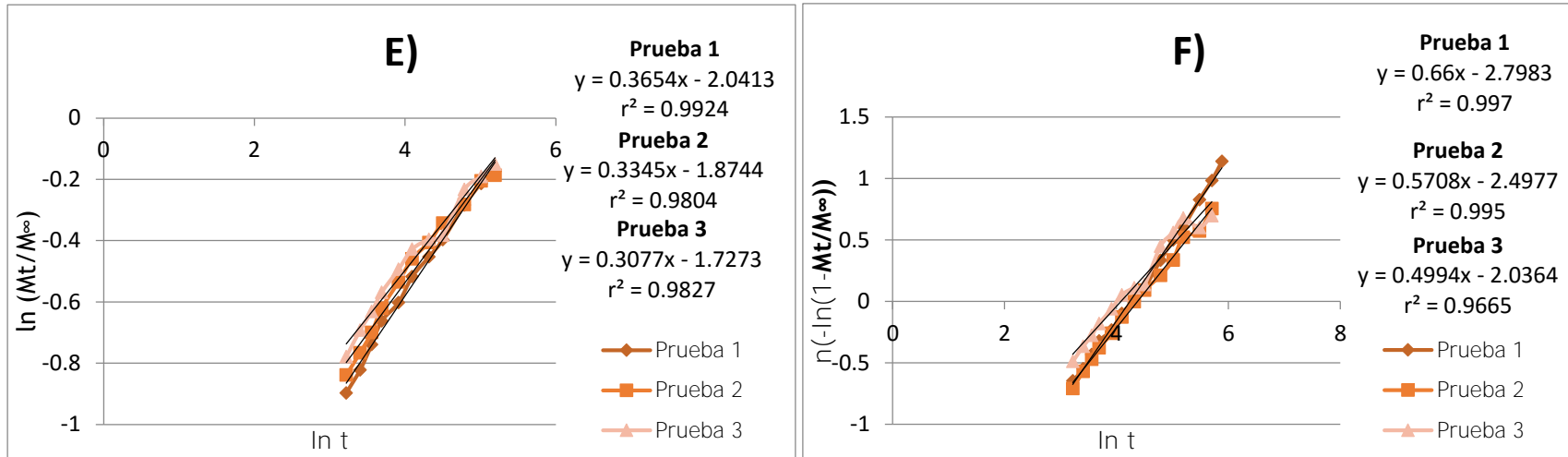


Figura 63. Ajuste de la liberación *in vitro* de gluconato de clorhexidina desde laminillas con NPP a partir de los 25 minutos a los modelos de: A) Orden 0, B) Orden 1, C) Higuchi, D) Hixson-Crowell, E) Korsmeyer-Peppas y F) Weibull (continuación).