



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOFIBRAS POLIMÉRICAS
OBTENIDAS POR LA TÉCNICA DE ELECTROHILADO COMO SISTEMAS DE
LIBERACIÓN DE FÁRMACOS”**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Gustavo Vidal Romero

Dr. David Quintanar Guerrero
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO 2020



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

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**“ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOFIBRAS
POLIMÉRICAS OBTENIDAS POR LA TÉCNICA DE
ELECTROHILADO COMO SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE
FÁRMACOS”**

**T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. Gustavo Vidal Romero

Dr. David Quintanar Guerrero
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM



Ciudad de México, febrero de 2020

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Francisco Hernández Luis
Vocal	Dra. Luz María Melgoza Contreras
Vocal	Dr. Emilio Bucio Carrillo
Vocal	Dra. Elizabeth Piñón Segundo
Secretario	Dr. Gerardo Gómez Leyva

TUTOR

Dr. David Quintanar Guerrero
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM

COMITÉ TUTOR

Dr. Emilio Bucio Carrillo
Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM

Dr. José Juan Escobar Chávez
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)** por ser mi casa de estudios en mi formación académica.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca otorgada durante mis estudios de doctorado (Becario: 273353).

Al **Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas**, UNAM por los apoyos otorgados para la asistencia a congresos.

A mi tutor, el **Dr. David Quintanar Guerrero**, por su paciencia, apoyo y consejos brindados para el desarrollo de este proyecto, con quien comparto los logros obtenidos.

A los miembros de mi Comité Tuto, el **Dr. Emilio Bucio Carrillo** y el **Dr. José Juan Chávez Escobar**, por sus valiosas aportaciones, revisiones y consejos recibidos en cada una de mis evaluaciones semestrales.

A los miembros del **Jurado**, por enriquecer este trabajo con tan importantes comentarios y aportaciones.

A la **M. en I.Q Alicia del Real López** del laboratorio de microscopía del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CEFATA) de la UNAM por su asistencia en los estudios de microscopía electrónica de barrido.

A mi amiga y confidente **Lizbeth Martínez Acevedo**, por compartir momentos y experiencias inolvidables.

A mis amigos del laboratorio Lysett Corona, Moisés Galindo, Eduardo Serrano, Armando Soto, Gilberto García, Citlalli Alonso, Paulina Fuentes, Oscar Escalona, Guillermo Aguas y Mauricio Hernández, por compartir sus experiencias y consejos.

DEDICATORIA

Con amor y profunda gratitud a mis padres Juventino Vidal y Teodora Romero quienes gracias a todas sus enseñanzas y consejos me proporcionaron las armas para enfrentarme a la vida.

A mi tía Elizabeth Morales Lozada[†] por haber compartido conmigo el entusiasmo de hacer un doctorado.

De manera especial, a mi esposa Virginia Rocha y mi hijo José María Vidal, por esa fuerza que me impulsa a seguir adelante en cada paso de mi sendero, producto de su cariño, amor, comprensión y lealtad.

A mis hermanos Alma Rosa Vidal, Oscar Vidal, Raymundo Vidal, Alejandro Rodríguez y Daniel Rodríguez, por estar presentes en cada meta alcanzada.

PUBLICACIONES

ARTÍCULOS

- Gustavo Vidal-Romero, María L. Zambrano-Zaragoza, Lizbeth Martínez-Acevedo, Gerardo Leyva-Gómez, Susana E. Mendoza-Elvira, David Quintanar-Guerrero. **“Design and Evaluation of pH-Dependent Nanosystems Based on Cellulose Acetate Phthalate, Nanoparticles Loaded with Chlorhexidine for Periodontal Treatment”**. *Pharmaceutics*. 2019; 11(11):604.
- Solicitud de Patente ante el CID (Coordinación de Innovación y Desarrollo), UNAM de proyecto titulado **“Hilos dentales para el tratamiento de la gingivitis y la periodontitis: Métodos de elaboración e incorporación de sistemas nanoparticulados”** sometida en agosto 2017. (en proceso).
- Vidal-Romero G., Martínez-Acevedo L., Rocha-Pérez V., Quintanar-Guerrero D. **“Development and Characterization of pH-dependent nanofibers of cellulose acetate Phthalate by Electrospinning technique, areas of dental application”**. (en revisión)

CONGRESOS

- Presentación del trabajo titulado **“Electrohilado una nueva técnica para producir nanofibras biodegradables conteniendo clorhexidina contra la enfermedad periodontal”** en el Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas de la Asociación Farmacéutica Mexicana, celebrado en Huatulco, Oaxaca del 4-7 de Septiembre del 2016.
- Presentación del trabajo titulado **“Electrospinning a Novel Technique to Produce Biodegradable Nanofibers Containing Chlorhexidine against Periodontal Disease”** en el Congreso de la AAPS (American Association of Pharmaceutical Scientists, celebrado en Denver, Colorado del 13-17 de Noviembre del 2016.
- Presentación del trabajo titulado **“Elaboración y caracterización de una nanoemulsión para el cuidado oral”** en el COLAMIC de la Asociación Químicos Cosmetólogos de México, celebrado en Cancún, Quintana Roo del 13-17 de Mayo del 2017.
- Presentación del trabajo titulado **“Elaboración y caracterización de nanofibras poliméricas periodontales de clorhexidina obtenidas por electrohilado”** en el 52° Congreso Mexicano de Química y 36° Congreso Nacional de Educación de Química” de la Sociedad Química de México, celebrado en Puerto Vallarta, Jalisco del 26-29 de Septiembre del 2017.
- Presentación del trabajo titulado **“Electrospinning a novel technique to produce biodegradable nanofibers containing chlorhexidine against periodontal disease”** en el 11th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology; celebrado en Granada, España del 19-22 de Marzo del 2018.
- Presentación del trabajo titulado **“ Funtionalization of dental floss (Superfloss) for personal care”** en el 30th IFSCC CONGRESS 2018, Munich, Alemania, a celebrarse del 18-21 de Septiembre del 2018.

LUGAR EN DONDE SE REALIZÓ LA TESIS:

- Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica (L-323),
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 1, UNAM.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
ABSTRACT	X
RESUMEN	XII
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO.....	5
1. <i>Electrospinning</i> (Técnica de Electrohilado).....	5
1.1 Parámetros considerados durante el proceso de electrohilado.....	9
1.1.1 Parámetros relacionados a la solución polimérica.....	9
1.1.2 Parámetros relacionados al proceso	11
1.1.3 Parámetros relacionados al ambiente	13
2. Aplicaciones farmacéuticas de nanofibras obtenidas por electrohilado.....	13
3. Nanopartículas.....	15
4. Enfermedad periodontal.....	17
5. Clorhexidina base	20
6. Ftalato de Acetato de Celulosa.....	21
7. Sinergismo empleando aceites esenciales, aceite de eugenol.....	22
JUSTIFICACIÓN	25
HIPOTÉISIS	26
OBJETIVOS	27
1. Objetivo General.....	27
2. Objetivos particulares	27
PARTE EXPERIMENTAL.....	28
1. Material y reactivos.....	28
2. Aparatos y equipos	28
3. Metodología	30
3.1 Desarrollo y caracterización de nanofibras poliméricas por <i>Electrospinning</i>	33
3.1.1 Determinaciones previas	33
3.1.1.1 Solubilidad del polímero.....	33
3.1.1.2 Optimización del proceso de electrohilado.....	34
3.1.1.3 Viscosidad y Conductividad de soluciones poliméricas	34
3.1.1.4 Tensión Superficial de las soluciones poliméricas	34

3.1.2 Electrohilado de soluciones poliméricas	35
3.1.3 Eficiencia de entrapamiento.....	35
3.1.4 Determinación de la cantidad de CHX por la técnica de HPLC	36
3.1.5 Determinación de la morfología y diámetro de NFs por MEB	36
3.1.6 Comportamiento térmico por Calorimetría Diferencia de Barrido (DSC)	37
3.1.7 Estudios de liberación del principio activo a partir de nanosistemas .	37
3.2 Desarrollo y caracterización de otros sistemas nanoparticulados por emulsificación-difusión.	38
3.2.1 Determinaciones previas.	38
3.2.1.1 Solubilidad del polímero.....	38
3.2.1.2 Determinación de la solubilidad de CHX.....	38
3.2.1.3 Elección del método analítico para la cuantificación de CHX, Espectrofotometría UV-Vis & Cromatografía de líquidos de alta resolución.....	38
3.2.1.4 Curva de calibración para el complejo colorido de PVAL.....	39
3.2.1.5 Optimización del método analítico para la cuantificación de CHX por HPLC.	39
3.2.1.6 Validación del método analítico para la cuantificación de CHX mediante la técnica de HPLC.....	40
3.2.2 Preparación de NCs/NPs por el método de emulsificación-difusión. .	42
3.2.3 Caracterización fisicoquímica de NCs y NPs.....	44
3.2.3.1 Determinación de tamaño de partícula y potencial Z de NCs y NPs	44
3.2.3.2 Determinación del PVAL residual en NCs/NPs de CAP.....	45
3.2.3.3 Determinación de la eficiencia de entrapamiento y capacidad de carga de NCs y NPs de CAP	46
3.2.3.4 Determinación cuantitativa de CHX en NCs y NPs de CAP.....	47
3.2.3.5 Análisis morfológico y superficial de NCs/NPs por MEB	48
3.2.3.6 Comportamiento térmico por Calorimetría Diferencial de Barrido.	49
3.2.4 Determinación de mecanismo y tipo de liberación del principio activo	49
3.2.5 Pruebas clínicas preliminares (estudio comparativo).....	50
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
1. Resultados y discusión de nanofibras poliméricas.	51
1.1 Optimización del proceso de electrohilado.....	51
1.1.1 Determinaciones previas.	51
1.1.2 Determinación de la solubilidad del polímero.	52

1.2 Influencia cualitativa de parámetros relacionados al proceso en la formación de NFs.....	54
1.3 Influencia de los parámetros de la solución polimérica en la formación de NFs.....	64
1.4 Incorporación del principio activo a las soluciones poliméricas empleadas para la obtención de NFs.	76
1.5 Eficiencia de entrapamiento y eficiencia de proceso de electrohilado ..	81
1.6 Calorimetría Diferencial de Barrido de NFs poliméricas.....	83
1.7 Determinación del mecanismo de liberación del principio activo a partir de NFs poliméricas de CAP.	84
2. Resultados y discusión de otros sistemas nanoparticulados (NCs y NPs)	88
2.1 Determinación de la solubilidad de CHX.....	88
2.2 Elección del método analítico para la cuantificación de CHX, Espectrofotometría UV-Vis / HPLC	89
2.3 Curva de calibración para el complejo colorido de PVAL.....	91
2.4 Optimización del método analítico para la determinación de CHX por HPLC.....	93
2.5 Validación del método analítico para la cuantificación de CHX mediante la técnica de HPLC	96
2.6 Preparación de NCs y NPs por el método de emulsificación-difusión.....	97
2.7 Caracterización fisicoquímica de NCs y NPs obtenidas por el método de emulsificación-difusión	97
2.7.1 Tamaño y potencial Z	97
2.7.2 Eficiencia de entrapamiento y eficiencia de proceso de NCs y NPs de CAP obtenidas por emulsificación-difusión.....	103
2.7.3 Microscopia Electrónica de Barrido de NCs y NPs de CAP.....	105
2.7.3 Propiedades térmicas de los componentes de la formulación por Calorimetría Diferencial de Barrido.....	107
2.8 Determinación de mecanismo de liberación del principio activo a partir de NCs y NPs.....	109
2.9 Prueba de panel, estudio Comparativo-Prospectivo	113
CONCLUSIONES.....	116
REFERENCIAS.....	118
ANEXOS	126
Anexo I.....	126
Resultados de determinaciones de solubilidad de CHX en diferentes medios y diámetro promedio de NFs obtenidas a partir de diferentes soluciones poliméricas a diferente concentración de polímero y cantidad de principio activo.	126
Anexo 2.....	134

Influencia de la concentración de polímero y tipo de disolvente sobre las propiedades de la solución polimérica.....	134
Anexo 3.....	136
Análisis estadístico ANOVA, para el tamaño de partícula, potencial Z, Eficiencia de entrapamiento, Eficiencia de proceso con respecto a la cantidad de principio activo en NCs.	136
Anexo IV . Publicaciones	137

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Componentes básicos del equipo de electrohilado; a) Fuente de alto voltaje, b) Bomba de infusión, c) Jeringa con aguja, d) Plato colector fijo.....	7
Figura 2. Parámetros que influyen en el proceso de electrohilado.....	8
Figura 3. Representación esquemática y micrografías de Nanopartículas. (A) Nanocápsulas (B) Nanoesferas.....	16
Figura 4. Evolución clínica y clasificación de los estadios de la enfermedad periodontal (48).....	18
Figura 5. Estructura química de Clorhexidina base.....	20
Figura 6. Esquema general de las actividades desarrolladas para la obtención, caracterización y evaluación de diferentes nanosistemas.....	30
Figura 7. Diagrama general para la obtención de Nanofibras poliméricas de CAP por la técnica de electrohilado y Nanocápsulas o Nanopartículas poliméricas de CAP por la técnica de emulsificación-difusión.....	31
Figura 8. Condiciones experimentales a probar de los diferentes parámetros que afectan el proceso de electrohilado.....	32
Figura 9. Diagrama general de preparación de NCs y NPs empleando la técnica de emulsificación-difusión.....	43
Figura 10. Representación gráfica del proceso de extracción de CHX para su cuantificación a partir de los diferentes nanosistemas obtenidos.....	47
Figura 11. Procedimiento de adsorción de diferentes sistemas nanoparticulados a la superficie de hilos dentales no encerados.....	48
Figura 12. Equipo de electrohilado empleado para la elaboración de Nanofibras poliméricas.....	51
Figura 13. Formación de fibras empleando soluciones poliméricas a diferentes concentraciones, mezclas de disolventes en diferente proporción y variación de voltaje en un rango de 5-20 kV.....	57
Figura 14. Imágenes obtenidas por microscopia óptica 100 X de muestras obtenidas del proceso de electrohilado al emplear soluciones poliméricas de diferente concentración y tipo de disolvente.....	60
Figura 15. Micrografía de fibra polimérica de CAP, influencia de la humedad y tipo de disolvente.....	63
Figura 16. Propiedades de las soluciones poliméricas empleando diferente concentración de polímero y mezcla de disolventes; a) Conductividad, b) Tensión superficial, c) Viscosidad.....	66
Figura 17. Diseño de experimentos empleado, tomando en cuenta las condiciones de proceso y solución como variables que afectan en el diámetro de las fibras. ...	68
Figura 18. Imágenes obtenidas por microscopia óptica de fibras obtenidas por la técnica de electrohilado a partir de soluciones poliméricas de 9-12% (p/v) empleando un diseño de experimentos para optimizar las variables experimentales del proceso.....	71
Figura 19. Micrografías de Nanofibras obtenidas a partir de soluciones de CAP a diferente concentración de polímero (9-12%) y mezcla de disolventes (Acetona:Etanol(1:1)(v/v) o Acetona:Metanol(1:1)(v/v)). Las condiciones de proceso fueron establecidas aplicando un voltaje de 15 kV, una velocidad de flujo de 10 μ L/min y una distancia de 15 cm.....	74

Figura 20. Comportamiento de diámetro de fibras poliméricas obtenidas a partir de soluciones poliméricas de CAP empleando como disolvente la mezcla Acetona:Etanol y Acetona:Metanol en una proporción 1:1 (v/v).....	76
Figura 21. Influencia de la incorporación del principio activo sobre las propiedades de la solución polimérica, (a) Conductividad, (b) Tensión superficial y (c) Viscosidad.....	78
Figura 22. Micrografías de Nanofibras de CAP al 11% empleando dos diferentes mezclas de disolventes y diferente cantidad de principio activo.....	80
Figura 23. Micrografías de Nanofibras de CAP al 12% empleando dos diferentes mezclas de disolventes y diferente cantidad de principio activo.....	81
Figura 24. Eficiencia del proceso de electrohilado empleando diferentes soluciones poliméricas a diferente concentración de polímero y principio activo. .	82
Figura 25. Termogramas obtenidos a partir de NFs cargadas con diferente cantidad de principio activo a) Clorhexidina base(CHX); b) Ftalato Acetato de Celulosa (CAP); c) NFs cargadas con 10mg de CHX; d) NFs cargadas con 50mg de CHX.....	83
Figura 26. Perfil de liberación de clorhexidina a partir de Nanofibras poliméricas de CAP que emplean como disolvente la mezcla Acetona:Etanol (1:1)(v/v) al 12%.(n=3).....	85
Figura 27. Perfil de liberación de clorhexidina a partir de Nanofibras poliméricas de CAP que emplean como disolvente la mezcla Acetona:Metanol (1:1)(v/v) al 11%.(n=3).....	85
Figura 28. Espectros de absorción de aceite de eugenol disuelto en etanol y metanol	90
Figura 29. Espectros de absorción de CHX disuelta en etanol y metanol.	90
Figura 30. Espectros de absorción de la mezcla CHX-eugenol en etanol y metanol.	90
Figura 31. Comparación de espectros de absorción de CHX, eugenol y mezcla utilizando como disolvente etanol.....	91
Figura 32. Comparación de espectros de absorción de CHX, eugenol y mezcla utilizando como disolvente metanol.....	91
Figura 33. Curva de calibración para el complejo colorido PVAL-I ₂	92
Figura 34. Cromatogramas de solución estándar de CHX.	94
Figura 35. Cromatogramas de solución estándar de eugenol.	94
Figura 36. Cromatogramas obtenidos a partir de una solución estándar de; (a) CHX, (b) solución estándar de eugenol, (c) mezcla de CHX-eugenol y (d) muestra problema, empleando una fase móvil Acetonitrilo: Solución amortiguadora de acetatos pH 3.3 al 0.5% TEA (35:65)(v/v).	94
Figura 37. Cromatogramas obtenidos a partir de una solución estándar de; (a) CHX, (b) solución estándar de eugenol, (c) mezcla de CHX-eugenol y (d) muestra problema, empleando una fase móvil Acetonitrilo: Solución amortiguadora de acetatos pH 3.3 al 0.5% TEA: Agua (35:65:10)(v/v/v).	95
Figura 38. Cromatogramas obtenidos a partir de una solución estándar de; (a) CHX, (b) solución estándar de eugenol, (c) mezcla de CHX-eugenol, empleando una fase móvil Acetonitrilo: Solución amortiguadora de acetatos pH 3.3 al 0.5% TEA: Metanol (35:65:10)(v/v/v).....	95
Figura 39. Distribución de tamaño de partícula de Nanocápsulas con 10 mg de CHX.....	101

Figura 40. Distribución de tamaño de partícula de Nanocápsulas con 20 mg de CHX.....	101
Figura 41. Distribución de tamaño de partícula de Nanocápsulas con 30 mg de CHX.....	102
Figura 42. Potencial Z de Nanocápsulas con 10 mg de CHX.....	102
Figura 43. Potencial Z de Nanocápsulas con 20 mg de CHX.....	102
Figura 44. Potencial Z de Nanocápsulas con 30 mg de CHX.....	102
Figura 45. (a) Micrografías de NCs-CAP-CHX; (b) NPs-CAP-CHX; (c, d) Superficie y cuerpo de hilos dentales no encerados (e, g, i) NCs-CAP-CHX adsorbidas en la superficie de hilos dentales y (f, h, j) NPs-CAP-CHX adsorbidas en la superficie de hilos dentales.	106
Figura 46. Termogramas obtenidos a partir de los componentes individuales de la formulación de Nanocápsulas; (a) PVAL; (b) CAP; (c) CHX; (d) Aceite de eugenol; (e) Mezcla física y (f) NCs-CAP-CHX.....	108
Figura 47. Perfil de liberación de CHX a partir de Nanopartículas.	109
Figura 48. Perfil de liberación de CHX a partir de Nanocápsulas.....	110
Figura 49. Porcentaje de reducción de la placa dentobacteriana tras el uso de Nanocápsulas cargadas con CHX o un enjuague oral conteniendo CHX al 0.2%.	115

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Solubilidad de polímero CAP a diferentes concentraciones empleando diferentes mezclas de disolventes.....	33
Tabla 2. Formulaciones propuestas para preparar NCs y NPs de CAP cargadas con CHX.....	44
Tabla 3. Solubilidad de CAP en diferentes mezclas de disolventes.....	53
Tabla 4. Viscosidad de soluciones poliméricas a diferentes concentraciones empleando diferentes mezclas de disolventes.....	53
Tabla 5. Conductividad de soluciones poliméricas a diferente concentración empleando diferentes mezclas de disolventes.....	53
Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas de los disolventes empleados en la preparación de soluciones poliméricas.....	54
Tabla 7. Parámetros de las soluciones poliméricas empleadas para la elaboración de fibras por la técnica de electrohilado.....	67
Tabla 8. Diámetro promedio de NFs obtenidas empleando soluciones poliméricas a diferente concentración de polímero y dos diferentes mezclas de disolventes. .	76
Tabla 9. Diámetro de NFs obtenidas a partir de soluciones al 11 y 12%.....	80
Tabla 10. Eficiencia del proceso y eficiencia de entrapamiento de NFs obtenidas a partir de soluciones poliméricas de CAP.....	82
Tabla 11. Coeficientes de correlación y constantes de los modelos de cinética de liberación a partir de NFs, ecuación de Korsmeyer-Peppas y Higuchi.....	86
Tabla 12. Resultados de la prueba cualitativa de solubilidad en diferentes disolventes de los diferentes materiales empleados en la formulación de NCs y NPs.....	89
Tabla 13. Porcentaje de PVAL residual en NCs.....	93
Tabla 14. Parámetros obtenidos de la validación del método analítico para la cuantificación de CHX por HPLC.....	96
Tabla 15. Resultados de pruebas de caracterización fisicoquímica de NPs control, NCs cargadas con diferente cantidad de CHX y NPs cargadas con CHX.....	99
Tabla 16. Estabilización de suspensiones en base a su potencial Z.....	100
Tabla 17. Coeficientes de correlación y constantes de los modelos de cinética de liberación a partir de NPs y NCs, ecuación de Korsmeyer-Peppas y Higuchi.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS

EPD = Enfermedad periodontal
PDB = Placa dentobacteriana
NFs = Nanofibras
NPs = Nanopartículas
NCs = Nanocápsulas
CHX = Clorhexidina base
FCG = Líquido crevicular gingival
% = porcentaje por ciento
rpm = revoluciones por minuto
CAP = Ftalato de Acetato de Celulosa
CA = Acetato de celulosa
CAB = Butirato de Acetato de Celulosa
CAT= Trimelito de Acetato de Celulosa
HPMCP= Ftalato de Hidroxipropilmetilcelulosa
pH = Potencial de hidrogeno
MEC = Metiletilcetona
IP = Índice de polidispersión
di = Diámetro interno
EP = Eficiencia de proceso
EE = Eficiencia de atrapamiento
KV = Kilovoltio
HPLC = Cromatografía de líquidos de alta resolución
NFs-CAP-CHX = Nanofibras de ftalato de acetato de celulosa con clorhexidina
NCs-CAP-CHX = Nanocápsulas de ftalato de acetato de celulosa con clorhexidina
NPs-CAP-CHX = Nanopartículas de ftalato de acetato de celulosa con clorhexidina
NaOH = Hidróxido de sodio
DSC = Calorimetría Diferencial de Barrido
 λ = Longitud de onda
PVAL = Polivinilalcohol
SBF = Solución amortiguadora de fosfatos

ABSTRACT

Technological innovations in the field of Dentistry currently relate Nano-science to possible solutions to a variety of oral health problems. Nano-science rely on nanotechnology to obtain systems that bring benefits to the clinical area of dentistry. It is then that nano-dentistry will make it possible to maintain oral health using nano-biomaterials. These compounds may have a potential use in diagnostic, prevention or treatment of oral diseases from caries, periodontal problems, malocclusion, lesions of soft tissues and even to enhance aesthetics or the mechanical, biological and optic properties of dental materials of ceramic, metallic, organic or hybrid nature. Currently, nanomaterials are materials with structurally basic units, particles, fibers and other components preferably smaller than 100 nm in at least one dimension. These nanomaterials include nanoparticles, nanocrystals, nanofibers, nanorods, and nanofilms. Various nanomaterials with excellent properties have been extensively researched within the biomedical area.

The objective of this work is the development of modified release systems of drugs with a potential value in pharmaceutical applications and especially in the dental area in the treatment of periodontal disease, generating nanometric-sized systems with the ability to control the release of active ingredients. under certain physiological conditions. For the development of these systems two techniques were used, the electrospinning with which it is possible to obtain nanofibers and the emulsion-diffusion technique to obtain nanoparticles or nanocapsules. These systems were loaded with an antimicrobial drug, as the chlorhexidine base. In the case of the nanocapsules an essential oil (Eugenol) was used, in addition to observing whether is possible to enhance the antimicrobial effect of the drug. The systems were characterized physicochemically determining their morphology and size by scanning electron microscopy in both cases, also the size and polydispersity index of the nanoparticles and nanocapsules were determined by the light scattering method, for both methods the Process Efficiency to obtain the nanosystems were determined, in addition to determining the Entrapment Efficiency, high-performance liquid chromatography (HPLC), to quantify the amount of active ingredient present in the nanosystems was calculated, the thermal behaviour of the nanosystems was monitored by differential scanning calorimetry. The release profile of the active

ingredient model was obtained using an in vitro simulation model of the conditions of the periodontal pocket. To evaluate the effectiveness of the nanosystems, panel tests were performed on volunteers with moderate-severe periodontal disease, determining the percentage of reduction of the dentobacterial plaque after specifically applying a formulation. Concluding that the nanosystems obtained, in particular, the nanocapsules, due to their characteristics, can be an alternative in the treatment of periodontal disease by demonstrating a significant effect on the decrease of the dentobacterial plaque, in addition to being easy to handle. The release profile of the active ingredient model was obtained using an in vitro simulation model of the conditions of the periodontal pocket.

RESUMEN

Las innovaciones tecnológicas en el área Odontológica procuran desde las nanociencias dar solución a una amplia diversidad de problemas en el cuidado de la salud bucal. Las nanociencias se apoyan de la nanotecnología para obtener sistemas que traigan consigo beneficios al área clínica de la odontología. La nano-odontología hará posible el mantenimiento de la salud bucal empleando nano-biomateriales. Estos pequeños compuestos tienen potenciales aplicaciones en el diagnóstico, prevención y tratamiento de patologías orales desde caries, enfermedad periodontal, maloclusiones, lesiones en tejidos blandos y hasta posibles indicaciones para mejorar la estética dental y el comportamiento mecánico, biológico y óptico de materiales restauradores. Actualmente los nanomateriales, son materiales con unidades estructuralmente básicas, partículas, fibras y otros componentes preferentemente menores a 100 nm en al menos una dimensión. Estos nanomateriales incluyen nanopartículas, nanocristales, nanofibras, nanoredes y nanopelículas. Diversos nanomateriales con excelentes propiedades han sido extensamente investigados dentro del área biomédica.

El presente trabajo está dirigido al desarrollo de sistemas de liberación modificada de fármacos novedosos, con un valor potencial en aplicaciones farmacéuticas y en especial en el área odontológica en el tratamiento de la enfermedad periodontal (EPD), generando sistemas de tamaño nanométrico con capacidad de controlar la liberación de principios activos bajo ciertas condiciones fisiológicas. Para el desarrollo de dichos sistemas se emplearon dos técnicas, el electrohilado con el que es posible obtener nanofibras (NFs) y la técnica emulsificación-difusión para obtener nanopartículas (NPs) o nanocápsulas (NCs). Dichos sistemas fueron cargados con un principio activo antimicrobiano como lo es la Clorhexidina base (CHX), para el caso de NCs se utilizó adicionalmente un aceite esencial (Eugenol) con la finalidad de observar si es posible potencializar el efecto antimicrobiano del principio activo. Los sistemas fueron caracterizados fisicoquímicamente mediante la determinación de su morfología y tamaño, por microscopia electrónica de barrido en ambos casos, adicionalmente el tamaño e índice de polidispersión (IP) de las NPs y NCs fue determinado mediante el método de dispersión de luz, para ambos métodos empleados, la eficiencia del proceso (EP) para la obtención de los nanosistemas fue

determinada, además de realizarse la determinación de la eficiencia de entrapamiento (EE) empleando la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), para cuantificar la cantidad de principio activo presente en los nanosistemas, el comportamiento térmico de los nanosistemas se monitoreo por calorimetría diferencial de barrido (DSC). El perfil de liberación del principio activo modelo se obtuvo mediante un modelo de simulación *in-vitro* de las condiciones de la bolsa periodontal. Para evaluar la efectividad de los nanosistemas, se realizaron pruebas de panel en voluntarios con EPD en estadio moderada-severa, determinando el porcentaje de reducción de placa dentobacteriana (PDB) después de aplicar específicamente una formulación. Concluyendo que los nanosistemas obtenidos y en particular NCs, debido a sus características, pueden ser una alternativa en el tratamiento de la EPD al demostrar un efecto significativo en la disminución de la PDB, además de ser de fácil manejo.

INTRODUCCIÓN

La nanotecnología aplicada a la salud ha supuesto un gran avance en el ámbito de la medicina. Gracias a las técnicas que operan en escala nanométrica es posible aplicar terapias menos invasivas, lograr una prevención más temprana y curaciones más rápidas. Es de esperarse que la nanotecnología traiga consigo beneficios al área clínica de la odontología al emplear nanomateriales (1). La nanotecnología ha sido aplicada en odontología desde 1970 con el comienzo de la era de los *microfills*. La nano-odontología ha aportado nuevas tecnologías en el desarrollo de materiales innovadores con partículas en rangos nanométricos, dichos materiales pueden ser empleados para el mantenimiento de la salud bucal (2,3). Actualmente, los nanomateriales, son materiales con unidades estructurales básicas, partículas, fibras u otros componentes menores a 100 nm en al menos una dimensión y que han provocado se ponga atención para mejorar la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Los nanomateriales incluyen tanto nanopartículas, nanocristales, nanofibras, nanoredes y nanopelículas (4). Al disminuir el tamaño de un material a escala nanométrica, se aumenta dramáticamente el área superficial, se modifica su reactividad química y actividad biológica, por lo tanto, su relación área-volumen-superficie podría conducir a mejorar sus propiedades fisicoquímicas. Por lo que los nanomateriales con excelentes propiedades han sido extensamente investigados dentro del área biomédica (5). Polímeros no biodegradables, así como biodegradables han sido utilizados para la preparación de micro- y nanopartículas administradas por diferentes vías entre las que se encuentran la nasal, pulmonar, oral, o las parenterales. Estos materiales poliméricos pueden ser sintéticos o naturales o sustancias naturales modificadas (6–8).

El electrohilado (*electrospinning*) es una tecnología emergente la cual emplea altos campos eléctricos para producir fibras, cápsulas, partículas y otras estructuras con diámetros desde algunos nanómetros hasta unas pocas micras, las cuales pueden ser obtenidas a partir de polímeros naturales o sintéticos. Las fibras obtenidas debido a su tamaño considerado como ultrafino ofrece a dichos sistemas una característica única en cuanto a su elevada relación superficie-volumen que permite obtener sistemas matriciales que dan pie a explorar la creación de nuevos materiales funcionales con propiedades únicas, de relevante interés en diferentes áreas entre

las cuales se encuentran la biomédica y farmacéutica. A lo largo de los últimos 20 años, pero más significativamente en el último lustro varios grupos de investigación han hecho importantes esfuerzos al desarrollo del electrohilado. Esta tendencia podría atribuirse al interés actual por el aprovechamiento de las propiedades de las microfibras y nanofibras que pueden obtenerse por este proceso. Entre las ventajas de esta técnica se puede mencionar que es un proceso que se lleva a cabo en condiciones ambientales lo que permite la encapsulación de agentes activos térmicamente inestables, además de ser escalable a nivel industrial, de bajo costo, sencilla y versátil, de tal forma que se pueden establecer mecanismos de transferencia tecnológica (9,10). La transformación de una disolución polimérica en un conjunto de NFs mediante electro-hilado es un proceso gobernado por una amplia variedad de parámetros (11). Durante este proceso, la concentración del polímero desempeña el papel principal para establecer las condiciones óptimas del proceso (12). Dado que el electrohilado es un proceso continuo, la longitud de las fibras recogidas puede ser muy elevada, incluso kilométrica. Tales fibras pueden, por la propia inestabilidad asociada al proceso, ser ensambladas desordenadamente en forma de recubrimientos tridimensionales. Estos son excelentes candidatos para aplicaciones multisectoriales como la filtración, liberación de fármacos, modificadores de la textura de alimentos, encapsulación de aditivos alimentarios, elementos de envase activo y bioactivo, membranas de separación, refuerzo de materiales compuestos o biomateriales para la ingeniería de tejidos (13,14).

El término nanopartículas es usado como un nombre común para describir tanto a las nanoesferas y las nanocápsulas, se diferencian en su morfología y arquitectura. Las NPs son formadas por una matriz polimérica densa, mientras que las NCs están compuestas por un núcleo oleoso rodeado por una membrana polimérica. Las NPs muestran grandes ventajas en comparación con otros materiales incluyendo los sistemas coloides utilizados en el campo odontológico, entre las cuales se incluyen; i) buena estabilidad en fluidos biológicos y durante su almacenamiento, ii) fácil preparación y existen muchas técnicas para elaborarlas, iii) fáciles de escalar a nivel industrial, iv) buena reproducibilidad entre lotes, v) pueden tener liberación controlada del principio activo. Las NPs también poseen la característica de poder encapsular y entregar la sustancia activa en el órgano blanco o sitio específico (por ejemplo, saco dentogingival o bolsa periodontal) y también son conocidas como

sistemas vectoriales o acarreadores. En general, para la preparación de las NPs es preferible partir de materiales preformados, especialmente cuando se trata de polímeros. Los métodos de preparación de NPs a partir de polímeros preformados con un alto potencial en odontología pueden ser clasificados dentro de cinco categorías: i) emulsificación- evaporación, ii) *salting-out* iii), desplazamiento de disolvente, iv) emulsificación-difusión, y v) *spray-drying* (15). Las NPs ofrecen grandes ventajas; como, la capacidad de penetrar en áreas extracelulares e intracelulares que pueden ser inaccesibles para otros sistemas de liberación, esto puede ser posible debido a su diminuto tamaño, inclusive pueden alcanzar áreas como la bolsa periodontal y tejidos inferiores (6,16–18). Estudios de microscopía confocal llevados a cabo por Ganem-Quintanar (19), han demostrado que las NPs biodegradables, cuando son aplicadas en el surco gingival porcino son capaces de penetrar hasta el epitelio junctional. De igual forma, las NPs en la bolsa periodontal pueden ser sistemas de entrega de fármacos que reducirían la frecuencia de administración, mejorarían la eficiencia y acumulación del agente activo en el sitio blanco, manteniendo una velocidad de liberación de fármaco efectiva (2,6,8).

Las NPs han sido propuestas como sistemas acarreadores de fármacos para tratamiento de caries o restauración, remineralización de dientes, hipersensibilidad en los dientes, vacunas, control de PDB, infecciones, anestesia local e infecciones periodontales. Se ha propuesto que las NPs pueden entregar el fármaco selectivamente en sitios específicos o células.

La EPD es un término adoptado en la que se incluyen varias condiciones patológicas que se caracterizan por la degeneración e inflamación del tejido que rodea y da soporte a los dientes: el tejido gingival (la encía), el ligamento periodontal, el hueso alveolar y el cemento dental pueden ser afectados (6,20). Tan pronto como se presenta la gingivitis junto con la formación de la bolsa periodontal, el principal objetivo terapéutico debe ser controlar y reducir los factores etiológicos para disminuir o eliminar la inflamación y controlar la interacción entre la placa bacteriana y el hospedero (6,7). Tales estrategias deben controlar la formación de la PDB sin afectar el equilibrio biológico dentro de la cavidad oral. Sin embargo, los periodos de exposición reales a agentes antimicrobianos durante el cepillado de dientes y enjuague bucal pueden ser muy cortos, aproximadamente 30 s en lugar de 2 min que es lo recomendado (21).

Muchos materiales han sido propuestos para aplicarlos en odontología mostrando grandes ventajas en comparación con las formulaciones convencionales. Varios tienen potenciales aplicaciones, pero se requiere de mucha más investigación para consolidar su efecto terapéutico real. Además, hasta hoy, no hay suficiente información disponible para generalizar el uso de NPs en el campo odontológico por lo que se sigue el desarrollo de un plan para ampliar el rango de aplicaciones. La investigación sobre la nanotecnología está ganando terreno introduciéndose en el campo de la odontología y muchos de estas incógnitas podrían resolverse en poco tiempo, con lo que se podría dar la consolidación de estos productos y llevarlos al mercado.

MARCO TEÓRICO

La nanotecnología es el área del conocimiento que trata acerca del saber y el control de la materia en dimensiones cercanas al intervalo de 1 a 1000 nanómetros. En esta escala la materia o materiales muestran características y aplicaciones nuevas a las ya tradicionales o conocidas. La nanotecnología comprende la representación gráfica, la medición, el modelado y la manipulación de la materia en una escala nanométrica (22).

La nanotecnología es un campo emergente con un gran potencial para generar herramientas clínicas tecnológicamente avanzadas y dispositivos para el cuidado de la salud oral. Es de esperarse que la nanotecnología traiga consigo beneficios al área clínica de la odontología (1). La nanotecnología ha sido aplicada en odontología desde 1970 con el comienzo de la era de los *microfills*. La Nano-odontología hará posible el mantenimiento de la salud bucal empleando nano-biomateriales (2,3). Actualmente, los nanomateriales, son materiales con unidades estructurales básicas, granos, partículas, fibras u otros componentes menores a 100 nm en al menos una dimensión y que han provocado se ponga atención para mejorar la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Los nanomateriales incluyen tanto nanopartículas, nanocristales, nanofibras, nanoredes y nanopelículas (4). Al disminuir el tamaño de un material a escala nanométricas, se aumenta dramáticamente el área superficial, se modifica su reactividad química y actividad biológica, por lo tanto, la relación área-volumen-superficie podría conducir a mejorar sus propiedades fisicoquímicas (mecánicas, eléctricas, ópticas, catalíticas y magnéticas). Por lo que los nanomateriales con excelentes propiedades han sido extensamente investigados dentro del área biomédica (5).

1. *Electrospinning* (Técnica de Electrohilado)

En las últimas décadas se ha incrementado de manera notable el interés de las aplicaciones de la nanotecnología en diversas áreas, entre las cuales se encuentran, la textil, electrónica, materiales, alimenticia, medicina y farmacéutica. La nanotecnología ha sido ampliamente aceptada como la aplicación de la nanociencia, la cual desarrolla estructuras donde específicamente, al menos una dimensión se

encuentra aproximadamente entre 1 y 100 nanómetros (23). Referido específicamente al ámbito de las fibras, supone que aquellas fibras con diámetros por debajo o próximos a los 1000 nm sean aceptadas como NFs (24).

En el desarrollo de estructuras ultrafinas poliméricas, una de las tecnologías que está despertando un enorme interés es la basada en la aplicación de fuertes campos eléctricos, conocida como “electrohilado” (*electrospinning*). Aunque la generación electrostática de materiales fue patentada en Estados Unidos en 1902, la obtención práctica a escala nanométrica se ha producido recientemente con la popularización de la propia nanotecnología (12).

A lo largo de los últimos 20 años, varios grupos de investigación han hecho importantes esfuerzos al desarrollo del electrohilado. Esta tendencia podría atribuirse al interés actual en las microfibras y nanofibras que se pueden obtener por este proceso. Entre las ventajas de esta técnica se puede mencionar que es un proceso que se lleva a cabo en condiciones ambientales lo que permite la encapsulación de agentes activos térmicamente inestables, es escalable a nivel industrial, de bajo costo, sencilla y versátil, de tal forma que se pueden establecer mecanismos de transferencia tecnológica (9,10). Los investigadores han desarrollado muchos tipos de materiales a nanoescala con diferentes propiedades. El fenómeno electrohidrodinámico llamado electrohilado surgió en los campos de la nanotecnología y la ciencia de los materiales durante las últimas dos décadas y hace posible producir NFs de polímeros a nanoescala rentables.

En particular, el electrohilado emplea altas diferencias de potencial para producir un campo eléctrico fuerte, que es aplicado entre dos polos opuestos, conformados por una aguja o sistema de inyección y una placa metálica o colector, (el cual está a potencial 0), donde se depositan las fibras nanométricas formando un tejido con textura, color y densidad características (Figura 1). La solución del polímero previamente preparada, se carga en una jeringa de inyección que se conecta a una aguja. Una bomba de infusión o perfusión unida al émbolo de la jeringa genera una presión y un flujo constante a través de la aguja. Por el efecto de la polarización y las cargas originadas por el campo eléctrico, la solución es arrojada en forma de chorros o “jets” hacia una superficie conductora conectada a tierra (por lo general una pantalla metálica) a una distancia entre 5 y 30 cm del cono o aguja. Las cargas en la superficie de la solución aumentan al incrementar el campo eléctrico hasta un

valor umbral en el cual se desestabiliza su forma, que pasa de parcialmente esférica a cónica y a la cual se le denomina cono de Taylor. Existen dos fuerzas que ejercen un papel antagonista, por una parte, la repulsión electrostática entre las cargas de la superficie generadas por el alto voltaje aplicado, que tienden a romper las gotas de la solución polimérica a la salida del proceso y, por otra, la de atracción producidas por la propia tensión superficial. Alcanzando un voltaje crítico, la generación del chorro o *jet* se produce cuando la fuerza de repulsión supera a la tensión superficial. Durante la creación del *jet*, el disolvente gradualmente se evapora y el producto obtenido se deposita en forma de manta de fibra no-tejida compuesta de NFs con diámetros de unos pocos nanómetros a unas pocas micras. El proceso de electrohilado puede resultar en fibras, gotas (electroatomizado) o no tener lugar. De hecho, se le puede considerar una variación del proceso conocido como “electroatomizado” (*electrospraying*). En algunas condiciones y para algunos polímeros el proceso no es posible y las gotas de la solución caen de la aguja sin haber sido cargadas. En otros casos se produce una mezcla de electroatomizado y electrohilado (25,26).

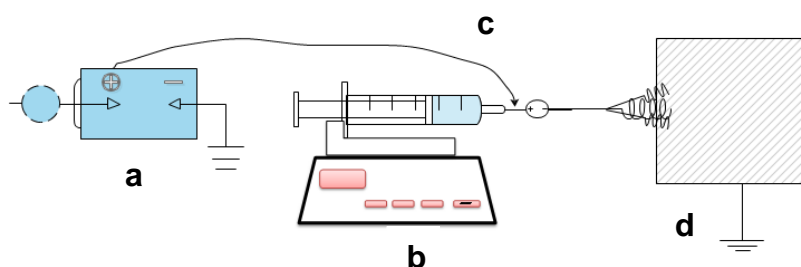


Figura 1. Componentes básicos del equipo de electrohilado; a) Fuente de alto voltaje, b) Bomba de infusión, c) Jeringa con aguja, d) Plato colector fijo.

La transformación de una solución polimérica en un conjunto de NFs mediante electrohilado es un proceso gobernado por una amplia variedad de parámetros (11), los cuales incluyen, i) las propiedades de la solución, tales como tensión superficial, conductividad y viscosidad, que son determinadas por el peso molecular del polímero y su concentración en la solución polimérica, así como la volatilidad de los disolventes; ii) parámetros del proceso o experimentales, tales como voltaje aplicado, velocidad de flujo, distancia aguja-colector, diseño de la aguja, posición del

colector y su geometría; iii) parámetros ambientales, tales como temperatura y humedad (Figura 2). Un proceso de electrohilado optimizado es aquel en el cual estos parámetros permanecen constantes y producen NFs consistentes en sus propiedades fisicoquímicas (27–29).

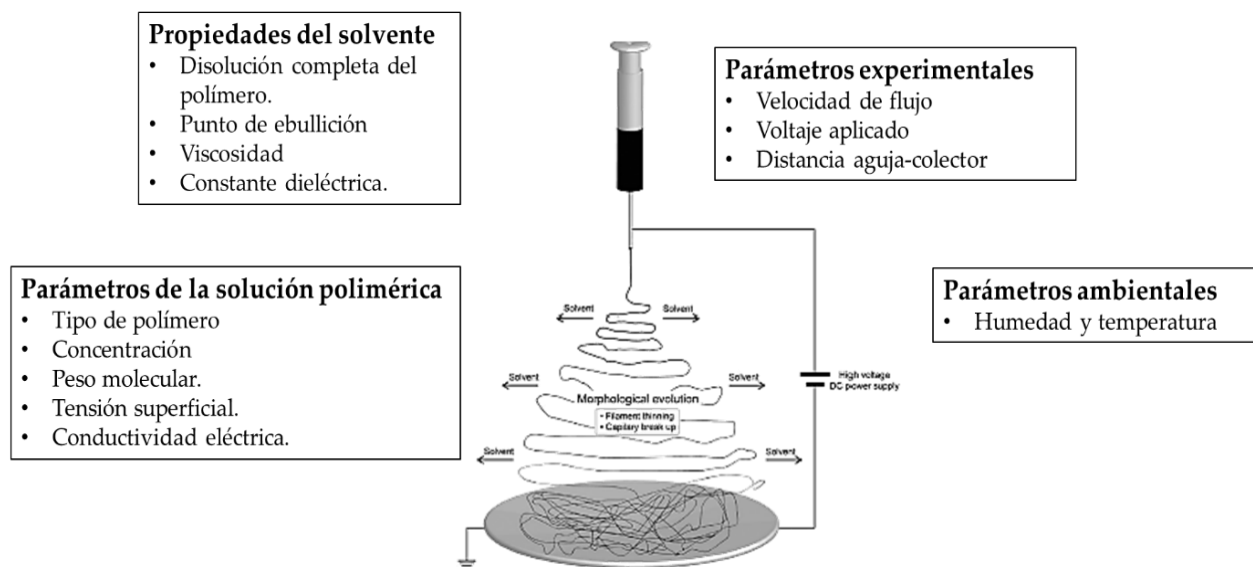


Figura 2. Parámetros que influyen en el proceso de electrohilado.

Mientras un polímero pueda ser electrohilado en NFs, los objetivos ideales serían: 1) que el diámetro de las fibras sea consistente y controlable, 2) la superficie de la fibra debe estar libre de defectos o con defectos controlables y 3) NFs continuas sean colectadas. Sin embargo, las investigaciones hasta ahora han demostrado que no hay objetivos fácilmente alcanzables (30).

Durante este proceso, la concentración del polímero desempeña el papel principal para establecer las condiciones óptimas del proceso. No se trata sólo de la cantidad de masa de polímero introducida en la solución sino también de las interacciones polímero-polímero y polímero-disolvente. Son de hecho el disolvente y el peso molecular los que definen las propiedades reológicas y eléctricas de la solución polimérica. Sin embargo, todavía no existe un desarrollo de expresiones matemáticas que interrelacionen todos los parámetros implicados en el proceso (12).

1.1 Parámetros considerados durante el proceso de electrohilado.

1.1.1 Parámetros relacionados a la solución polimérica.

Se ha demostrado que los parámetros de la solución influyen notablemente en la obtención de fibras y en la morfología de las mismas. Se describen a continuación algunos de los parámetros más importantes a considerar (11,31–33).

Disolventes: El disolvente debe permitir la disolución completa del polímero. Los disolventes utilizados influyen y determinan varios aspectos del proceso de electrohilado. En primer lugar, afectan la conformación de las cadenas poliméricas en solución, e influyen en la facilidad del transporte de la carga del microchorro. Tanto el momento dipolar como la conductividad de la solución determinan la obtención o no de fibras electrohiladas, así como también su tamaño. A mayor polaridad del disolvente se obtienen fibras de menor diámetro. La velocidad de solidificación del microchorro también está determinada por el disolvente o mezclas de disolventes utilizados. Cuanto menor es la temperatura de ebullición del solvente mayor será la velocidad de solidificación del microchorro. No obstante, en ocasiones la solidificación puede ser muy rápida produciendo una obstrucción en la boquilla. Por otra parte, cuando la temperatura de ebullición es muy elevada, las fibras alcanzan el colector con una cantidad considerable de disolvente que produce una película por aglomeramiento. El empleo de mezclas de disolventes de bajo y alto punto de ebullición permite balancear esta situación. Por lo tanto, el punto de ebullición del disolvente debe permitir que se evapore fácilmente pero no demasiado rápido para conservar la integridad de la fibra al llegar al plato colector.

La constante dieléctrica. La constante dieléctrica de una solución es una medida de la capacidad para mantener cargas eléctricas en la solución. Cuanto mayor es la constante dieléctrica de la solución, con más facilidad se obtendrán fibras uniformes y de menor diámetro medio. La constante dieléctrica de una solución se puede variar reemplazando el disolvente o una fracción por uno con mayor o menor constante dieléctrica. Un disolvente con una constante dieléctrica alta puede mejorar la conductividad al facilitar la disolución de las cadenas poliméricas cargadas lo que reduciría la necesidad de emplear altos voltajes eléctricos.

Concentración de polímero. Se requiere de una concentración crítica para que los entrecruzamientos físicos de las cadenas poliméricas permitan la formación de fibras bajo la acción del campo eléctrico aplicado. Si la concentración de polímero se encuentra debajo de una concentración crítica, los entrecruzamientos físicos entre las cadenas poliméricas no alcanzan a contrarrestar estas fuerzas y el microchorro se rompe, obteniendo un pulverizado de gotas. Un incremento de la concentración puede formar una morfología de gotas conectadas por fibras. La concentración crítica para la cual se obtienen fibras uniformes varía con cada sistema analizado, y depende del peso molecular del polímero (a mayor peso molecular del mismo polímero, menor concentración para igual sistema de disolventes), y de la viscosidad de la solución entre otros. Por otro lado, una vez alcanzada la concentración crítica para la obtención de NFs, su incremento produce un aumento en el diámetro medio de las fibras.

Viscosidad. La viscosidad de la solución polimérica está relacionada con el peso molecular del polímero disuelto y el disolvente. A mayor peso molecular, mayor es la viscosidad de la solución. La viscosidad actúa contrarrestando las fuerzas de estiramiento producidas por la repulsión electrostática del microchorro cargado. Aumentar la viscosidad ayuda a obtener un microchorro estable y por lo tanto fibras libres de gotas. La viscosidad de la solución se puede aumentar incrementando el peso molecular del polímero, la concentración de la solución polimérica, o incluso también con el agregado de polielectrolitos en pequeñas cantidades que permiten incrementar la viscosidad sin modificar la concentración. Si bien la viscosidad de la solución influye significativamente en generar fibras lisas, no necesariamente determina la concentración crítica a la cual se obtienen fibras por electrohilado. Cuando la viscosidad de la solución es muy baja, el fenómeno de “electroatomizado” puede ocurrir y se forman partículas en lugar de fibras. Durante el estiramiento de la solución, es el entrelazamiento de las cadenas moleculares que impide que el flujo sea discontinuo. Por lo tanto, factores que afectan la viscosidad de la solución afectarán el proceso de electrohilado y la morfología resultante.

Peso molecular del polímero. La longitud de la cadena se relaciona con el peso molecular y la longitud del polímero determinará el grado de entrecruzamiento de la cadena polimérica en el disolvente.

Tensión superficial. La tensión superficial de la solución es la fuerza principal a vencer para lograr el estiramiento del microchorro y la producción de NFs. Cuanto mayor es la tensión superficial, mayor cantidad de cargas superficiales y tensión aplicada se requerirá en el proceso. Dado que el disolvente determina la tensión superficial de la solución, sería ideal emplear un disolvente con baja tensión superficial. Sin embargo, la concentración y la naturaleza química del polímero también determinan la tensión superficial. En general, el aumentar la concentración polimérica de la solución disminuye la tensión superficial. Otra forma de disminuir la tensión superficial, es con el agregado de surfactantes a la solución.

Entonces, las cargas de la solución polimérica deben ser lo suficientemente altas para sobrepasar la tensión superficial de la misma. Una elevada tensión superficial da como resultado la formación de partículas en lugar de fibras.

Conductividad. La conductividad de la solución polimérica es fundamental en la producción de fibras por electrohilado, dado que influye en la repulsión electrostática de las cargas superficiales presentes en la solución. La conductividad puede incrementarse por agregado de partículas conductoras o iones a la solución o seleccionando un disolvente con mayor polaridad. El aumento de la conductividad de la solución también tiene un efecto en la disminución del diámetro medio de fibras. De esta manera, si la conductividad de la solución aumenta, más cargas pueden ser transportadas por el chorro y mayor estiramiento e inestabilidad tendrá el flujo, además de reducir la necesidad de emplear altos voltajes eléctricos.

1.1.2 Parámetros relacionados al proceso

Voltaje o Tensión aplicada. La tensión aplicada a la solución polimérica provoca su carga superficialmente, generando las fuerzas electrostáticas necesarias para vencer la tensión superficial. El efecto que tiene este parámetro en las NFs obtenidas depende fuertemente del sistema estudiado y de las otras variables en juego, como la concentración o la distancia boquilla-colector. Se ha demostrado que al aumentar la tensión aplicada se producen mayores cargas superficiales, lo que favorece el afinamiento del microchorro, resultando en fibras de menor diámetro. Sin embargo, una tensión alta aplicada también produce la evaporación más rápida del disolvente y en consecuencia puede suprimir etapas de estiramiento y disminución del diámetro

del microchorro, obteniéndose en algunos casos fibras de mayor tamaño del esperado. En algunos casos no se observa ninguna tendencia en el diámetro al variar la tensión aplicada. El efecto de un voltaje alto no sólo afecta la apariencia física de las fibras, sino también la cristalinidad de la fibra. El campo electrostático puede causar mayor orden de las moléculas del polímero durante el proceso y de esta manera inducir un estado cristalino en la fibra. Sin embargo, por encima de cierto voltaje, la cristalinidad es reducida.

Velocidad de flujo. Para que el proceso de electrohilado sea satisfactorio debe existir un equilibrio entre la velocidad a la cual la solución es dosificada y la velocidad de remoción por efecto del campo eléctrico aplicado. Por lo general, la velocidad de flujo es controlada mediante una bomba que infunde la solución a una velocidad constante determinada por el usuario. Si bien el mayor efecto de este parámetro es la obtención o no de un microchorro continuo, el aumento de la velocidad de flujo aumenta el diámetro medio de fibras, aunque se debe tener en cuenta que si la cantidad de disolvente en el colector es apreciable se perderá la estructura fibrosa por la fusión de las fibras. A un voltaje establecido corresponde una velocidad de flujo. Cuando la velocidad de flujo se incrementa, hay un aumento correspondiente del diámetro de la fibra. Bajos flujos de alimentación son más deseables ya que permiten que el disolvente tenga un mayor tiempo para su evaporación.

Distancia entre la aguja y el colector. Este parámetro influye directamente en el tiempo de vuelo del microchorro y en la fuerza del campo eléctrico aplicado. En consecuencia, variar este parámetro influye en el diámetro medio de las fibras obtenidas y en su morfología. Si la distancia es alta, hay un mayor tiempo para que el microchorro se elongue y estire, lo que produce membranas con tamaño medio de fibra menor. No obstante, el aumentar la distancia debilita la magnitud del campo eléctrico, resultando en menor estiramiento del microchorro y un mayor diámetro medio de fibra. Si la distancia es muy pequeña, la fuerza del campo eléctrico es mayor y se produce una mayor aceleración del microchorro, pero como el tiempo de vuelo también disminuye la evaporación del disolvente es pobre.

1.1.3 Parámetros relacionados al ambiente

Temperatura y Humedad Relativa.

Las principales condiciones ambientales que afectan el secado del microchorro son la temperatura y humedad del ambiente. En particular, la elevada humedad del ambiente genera NFs con poros superficiales. Esto se debe a que gotas de agua se depositan sobre la superficie del microchorro, debido a su enfriamiento por la evaporación del disolvente. Los poros se producen cuando el disolvente y el agua se evaporan. Altas humedades relativas (> 50%) pueden causar la formación de poros en la superficie de las fibras. Por último, si bien en la mayoría de los casos se realiza el proceso de electrohilado en atmósfera de aire, también puede realizarse en presencia de nitrógeno u otros gases que modifican el proceso de secado del microchorro y la pérdida de cargas eléctricas superficiales al ambiente.

2. Aplicaciones farmacéuticas de nanofibras obtenidas por electrohilado

El electrohilado es una técnica prometedora, cuyas aplicaciones están creciendo rápidamente. Es una técnica simple, versátil y relativamente barata para la síntesis de NFs. El electrohilado tiene la ventaja de poder sintetizar fibras continuas largas, fibras tridimensionales y ultrafinas con diámetros en el rango de unos pocos nanómetros a unas pocas micras (más típicamente de 100 nm a 1 micra) y longitudes de hasta kilómetros. Las NFs tienen propiedades extraordinarias y únicas, como su relación área-superficie la cual es un área de superficie extraordinariamente alta por unidad de masa, también porosidad muy alta, tamaño de poro ajustable, propiedades de superficie variables, alta permeabilidad, bajo peso, capacidad para retener cargas electrostáticas y rentabilidad, entre otros. Estas técnicas permiten la creación de nuevos tipos de NFs sofisticadas con microestructuras bien definidas, morfologías novedosas y/o nuevas funciones (34).

Las NFs son excelentes candidatos para aplicaciones multisectoriales como la filtración, liberación de fármacos, modificadores de la textura de alimentos, encapsulación de aditivos alimentarios, elementos de envase activo y bioactivo, membranas de separación, refuerzo de materiales compuestos o biomateriales para la ingeniería de tejidos (35).

Para la aplicación de NFs se pueden emplear para varias vías de administración, incluidas la oral, tópica, transdérmica y transmucosal. Además, las NFs pueden proteger un fármaco de la descomposición en el cuerpo antes de llegar al objetivo requerido (36). En los últimos años, un amplio desarrollo en las estrategias de carga de fármacos y funcionalización de NFs ha ocurrido (37).

Las NFs pueden ser sintetizadas ya sea a partir de polímeros naturales (quitosan, gelatina, colágeno, etil celulosa, seda) o sintéticos (ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), policarbonatos derivados de tirosina, poli ϵ -caprolactona (PCL), poliuretano (PU), polivinilpirrolidona (PVP), polivinilalcohol (PVAL) o sus combinaciones. Se ha encontrado que las NFs son muy eficientes para el suministro de fármacos tanto hidrofílicos como lipofílicos (38).

Materiales compuestos de NFs electrohiladas han sido explorados como sistemas de administración de fármacos, con resultados prometedores. La aplicación de hilados electrostáticos en el área farmacéutica ha resultado en formas de dosificación con propiedades de disolución controlables. Las estrategias para la administración de fármacos empleando NFs incluyen la introducción de antibióticos, anticancerígenos, proteínas bioactivas, DNA, RNA, factores de crecimiento y algunas líneas celulares (39).

Se han desarrollado varios sistemas de administración de fármacos con NFs electrohiladas para la administración local de agentes terapéuticos debido a la gran flexibilidad en la elección del material, la facilidad de encapsulación de diversos principios activos y la alta versatilidad en las formulaciones. Varios grupos de investigación han explorado el uso potencial de los materiales electrohilados para el suministro local de antibióticos. Su alta relación volumen-superficie, permite una carga de principios activos. Las NFs electrohiladas ofrecen una ventaja notable en el control de la velocidad de liberación del fármaco variando su composición, con materiales hidrofóbicos e hidrofílicos, microestructuras, con estructuras homogéneas, estructuras con núcleo central y estructura multicapa. Por lo tanto, la microestructura de una sola nanofibra y la macroestructura integral de andamios de NFs permitiría un fuerte control sobre los perfiles de liberación del fármaco (40).

Diferentes técnicas de incorporación del principio activo a los materiales electrohilados pueden ser empleados; los materiales pueden prepararse y luego recubrirse con el agente deseado o el agente puede incluirse con la solución de

polímero antes ser electrohilado. Las NFs adecuadas para aplicaciones biomédicas deben ser biocompatibles; sin embargo, la biodegradabilidad también es deseable. Debido a sus propiedades únicas, tales NFs se pueden usar como sistemas de administración de fármacos, andamios de tejido o ambos. La combinación de barreras mecánicas basadas en andamiajes biodegradables compuestos de tejidos nano-fibrosos y su capacidad para el suministro local de antibióticos, hace a las NFs sistemas deseables para aplicaciones en la prevención de infecciones.

Los fármacos se pueden incorporar a las fibras poliméricas mediante la mezcla principio activo-polímero-disolvente, adsorción en la superficie o formación de emulsión. Las NFs pueden modificarse aún más para administrar múltiples fármacos, por ejemplo, el recubrimiento de polímero multicapa permitirá la liberación sostenida del fármaco incorporado. Las principales vías de administración de las fibras electrohiladas son por vía oral y tópica, así como sistemas implantables. Recientemente, la aparición de NFs sensibles a los estímulos proporcionó una estrategia novedosa de administración y liberación controlada de fármacos en forma temporal y espacial. Una característica atractiva del electrohilado es su compatibilidad con muchos tipos de polímeros (41).

Es entonces que las NFs pueden responder a varios tipos de estímulos, incluidos el pH, la fuerza iónica, la temperatura, la electricidad luminosa, el campo magnético y pueden sufrir cambios físicos y/o químicos. En los últimos años, los antibióticos y los agentes antibacterianos han sido las moléculas farmacológicas más comunes encapsuladas, utilizando diferentes polímeros y sus combinaciones como vehículos (42).

3. Nanopartículas

El término nanopartículas es usado como un nombre común para describir tanto a las nanoesferas y las nanocápsulas que se diferencian en su morfología y arquitectura. Las NPs son formadas por una matriz polimérica densa, mientras que las NCs están compuestas por un núcleo oleoso rodeado por una membrana polimérica (Figura 3). Las NPs muestran grandes ventajas en comparación con otros materiales incluyendo los sistemas coloides utilizados en el campo odontológico, entre las cuales se incluyen; i) buena estabilidad en fluidos biológicos y durante su

almacenamiento, ii) fácil preparación y existen muchas técnicas para elaborarlas, iii) fáciles de escalar a nivel industrial, iv) buena reproducibilidad entre lotes, y v) pueden tener liberación controlada del principio activo. Las NPs también poseen la característica de poder encapsular y entregar la sustancia activa en el órgano blanco o sitio específico (por ejemplo, saco dentogingival) y también son conocidas como sistemas vectoriales o acarreadores. En general, para la preparación de las NPs es preferible partir de materiales preformados, especialmente cuando se trata de polímeros. La técnica de preparación consiste básicamente en dispersar una solución orgánica del polímero dentro de una solución acuosa, la cual contiene un estabilizante lo que resultará en la obtención de una nanoemulsión y que por remoción del exceso del disolvente formará las NPs. Los métodos de preparación de NPs con un alto potencial en odontología a partir de polímeros preformados pueden ser clasificados dentro de cinco categorías: i) emulsificación- evaporación, ii) *salting-out* iii), desplazamiento de disolvente, iv) emulsificación-difusión, y v) *spray-drying* (15). Uno de los principales problemas con estas técnicas es su baja eficiencia de encapsulación de materiales solubles en agua.

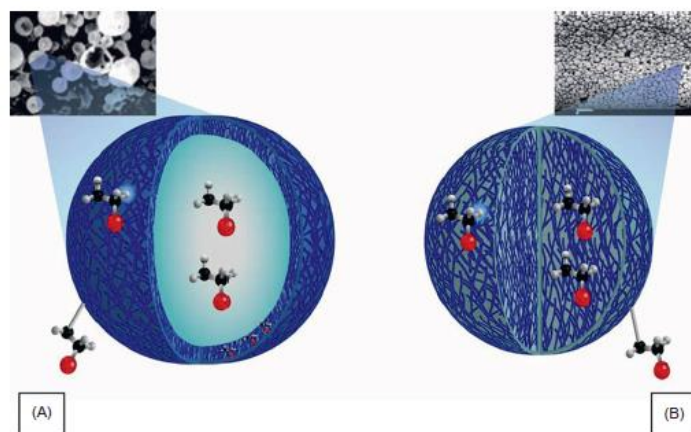


Figura 3. Representación esquemática y micrografías de Nanopartículas. (A) Nanocápsulas (B) Nanoesferas.

Las NPs de polímeros biodegradables se consideran importantes para los sistemas de liberación de fármacos ya que son muy estables, se adaptan fácilmente a los procesos industriales de fabricación y se pueden modificar en sus superficies para modular sus propiedades. Estas NPs se pueden diseñar para controlar tanto la velocidad de liberación de los fármacos, así como para controlar su localización en

algún lugar específico del organismo. La modulación de sus características se logra a través de las características del polímero y de la composición química de la superficie de las mismas (43).

4. Enfermedad periodontal

La EPD es una de las más importantes afecciones de la cavidad oral constituyendo una de las enfermedades crónicas a nivel mundial y la cual representa un problema de salud pública en muchos continentes. La EPD, además de las caries, es una de las principales causas de pérdida de dientes que afecta directamente la calidad de vida de las personas, reduciendo la capacidad funcional de la cavidad oral, su autoestima y relaciones sociales (44).

Clínicamente, la EPD se define como una afección inflamatoria de la encía y las estructuras de soporte de los dientes. La gingivitis y la periodontitis son las formas más comunes. La gingivitis se define como la inflamación de las encías, caracterizada clínicamente por la presencia de cálculos y/o placa dentobacteriana, provocando sangrado, cambios en la consistencia del contorno y el color de las encías. Los exámenes clínicos y radiográficos no muestran signos de destrucción ósea (Figura 4) (45). La periodontitis se caracteriza por la destrucción progresiva de las fibras periodontales y hueso alveolar, lo que resulta en la formación de bolsas periodontales, pérdida de la inserción dental, formación de deformaciones óseas, sangrado, hipermovilidad y eventualmente cuando no se trata, pérdida de las piezas dentales (46). La principal causa de la EPD es la placa dental microbiana que se reproduce favorablemente en la bolsa periodontal. Otros factores que contribuyen al progreso de la EPD incluyen la mala higiene bucal, maloclusión, hábitos, restauraciones dentales defectuosas y prótesis (45). La bolsa periodontal comprende la brecha entre la encía y el diente, y es el resultado de la progresión de la enfermedad. Esto proporciona un reservorio natural con condiciones ideales para la proliferación de microbios, cuando se presenta cualquiera de las condiciones antes mencionadas. La bolsa periodontal normalmente presenta entre 1-2 mm de profundidad, sin embargo, la profundidad generalmente supera los 5 mm cuando la enfermedad está presente (47).

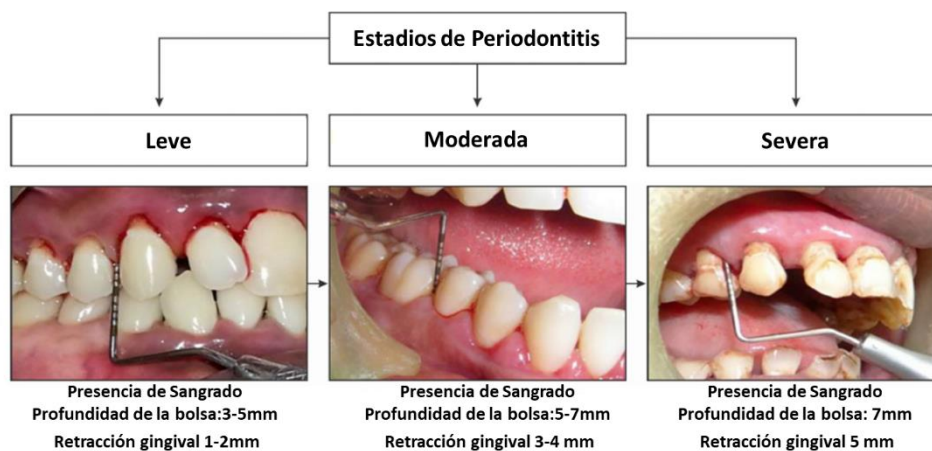


Figura 4. Evolución clínica y clasificación de los estadios de la enfermedad periodontal (48).

Las características del líquido crevicular gingival (FCG), que llena la bolsa periodontal, son específicas, en condiciones normales los sitios sanos se asocian con pequeños volúmenes de alrededor de 0.04 μl y un flujo de 0.03 $\mu\text{l}/\text{min}$, además el examen de las concentraciones de proteínas muestra que es similar al líquido extracelular y se cree que representa un trasudado extracelular normal. El FCG proporciona un medio de lixiviación para la liberación de un principio activo desde la forma de dosificación y para su distribución por todo el bolsillo. Estas características, junto con el hecho de que la EPD se localiza en el entorno inmediato de la bolsa, hacen de la bolsa periodontal un sitio natural para el tratamiento con sistemas locales de administración (6). Las bacterias que causan la destrucción e inflamación del tejido periodontal están presentes en todas las etapas de la enfermedad. Los antimicrobianos, antioxidantes, antiinflamatorios y antirresortivos, a veces son necesarios durante un largo tratamiento (49,50). Se han empleado agentes antimicrobianos sistémicos para el tratamiento de la periodontitis, sin embargo, resultan en bajas concentraciones terapéuticas en el FCG y tienden a estar asociados con fuertes efectos adversos (6,51).

En presencia de periodontitis, la placa subgingival es en gran parte inaccesible para la limpieza administrada por el propio paciente. En estos casos, el profesional dental debe desbridar todas las superficies subgingivales. El procedimiento más utilizado para el tratamiento de periodontitis severa es la disrupción mecánica de la placa

dental microbiana mediante un procedimiento llamado raspado y alisado radicular, que utiliza instrumentos de ultrasonido y manuales para eliminar toda la placa y el cálculo de las bolsas periodontales. Esta disrupción a veces es insuficiente para alterar la composición de la flora bacteriana, así como para prevenir una recurrencia de infección en el sitio. En algunas ocasiones la eliminación mecánica de la biopelícula de la placa puede complementarse con el uso de antimicrobianos adyuvantes, como los antibióticos. Por lo general, se administran sistemáticamente, aunque a veces también se usa la aplicación local de antimicrobianos directamente en la bolsa periodontal (52,53).

En el tratamiento de la gingivitis y periodontitis, se han empleado antibióticos como la amoxicilina, metronidazol, clindamicina, azitromizina, ciprofloxacino, doxiciclina, minociclina, tetraciclina, triclosan y clorhexidina. La matriz intermicrobiana que rodea y protege las bacterias de la placa hace que la administración sistémica normal de antibióticos sea ineficaz contra las bacterias dentro de la placa dental. El producto comercial más común para el tratamiento de la enfermedad periodontal son los enjuagues bucales. Sin embargo, extensos enjuagues bucales de solución antibacteriana no alcanzan los tejidos subgingivales profundos y la administración de dosis altas de antibióticos para lograr un nivel terapéutico en la bolsa periodontal podría provocar efectos adversos desagradables o tóxicos. Es por esto que se recomienda la administración local del principio activo, con la finalidad de mantener una concentración terapéutica efectiva en el FCG de la bolsa periodontal (21,54). Se han realizado formulaciones especiales de ciertos antibióticos para su colocación directa en las bolsas periodontales. Estos antimicrobianos administrados localmente permiten que se administre una concentración mucho mayor de medicamento para ser liberado en el sitio sin el riesgo de tener efectos adversos sistémicos o tóxicos. Se han desarrollado varios sistemas de administración de fármacos para fines periodontales, tales como tiras acrílicas, fibras, películas, sistemas inyectables, geles, tiras *intrapocket*, sistemas vesiculares, sistemas microparticulados y nanoparticulados (6,53,55–57).

5. Clorhexidina base

La CHX es un agente antimicrobiano de elección y es usado ampliamente en la práctica clínica dental como agente antiplaca, ésta ha demostrado una buena actividad antimicrobiana contra una amplia gama de especies microbianas presentes en la cavidad oral. La CHX es el fármaco de elección para el tratamiento de la EPD, debido a que previene el desarrollo de un medio oral que conduzca a la enfermedad periodontal. La CHX, 1,1-hexametilen-bis-5-(4-clorofenil) bisguanida, es una molécula simétrica con dos restos de guanidida ionizable, y es un sólido cristalino blanco con punto de fusión 132°C y peso molecular 505.5 g/mol, con solubilidad en agua a 20°C de 0.008% (p/v). La estructura química de la CHX se representa en la Figura 5. Los valores de pka son de 2.2 y 10.3, lo que hace que sea una molécula dicatiónica en todo el rango de valores fisiológicos de pH (58–63).

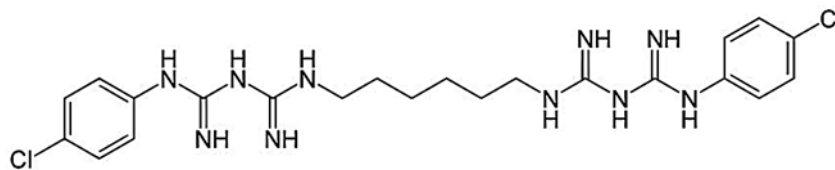


Figura 5. Estructura química de Clorhexidina base.

A bajas concentraciones, ejerce un efecto bacteriostático. Las células bacterianas están característicamente cargadas negativamente. La molécula dicatiónica de CHX es rápidamente atraída a la superficie celular bacteriana cargada negativamente, con una fuerte adsorción específica a los componentes que contienen fosfato. Esto altera la integridad de la membrana celular bacteriana con lo que la CHX será atraída a la membrana celular interna. La CHX se une a los fosfolípidos en la membrana celular interna, provocando la fuga de compuestos de bajo peso molecular pudiendo ser esta etapa reversible. Es entonces que, a concentraciones más altas, tiene un efecto bactericida. La CHX penetra en la pared celular bacteriana y conduce a la precipitación del citoplasma. La CHX exhibe un efecto antimicrobiano persistente, mientras que otros agentes pueden mostrar sólo un efecto inmediato momentáneo (64–66).

Actualmente, soluciones acuosas de CHX al 0.2% han mostrado ser moderadamente efectivas para el tratamiento de la enfermedad, por lo que debido a esto hay un amplio interés en el desarrollo de nuevos sistemas de liberación que mantengan la concentración de la CHX en niveles terapéuticos, por largos periodos de tiempo, además de ayudar a reducir la incidencia de la enfermedad (67).

Diferentes nanoacarreadores o nanomateriales tales como liposomas, nanopartículas metálicas, lipídicas o poliméricas, nanocristales, dendrimeros y nanofibras han sido desarrollados y propuestos para el tratamiento de la enfermedad periodontal (68). El uso de nanoacarreadores como dispositivos de administración de fármacos se ha sugerido principalmente para resolver los requisitos específicos en la mucosa oral y obtener mejores terapias convencionales evitando los efectos de dilución y aumentando la infiltración y adherencia de las nanoformulaciones (63,69).

6. Ftalato de Acetato de Celulosa

Los derivados de celulosa (éteres y ésteres de celulosa) han desempeñado un importante papel de apoyo en todo el desarrollo de formas dosificación orales tanto de liberación controlada y sostenida, como recubrimientos que responden a los cambios en el entorno fisiológico, como membranas semipermeables y como matrices hidrófobas que retrasan la velocidad de disolución del principio activo dentro de la matriz. Se han utilizado varios tipos de ésteres de celulosa en productos comerciales o en investigaciones farmacéuticas, como el Acetato de Celulosa (CA), el Ftalato de Acetato de Celulosa (CAP), el Butirato de Acetato de Celulosa (CAB), el Trimelitato de Acetato de Celulosa (CAT), el Ftalato de Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCP) entre otros (70). CAP fue uno de los primeros y más eficaces polímeros para la liberación controlada de pH y su uso continua hoy en día (71). CAP puede resistir el contacto prolongado con el fluido gástrico fuertemente ácido, pero se disuelve en el ambiente intestinal levemente ácido o neutro (72). CAP es generalmente insoluble en agua o soluble en agua dentro de un rango de pH distintos. Este polímero no forma un gel en presencia de agua, sino que forma sistemas microporosos sensibles al pH y semipermeables, lo que convierte al CAP en un excipiente adecuado para el desarrollo de nuevos sistemas de administración

de fármacos que actualmente han sido aceptados como estrategias prometedoras para prolongar el tiempo de residencia y mejorar la localización específica de los sistemas de administración de medicamentos. Por lo tanto, pueden reducir la frecuencia de dosificación en formulaciones de fármacos de liberación controlada (73).

7. Sinergismo empleando aceites esenciales, aceite de eugenol

Un enfoque antibacteriano alternativo comprende el uso de compuestos sinergistas de los antibióticos. La sinergia en la terapia antimicrobiana se emplea para describir la actividad supra-aditiva de los antibióticos cuando se usan en combinación con otros compuestos. El eugenol (4-alil-2-metoxifenol) se seleccionó como sustancia modelo para ser utilizado como núcleo oleoso en el caso de formulaciones de NCs, además de esperar se potencialice el efecto antimicrobiano del principio activo modelo (CHX). Eugenol es el principal componente químico del aceite de clavo de *E. aromatic*, y es conocido por sus efectos analgésicos, anestésicos locales, antiinflamatorios y antibacterianos. Se utiliza en forma de pasta o mezcla como cemento dental, relleno y material restaurador. Pertenece a la clase de aceites esenciales generalmente reconocidos como seguros (GRAS) por la Agencia de Administración de drogas y alimentos de los Estados Unidos Americanos (FDA) por sus siglas en inglés. El eugenol actúa principalmente al romper la membrana citoplasmática. Además, su naturaleza hidrofóbica le permite penetrar el liposacárido de la membrana celular de las bacterias Gram negativas y alterar la estructura celular, lo que posteriormente produce la fuga de los componentes intracelulares (74). De hecho, los efectos biológicos del eugenol varían mucho según su concentración. El eugenol puede tener un efecto beneficioso con concentraciones que varían de 10^{-8} a 10^{-5} M (promoviendo la síntesis de prostaglandinas, actividad nerviosa, e inhibición de la quimiotaxis de glóbulos blancos), pero puede ser citotóxico a concentraciones de 10^{-3} M (provocando muerte celular e inhibición del crecimiento y respiración celular) (75).

Hoy en día, el desarrollo de sistemas innovadores de administración de medicamentos se centra en el diseño de múltiples sistemas de administración de medicamentos, la prevención de los efectos adversos de los medicamentos y la

reducción de los intervalos de dosificación. De acuerdo a esto, una estrategia para evitar los efectos adversos consiste en desarrollar sistemas locales de entrega. El uso de sistemas de administración local en la cavidad oral, particularmente en el tratamiento de la EPD, ha aumentado rápidamente en los últimos años. El éxito de tales tratamientos depende intrínsecamente de las propiedades físicas de la formulación. Idealmente, tales sistemas deberían demostrar la liberación controlada del fármaco, exhibir retención en el sitio de acción durante el periodo de tiempo deseado, ser biodegradables, no tóxicos, cómodos y no irritantes. La retención de tales sistemas en la cavidad oral es esencialmente en un ambiente aeróbico con un alto porcentaje de humedad y secreciones naturales como la saliva, que tienden a diluir los fármacos administrados en esta (76). Es por ello, que para lograr una acción continua, múltiples aplicaciones pueden ser requeridas (77).

El fluido de la cavidad oral puede considerarse el fluido protector para todos los tejidos de la cavidad. Actúa como un amortiguador, manteniendo un pH que oscila entre 5.75 - 7.05, y está compuesta principalmente de agua (99.5%), compuestos orgánicos (0.03%) y trazas (0.2%) (78). En contraste, el microambiente periodontal es más anaeróbico y está perfundido por un filtrado de plasma, conocido como fluido crevicular gingival (FCG). Se ha demostrado que el crecimiento de microorganismos dentro de este microambiente es la causa de la EPD. El tratamiento de la enfermedad está dirigido a controlar este crecimiento. Desafortunadamente, los esfuerzos para tratar la EPD se han visto obstaculizados por varios factores. Debido a que el sitio de la infección bacteriana es en gran parte inaccesible para los agentes presentes en la cavidad oral, los agentes antimicrobianos proporcionados directamente a la cavidad oral generalmente son ineficaces. Por lo tanto, un sistema de administración *intrapocket* cargado de antibiótico y administrado de manera local, promueve una alta concentración de fármaco en el FCG, disminuyendo los efectos adversos por las altas dosis y proporcionando ventajas como la mejora de la eficacia del fármaco y una buena aceptación por parte del paciente (51). Los sistemas con tamaños nanométricos podrían ser potencialmente infiltrados en la bolsa periodontal y ser retenidos en el tejido dañado, liberando el fármaco de una manera controlada bajo ciertas condiciones fisiológicas (79). Además, las enfermedades generalmente implican mecanismos complejos y diversos en los que es necesario una gran variedad de moléculas para lograr un tratamiento adecuado. Las bacterias que

causan la destrucción e inflamación del tejido periodontal están presentes en todas las etapas de la enfermedad. Por lo tanto, se requieren antimicrobianos, antioxidantes, antirresortivos y antiinflamatorios durante todo el tratamiento. En la actualidad, algunos productos comerciales para el tratamiento de la periodontitis son los enjuagues bucales que se aplican diariamente, antibióticos sistémicos o algunos dispositivos para la administración local de principios activos (77).

El objetivo principal de este trabajo de investigación fue desarrollar sistemas nanoparticulados (NPs, NCs, NFs) cargados con CHX como formulaciones novedosas para mejorar el tratamiento de la EPD, los cuales sean capaces de mantener niveles terapéuticos de principio activo por largos periodos de tiempo que ayuden a evitar la reincidencia de la enfermedad, disminuyendo la cantidad de fármaco necesario para lograr un efecto terapéutico, reducir el tiempo de tratamiento, además de promover la aceptación por parte del paciente.

JUSTIFICACIÓN

La periodontitis es una enfermedad que afecta a diversos sectores de la población, se caracteriza principalmente por la degradación paulatina del tejido periodontal, presentando hinchazón de las encías en sus fases tempranas, movimiento de los dientes y pérdida del soporte alveolar en situaciones más graves. La etiología de la periodontitis es muy compleja, principalmente asociada con factores genéticos además de factores inherentes a la cavidad oral, tales como la placa dentobacteriana, la cual tiene gran influencia con los hábitos de higiene oral. La CHX es un agente antimicrobiano ampliamente utilizado en odontología como un agente antiplaca y ha demostrado una buena actividad antimicrobiana contra un amplio número de bacterias orales. Actualmente existen soluciones acuosas comerciales de CHX al 0.2% que han mostrado ser efectivas para el tratamiento de la EPD. Sin embargo, al emplear este tipo de sistemas es necesario realizar un amplio número de aplicaciones y muchas veces la concentración de principio activo no es alcanzada debido a las características naturales de lavado de la cavidad oral. Por tal razón, es necesario el desarrollo de nuevos sistemas de liberación modificada de CHX que mantengan niveles terapéuticos del fármaco por periodos de tiempo prolongados o actúen de forma inmediata liberando el fármaco en un sitio específico, ayudando a prevenir y evitar la reincidencia de la enfermedad, disminuyan la dosis de fármaco necesaria para ejercer el efecto terapéutico y reduzcan el tiempo de tratamiento provocando una mayor aceptación por parte del paciente. En el presente trabajo se propone el uso de NPs, NCs y NFs como sistemas de liberación controlada de CHX, como agentes auxiliares en el tratamiento de la EPD en sus diversos estadios.

HIPOTÉISIS

Empleando el desarrollo tecnológico para la elaboración de nanosistemas, es posible su fabricación a través de los métodos y materiales adecuados, obteniendo nanosistemas poliméricos capaces de infiltrarse en el sitio blanco (bolsa periodontal) y fungir como sistemas de liberación controlada de clorhexidina en el sitio blanco, entonces se podrá combatir con mayor eficacia a las bacterias causantes de la enfermedad periodontal y con esto provocar una mejora en el tratamiento y disminución de la reincidencia de la enfermedad en relación con las formas farmacéuticas existentes.

OBJETIVOS

1. Objetivo General

Desarrollar sistemas de talla nanométrica cargados con clorhexidina como formulaciones de actividad local determinando la factibilidad de su empleo en el tratamiento de la enfermedad periodontal comparando su efecto terapéutico contra una forma farmacéutica convencional.

2. Objetivos particulares

- Optimización, preparación y caracterización de nanocápsulas y nanopartículas de Ftalato de Acetato de Celulosa cargadas con Clorhexidina base por el método de emulsificación-difusión.
- Optimizar el método de *electrospinning* (electrohilado) para la obtención de nanofibras poliméricas de Ftalato de Acetato de Celulosa como sistemas de liberación de fármacos.
- Optimización, preparación y caracterización de nanofibras de Ftalato de Acetato de Celulosa cargadas con Clorhexidina base por el método de electrohilado.
- Caracterizar los diferentes nanosistemas obtenidos determinando su tamaño de partícula o diámetro promedio, potencial Z si es el caso, morfología, eficiencia de entrapamiento/encapsulación, eficiencia de proceso, capacidad de carga y comportamiento térmico, como formulaciones novedosas y de mayor desempeño terapéutico para el tratamiento de la enfermedad periodontal.
- Optimizar el método analítico para la cuantificación de Clorhexidina base mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).
- Determinar el mecanismo de liberación y cinética de liberación del principio activo de los diferentes nanosistemas obtenidos (NCs/NPs/NFs) *in-vitro*.
- Realizar pruebas de eficacia *in-vivo*, para observar la eficacia de los sistemas nanoparticulados en pacientes con enfermedad periodontal.

PARTE EXPERIMENTAL

1. Material y reactivos

- Polivinilalcohol, Mowiol® 4-88 (Glomarza, México).
- Etanol (grado analítico Fermont, Productos Químicos Monterrey, México)
- Metanol (grado analítico Fermont, Productos Químicos Monterrey, México)
- Metiletilcetona (grado analítico Fermont, Productos Químicos Monterrey, México)
- Fosfato monobásico de potasio (Fermont, Productos Químicos Monterrey, S.A. México)
- Hidróxido de sodio en hojuelas grado reactivo (J. T. Baker, México)
- Ácido clorhídrico (grado reactivo, J.T. Baker, México)
- Acetonitrilo (grado HPLC Fermont, Productos Químicos Monterrey, México)
- Agua (grado HPLC Fermont, Productos Químicos Monterrey, México)
- Agua Destilada (Milli-Q System, Millipore, Schwalbach, Alemania)
- Aceite de Eugenol (Mirafill, Mexico)
- Clorhexidina base polvo (Sigma Aldrich, Mexico)
- Ftalato de Acetato de Celulosa, (CAP) (Sigma Aldrich, USA)
- Filtros (Millex®-GV de 2.5 cm de diámetro y poro de 0.1 μm , 0.22 μm , y 0.45 μm (Millipore, Estados Unidos de América).

2. Aparatos y equipos

- Espectrofotómetro UV- Vis (Thermo Scientific, Geneys 10 UV Scaning, USA)
- HPLC (Varian, Pro Star)
- Zetasizer (Malvern Systems® ZEN 3600, Estados Unidos de América)
- Termómetro digital
- Balanza analítica (BBC 32, Boeco, Alemania)
- Parrilla eléctrica con agitación (Cimarec®, Thermoline, Estados Unidos de América)
- Agitador magnético, Magnestir® (Lab-Line instruments, Estados Unidos de América)

- Agitador de velocidad variable (RZR-1; Caframo[®], Alemania)
- Rotavapor (Laborota[®] 4000, Heidolph, Alemania)
- Ultracentrífuga Óptima[®] LE-80K (Beckman, Estados Unidos de América)
- Ultrasonicador Branson[®] (3200, Estados Unidos de América)
- Recirculador de líquidos con termostato (termostato VWR Scientific, Estados Unidos de América)
- Liofilizadora de mesa (Laboconco[®], USA)
- Calorímetro diferencial de barrido (DSC Q10, TA Instrument, USA)
- Conductímetro de pluma (Eco testr EC low, Eutech Instruments)
- Tensiómetro de placa
- Bomba de infusión (NE-300, New Era Pump Systems, Inc)
- Fuente de alto voltaje (ES100, 5W, 50 uA, Gamma High Voltage Research)
- Colector de acero inoxidable
- Vortex (Mixer, modelo M 16715, Estados Unidos de América)
- Potenciómetro (Modelo 430)
- Microscopio electrónico de barrido (JSM-25SII; JEOL, Japón)
- Láminas portaobjetos SuperFrost Ultra Plus[®] slides (Gerhard Menzel GmbH, Saarbrückener, Alemania)
- Láminas cubreobjetos (Gerhard Menzel GmbH, Saarbrückener, Alemania)
- Campana para recubrimiento con oro (JFC-1100; JEOL, Japón)
- Higrómetro
- Hilo dental sin cera SUPERFLOSS[®] (Oral B, México)

3. Metodología

La Figura 6 y 7 muestran el planteamiento general y particular de trabajo para la obtención de los diferentes nanosistemas, empleando la técnica de electrohilado y emulsificación-difusión, respectivamente.

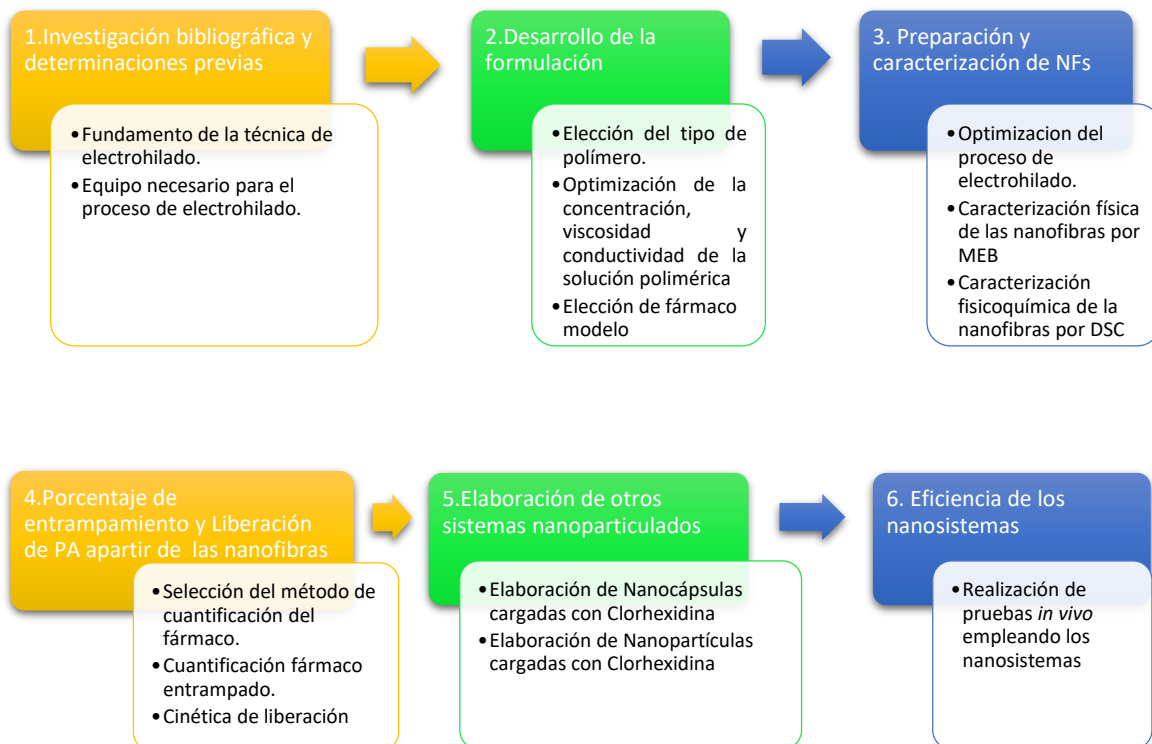


Figura 6. Esquema general de las actividades desarrolladas para la obtención, caracterización y evaluación de diferentes nanosistemas.

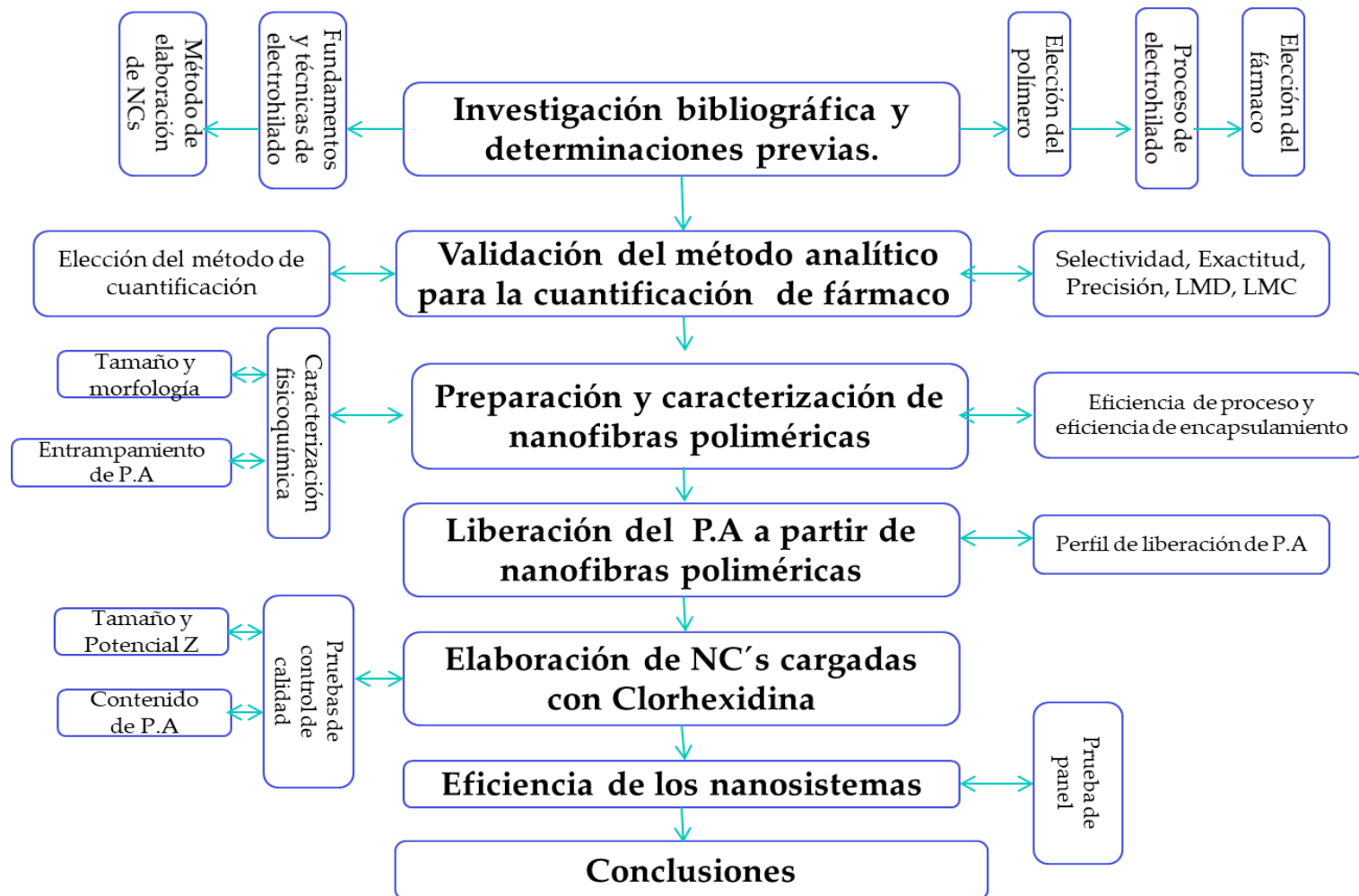


Figura 7. Diagrama general para la obtención de Nanofibras poliméricas de CAP por la técnica de electrohilado y Nanocápsulas o Nanopartículas poliméricas de CAP por la técnica de emulsificación-difusión.

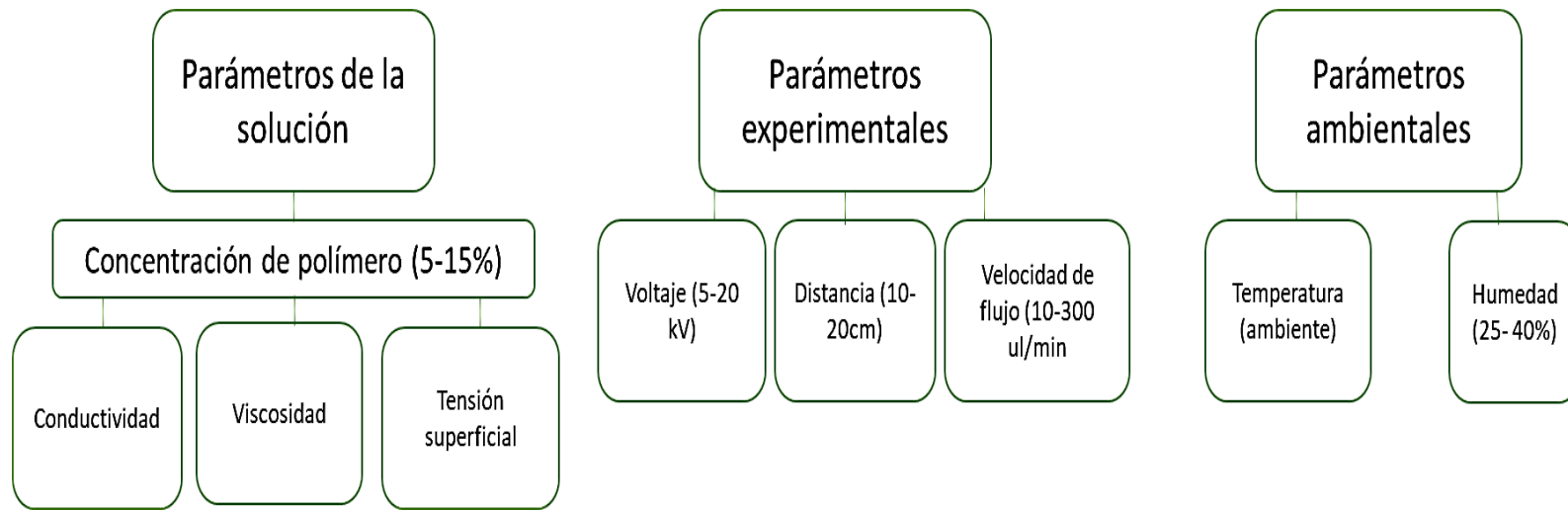


Figura 8. Condiciones experimentales a probar de los diferentes parámetros que afectan el proceso de electrohilado.

3.1 Desarrollo y caracterización de nanofibras poliméricas por *Electrospinning*

3.1.1 Determinaciones previas

3.1.1.1 Solubilidad del polímero

Se prepararon soluciones poliméricas de CAP a diferentes concentraciones (5,10,15%) empleando diferentes mezclas de disolventes como se muestra en la Tabla 1, las soluciones se mantuvieron bajo agitación magnética constante por un periodo de 24 h a temperatura ambiente en recipientes perfectamente sellados. La solubilidad fue determinada cualitativamente en las diferentes mezclas de disolventes.

Tabla 1. Solubilidad de polímero CAP a diferentes concentraciones empleando diferentes mezclas de disolventes.

Concentración de polímero (CAP) (%p/v)	Mezcla de disolventes
5 %	Acetona: Agua (1.7:0.3)(v/v)
	Acetona: Etanol (1:1)(v/v)
	Acetona: Isopropanol (1:1)(v/v)
	Acetona: Metanol (1:1)(v/v)
	Acetona: Metanol (0.5:1.5)(v/v)
10%	Acetona: Agua (1.7:0.3)(v/v)
	Acetona: Etanol (1:1)(v/v)
	Acetona: Isopropanol (1:1)(v/v)
	Acetona: Metanol (1:1)(v/v)
	Acetona: Metanol (0.5:1.5)(v/v)
15%	Acetona: Agua (1.7:0.3)(v/v)
	Acetona: Etanol (1:1)(v/v)
	Acetona: Isopropanol (1:1)(v/v)
	Acetona: Metanol (1:1)(v/v)
	Acetona: Metanol (0.5:1.5)(v/v)

3.1.1.2 Optimización del proceso de electrohilado

Las propiedades de la solución y las condiciones del proceso de electrohilado fueron optimizadas y determinadas como se indica en la siguiente sección, con la finalidad de observar la influencia de la concentración del polímero, el tipo de disolvente y la cantidad de principio activo, sobre la eficiencia de proceso (EP) de electrohilado, la morfología y tamaño (diámetro) de NFs y la eficiencia de atrapamiento (EE) del principio activo.

3.1.1.3 Viscosidad y Conductividad de soluciones poliméricas

La viscosidad de las soluciones poliméricas a diferentes concentraciones de polímero (5-15 %) y principio activo (2-20 mg) fue determinada empleando un viscosímetro Brookfield DV-II-PRO (USA) a 25 °C y una velocidad de 5 rpm. Muestras de las diferentes soluciones poliméricas empleadas fueron colocadas en un adaptador para muestras de volumen pequeño (≈ 10 ml) del equipo antes mencionado, todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado. Después de medir la viscosidad, las muestras fueron transferidas a contenedores de aproximadamente de 15 ml, donde la conductividad de las soluciones poliméricas fue medida empleando un medidor de conductividad tipo pluma (Eco Test TDS de baja conductividad), de igual forma todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado y los resultados promedio fueron reportados.

3.1.1.4 Tensión Superficial de las soluciones poliméricas

La tensión superficial de las soluciones poliméricas fue determinada empleando un tensiómetro de Dünoy modificado, sumergiendo la placa (Wilhelmi) de platino (2.5 cm de ancho X 1 cm de alto) en 10 ml de las diferentes soluciones poliméricas en estudio, (diferente concentración, diferente disolvente y diferente cantidad de principio activo). La fuerza necesaria para desprender la placa de platino de la superficie de la solución polimérica fue determinada. La tensión superficial de la solución polimérica fue establecida tomando como referencia la tensión superficial

del agua a 25°C. Las determinaciones fueron realizadas por triplicado y el resultado promedio fue reportado.

3.1.2 Electrohilado de soluciones poliméricas

El proceso de electrohilado se llevó a cabo empleando soluciones poliméricas de CAP con concentraciones en un rango de 5-12 % (p/v) y diferentes mezclas de disolventes empleadas para disolver el polímero; Acetona: Etanol (1:1)(v/v), Acetona: Metanol (1:1)(v/v) y Acetona: Metanol (0.5: 1.5)(v/v), además de diferente cantidad de principio activo. En resumen, la cantidad de CHX fue adicionada a las diferentes mezclas de disolventes, empleadas para preparar las soluciones poliméricas, las cuales se agitaron hasta que se disolvió completamente. Seguido de esto, la cantidad necesaria de polímero fue adicionada a la solución y se mezcló hasta obtener una solución translúcida. La solución polimérica obtenida fue transferida a una jeringa de 10 ml equipada con una aguja de acero inoxidable de 6 mm de longitud y 31 G de diámetro interno (d.i). La solución polimérica fue inyectada a una velocidad de 10 μ l/min (0.6 ml/h) y se aplicó un voltaje en un rango de 10-15 kV. Las fibras fueron colectadas en un plato de acero inoxidable colocado a una distancia de entre 15-20 cm. Las fibras obtenidas después de inyectar el total de la solución polimérica formaron una membrana en el plato colector la cual fue expuesta a temperatura ambiente por 24 h para permitir la evaporación del disolvente residual. Las membranas de fibras fueron recolectadas y almacenadas a temperatura ambiente.

3.1.3 Eficiencia de entrapamiento

La EE fue determinada con respecto a la cantidad inicial de principio activo presente en la formulación. De acuerdo a la mejor formulación obtenida y condiciones de proceso, las NFs fueron preparadas con diferente cantidad de CHX (2, 4, 10, 20 mg). La cantidad CHX fue determinada por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Brevemente, una cantidad aproximada de 10 mg de nanofibras de ftalato de acetato de celulosa cargadas con clorhexidina (NFs-CAP-CHX) fue disuelta en 5 ml de metiletilcetona (MEC), seguida de la adición de 4 ml de hidróxido de sodio 0.1

M (NaOH) para lograr la completa disolución de polímero y liberar la CHX atrapada. La fase orgánica (FO) formada fue separada de la fase acuosa (FA), llevándola a sequedad a temperatura ambiente y cuyo residuo fue resuspendido en metanol y aforado a un volumen de 10 ml. Una muestra de esta última solución obtenida, fue filtrada empleando un filtro Millipore® 0.22 µm y analizada por HPLC. La cantidad de CHX obtenida fue determinada empleando la curva de calibración de CHX en metanol. La EE fue calculada empleando la siguiente ecuación:

$$EE \% = \frac{\text{Cantidad de fármaco en la membrana de NFs}}{\text{Cantidad teórica inicial en la formulación}} \times 100$$

3.1.4 Determinación de la cantidad de CHX por la técnica de HPLC

La cantidad de CHX atrapada fue determinada por HPLC, empleando un sistema cromatográfico Varian ProStar, equipado con una bomba, un automuestreador y un detector de longitud de onda de arreglo de diodos. La muestra fue separada empleando una columna LiChropher® 100 RP-18, 5 µm, (125 mm X 4 mm). La elución fue realizada bajo condiciones isocráticas empleando una mezcla de Acetonitrilo: Solución Amortiguadora de Acetatos pH 3.3 (35:65)(v/v). Una muestra de 20 µl fue inyectada al sistema y la detección fue realizada a 260 nm, a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Se realizó una curva de calibración empleando 6 diferentes concentraciones en un rango entre 10 y 80 µg/ml. Después de inyectar la muestra al sistema el tiempo de retención fue de 6 min. Posteriormente los cromatogramas obtenidos fueron analizados empleando el Software Galaxy.

3.1.5 Determinación de la morfología y diámetro de NFs por MEB

Las muestras de NFs obtenidas fueron colectadas en cubre objetos de vidrio y preparadas de la siguiente manera. Las muestras secas, fueron recubiertas con oro en un evaporador catódico JFG-1100 Sputter Coater (JEOL, Tokio, Japón). Las muestras ya recubiertas fueron colocadas en la cámara de muestras y observadas empleando un microscopio electrónico de barrido LV-SEM JSM-5600, JEOL, Tokio,

Japón, con una aceleración de voltaje de 10 kV y una presión de 12-20 Pa. Las micrografías obtenidas fueron analizadas para obtener el diámetro promedio de las fibras. Un total de al menos 30 fibras fueron medidas para cada muestra. El diámetro fue expresado como diámetro promedio \pm SD. A las determinaciones obtenidas se les realizó un análisis estadístico empleando una Test de Student en donde un $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

3.1.6 Comportamiento térmico por Calorimetría Diferencia de Barrido (DSC)

El comportamiento térmico de los componentes de la formulación presentes en las soluciones poliméricas empleadas para la obtención de NFs fueron evaluadas por DSC. Muestras de CHX polvo, polímero CAP polvo y NFs con principio activo y sin principio activo fueron analizadas. Aproximadamente 3-5 mg de cada muestra fueron colocadas en charolas de aluminio no herméticas y calentadas de 0 a 300 °C a una velocidad de 5 °C/min bajo atmosfera de nitrógeno con un flujo de 50 ml/min. Los termogramas fueron obtenidos empleando un calorímetro DSC Q10, TA Instruments, New Castle, DE, USA.

3.1.7 Estudios de liberación del principio activo a partir de nanosistemas

La determinación del mecanismo de liberación del principio activo a partir de los diferentes nanosistemas fue realizada bajo condiciones *sink*. Una cantidad equivalente a 500 μ g de CHX presente en las membranas de NFs fueron pesadas con exactitud, después las muestras fueron colocadas en un frasco de boca estrecha que contenía 10ml de solución amortiguadora de fosfatos pH 7-Brij® 58 al 2.5% (p/v) (SBF pH 7), los frascos fueron cerrados y colocados bajo agitación constante a una velocidad de 30 rpm y temperatura de 37 °C. Dichas condiciones pretenden simular el pH y la fuerza iónica de la saliva/liquido crevicular gingival (pH 7/ 75 mmol/L). Muestras de 2 ml de medio de liberación (SBF pH 7) fueron tomadas a diferentes intervalos de tiempo, el volumen retirado fue inmediatamente remplazado con medio fresco para completar el volumen inicial. La cantidad de CHX liberada a partir de los

nanosistemas fue determinada empleando el método descrito anteriormente por la técnica de HPLC. Los resultados obtenidos fueron reportados como el promedio de tres determinaciones realizadas. Los datos obtenidos fueron ajustados a la ecuación de Higuchi y el modelo de Korsmeyer-Peppas, con la finalidad de evaluar el mecanismo de transporte, tipo de liberación y cinética de liberación.

3.2 Desarrollo y caracterización de otros sistemas nanoparticulados por emulsificación-difusión.

3.2.1 Determinaciones previas.

3.2.1.1 Solubilidad del polímero.

Se realizó la prueba de solubilidad de los materiales utilizados con la finalidad de determinar el mejor disolvente a utilizar en la preparación de NCs y NPs, así como en la cuantificación de la CHX.

3.2.1.2 Determinación de la solubilidad de CHX.

Se realizaron pruebas de solubilidad del principio activo (CHX) en diferentes disolventes y en el aceite que serviría como centro oleoso de las NCs, en este caso Eugenol. Se pesaron 10 mg de CHX a los cuales se les adicionó cada uno de los disolventes en pequeñas cantidades de 20 μ L con agitación magnética constante a temperatura ambiente determinando la solubilidad en cada disolvente.

3.2.1.3 Elección del método analítico para la cuantificación de CHX, Espectrofotometría UV-Vis & Cromatografía de líquidos de alta resolución.

Se determinaron las longitudes de onda de máxima absorción (λ_{\max}) para una solución de CHX, eugenol y una mezcla clorhexidina-eugenol, empleando como disolvente metanol. Los barridos se realizaron en un rango de 200 a 400 nm. Por otro lado, la λ_{\max} para el complejo PVAL con H_3BO_3 0.65M y una solución de I_2 0.05M en KI 0.15M se determinó realizando un barrido en un rango de 400 a 800 nm.

3.2.1.4 Curva de calibración para el complejo colorido de PVAL.

Para el complejo de PVAL con H_3BO_3 0.65M y una solución de I_2 0.05M en KI 0.15M, se preparó una curva de calibración por triplicado leyéndose a $\lambda=640$ nm. Para la curva se mantuvo la misma proporción de H_3BO_3 y I_2/KI para todos los puntos, es decir, se prepararon diferentes concentraciones de solución acuosa de PVAL tomando 1 ml de dicha solución y llevándola a un volumen de 5 ml con agua destilada con 2 ml de H_3BO_3 0.65M y 1 ml de I_2 0.05M en KI 0.15M para formar el complejo colorido. Se utilizó como blanco un sistema de 5 ml de H_2O , 2 ml de H_3BO_3 0.65M y 1 ml de I_2 0.05M en KI 0.15M.

3.2.1.5 Optimización del método analítico para la cuantificación de CHX por HPLC.

Se preparó una solución estándar de concentración conocida de CHX disuelta en metanol leyéndose en el espectrofotómetro a 260 nm. Por otro lado, una muestra de dicha solución estándar se inyectó al sistema cromatográfico para obtener su área bajo la curva.

La CHX presenta un pico con una λ_{max} de 260 nm al UV, pero al mezclarse con el eugenol que presenta un λ_{max} a 280 nm al UV, la señal se suprime, lo que imposibilita detectarla y con ello cuantificarla. Por esta razón, se decidió proceder a la optimización de un método analítico que nos permita separar los componentes de la mezcla, eligiéndose para esto la técnica de HPLC, por lo que se procedió a definir el tipo de columna a emplear, la fase móvil, la velocidad de flujo de trabajo y la temperatura.

Para ello se hicieron pruebas inyectando muestras de las siguientes soluciones:

- Soluciones blanco de metanol y solución amortiguadora de acetatos pH 3.3.
- Solución de CHX disuelta en metanol.
- Solución amortiguadora de acetatos pH 3.3 adicionada con CHX.
- Solución de una mezcla CHX / eugenol disuelta en metanol.
- Muestra problema de extracción de CHX a partir de NCs.
- Muestra problema de extracción de CHX a partir de NPs.

3.2.1.6 Validación del método analítico para la cuantificación de CHX mediante la técnica de HPLC.

El método analítico para la cuantificación del principio activo fue validado determinando la:

- a) Selectividad
- b) Linealidad
- c) Precisión
- d) Repetibilidad
- e) Reproducibilidad
- f) Exactitud
- g) Límite de detección
- h) Límite de cuantificación

El método analítico para la cuantificación de CHX contenida en los nanosistemas fue validado de acuerdo a los parámetros y criterios establecidos por la guía para la validación de métodos analíticos, propuesta por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. El método analítico se validó de acuerdo a la siguiente manera:

Selectividad: Para evaluar la selectividad del método, se analizaron diferentes muestras y soluciones empleadas como disolvente conformados de la siguiente manera:

- Metanol
- Solución Amortiguadora de Acetatos pH 3.3: Acetonitrilo (70:30)
- Eugenol disuelto en metanol (1:10)
- PVAL disuelto en metanol
- Solución Amortiguadora de Fosfatos pH 7
- Solución Amortiguadora de Fosfatos pH 7 con Brij 58[®] al 2.5%(p/v)
- Solución Amortiguadora de Fosfatos pH 7 con cada ingrediente de la formulación.

Cada muestra fue examinada con la finalidad de asegurar una aceptable cuantificación de CHX, libre de interferencias provocadas por el resto de los componentes contenidos en las formulaciones.

Linealidad: Para determinar la linealidad del método, se preparó una curva de calibración de CHX por triplicado. El medio empleado para preparar las curvas fue metanol (disolvente empleado para la disolución de CHX remanente extraída de las muestras de nanosistemas). Con este disolvente se prepararon soluciones de concentraciones conocidas de CHX, las cuales se aplicaron en el sistema cromatográfico con un mínimo de seis concentraciones adecuadas. A partir de los cromatogramas obtenidos se determinó el área bajo la curva con la cual se determinó la relación matemática entre la concentración y la respuesta obtenida, verificando que fuera continua y reproducible a lo largo del intervalo.

El método se considera lineal si r^2 es igual o mayor a 0.98 para la relación concentración-respuesta. Además, el porcentaje de desviación absoluta para cada nivel de concentración debe ser menor o igual a 15%, excepto para el nivel de concentración más bajo (límite de cuantificación), pues para este nivel el porcentaje debe ser igual o menor a 20 %.

Precisión

Repetibilidad (Intra-día)

Este parámetro se evaluó en un mismo día a las mismas condiciones (analista, equipo y laboratorio). Para ello, se aplicaron un mínimo de 3 réplicas de las muestras en metanol a tres diferentes niveles de concentración de CHX, diferentes a los de la curva de calibración.

Reproducibilidad (Inter-día)

La reproducibilidad fue estudiada en dos días diferentes a las mismas condiciones de equipo y laboratorio. Se aplicaron muestras de CHX por sextuplicado en el medio metanol a tres diferentes niveles de concentración de CHX, diferentes a los de la curva de calibración.

El método se considera repetible y reproducible si el coeficiente de variación para cada nivel de concentración no excede el 2 %, considerado para un método cromatográfico.

Exactitud: La exactitud se determinó con 6 réplicas a 3 niveles de concentración de CHX disuelta en metanol. El método se considera exacto, si el valor promedio en cada nivel de concentración está dentro del 15 % del valor nominal de concentración.

Límite de cuantificación: Esta determinación se efectuó experimentalmente para dicho método. Se analizó la concentración más baja del intervalo de trabajo por un mínimo de 3 réplicas para la CHX disuelta en metanol y se verificó que se obtuviera una respuesta analítica por lo menos cinco veces mayor que la respuesta del blanco. Si el CV no es mayor del 2%, se considera que esa concentración tiene validez como límite de cuantificación.

Límite de detección: Al igual que el límite de cuantificación, este parámetro se determinó experimentalmente. Para ello se aplicaron muestras con concentraciones menores a las de la curva de calibración. Se determinó la concentración a la cual la señal de las muestras puede distinguirse de los niveles de ruido o de una muestra placebo. La respuesta debe ser tres veces la señal de ruido de fondo, esta concentración será el límite de detección.

3.2.2 Preparación de NCs/NPs por el método de emulsificación-difusión.

Se prepararon NCs y NPs poliméricas sin fármaco y con fármaco a partir de un polímero preformado, CAP, empleando la técnica de emulsificación-difusión. El método empleado fue adaptado y a continuación se describe brevemente (63,80,81); en un embudo de separación se saturaron el disolvente orgánico (metiletilcetona) y agua destilada, agitando suavemente y después dejando reposar por 20 min para separar ambas fases (fase orgánica y fase acuosa). Para las formulaciones de NCs, en 20 ml de fase orgánica saturada se disolvió la cantidad correspondiente del polímero CAP, de igual forma la cantidad indicada del principio activo (CHX) y la cantidad necesaria del aceite de eugenol, (Tabla 2). Con la fase acuosa saturada se preparó una solución de polivinilalcohol (PVAL) al 5%. La fase orgánica se emulsificó con 40 ml de fase acuosa de PVAL al 5%, agitándose mecánicamente a 1700 rpm durante 10 min. Posteriormente el exceso de disolvente orgánico se eliminó de la suspensión de nanosistemas bajo presión reducida en un Rotavapor a 30 rpm y 30

°C. La suspensión se concentró hasta llegar a un volumen aproximado de 40 ml de un total de 60 ml. Los nanosistemas obtenidos (NCs o NPs) fueron aislados por centrifugación a 12000 rpm, 15 °C, por 40 min. La pastilla obtenida se resuspendió en agua destilada bajo agitación magnética durante 24 h para volver a ser posteriormente centrifugada. Este proceso de lavado-centrifugado se realizó por triplicado para remover el exceso de PVAL adsorbido en la superficie de los nanosistemas. Dicho proceso optimizado y la formulación fueron empleadas para obtener nanopartículas, recalcando que en esta formulación no es requerido el aceite de eugenol, (Figura 9).

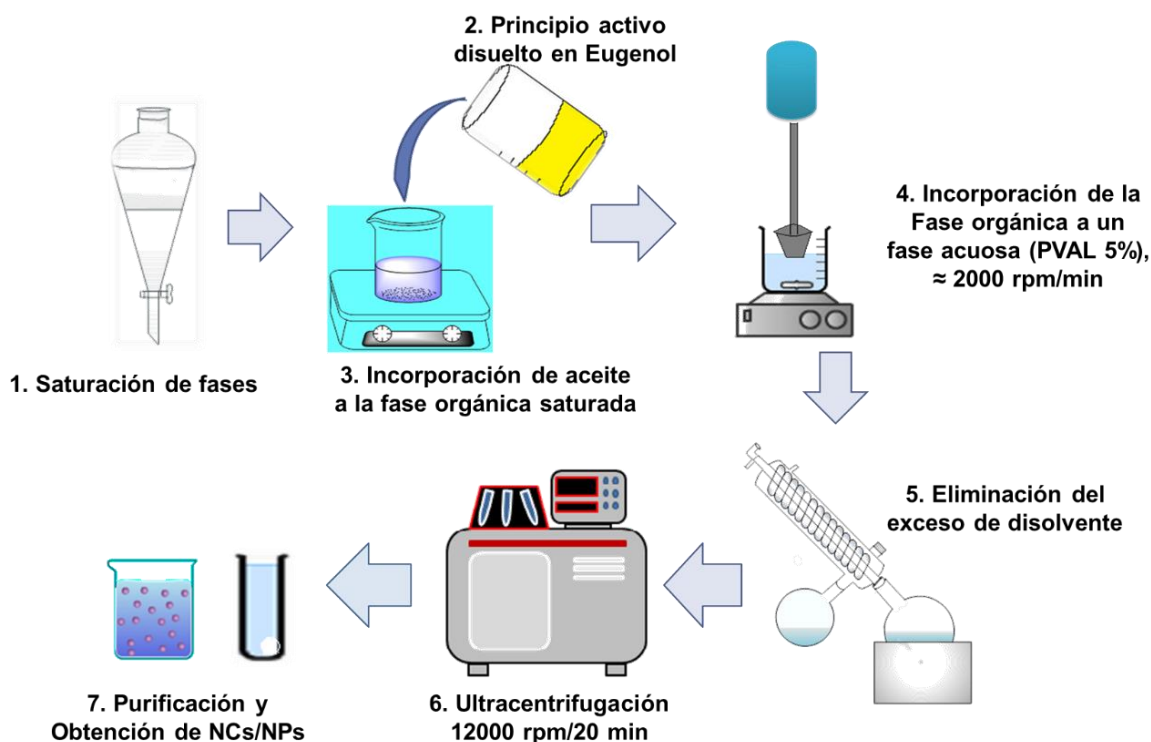


Figura 9. Diagrama general de preparación de NCs y NPs empleando la técnica de emulsificación-difusión.

Tabla 2. Formulaciones propuestas para preparar NCs y NPs de CAP cargadas con CHX.

Material	NCs			NP
	Formulación A	Formulación B	Formulación C	Formulación
Polímero (CAP) (mg)	200	200	200	200
Aceite (Eugenol) (mg)	365	365	365	–*
Principio Activo (CHX) (mg)	10	20	30	10
Solución fase externa (PVAL 5%) (ml)	40	40	40	40
Solución fase interna (MEC) (ml)	20	20	20	20

*Para esta formulación el eugenol no es necesario

**MEC (Metiletilcetona)

***PVAL (Polivinilalcohol)

Se prepararon varios lotes, cada lote por triplicado y la pastilla del último centrifugado se resuspendió en agua destilada. Algunos lotes en suspensión se congelaron y se liofilizaron y otros se utilizaron para algunas pruebas de caracterización de las NCs o NPs conservándose en dispersión líquida.

3.2.3 Caracterización fisicoquímica de NCs y NPs

En base a la mejor formulación se prepararon lotes para llevar a cabo la caracterización de las NCs y NPs.

3.2.3.1 Determinación de tamaño de partícula y potencial Z de NCs y NPs

Se determinó el tamaño de partícula promedio, la distribución de tamaño de partícula, la desviación estándar, así como el índice de polidispersión por el método de dispersión de luz dinámica empleando un Zetasizer® Nano ZS (Malvern Instruments Ltd.). Las muestras de los nanosistemas fueron suspendidas y diluidas apropiadamente con agua ultrapura Milli-Q® hasta lograr la apropiada concentración de partículas para la medición, todas las lecturas se realizaron a 25 °C y un ángulo de incidencia de 90° por 180 s. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado (n=3). El potencial Z se determinó utilizando el Zetasizer® Nano ZS (Malvern Instrument Ltd.) empleando una celda de capilar doblado con 150 V de corriente eléctrica; cada dispersión de NCs/NPs fue diluida con agua desionizada

hasta alcanzar la concentración adecuada para las mediciones. Todas las mediciones fueron hechas por triplicado a 25 °C.

3.2.3.2 Determinación del PVAL residual en NCs/NPs de CAP.

La cantidad de PVAL residual en los nanosistemas fue determinada por un método colorimétrico. Considerando que el PVAL en solución forma un complejo estable con iodo en presencia de ácido bórico, el método empleado fue el siguiente; se disolvió una cantidad conocida de liofilizado de nanosistemas (5-10 mg) en 5 ml de metiletilcetona en un vaso de precipitados con agitación magnética por 48 h y posteriormente se llevó a sequedad. Después se agregaron 5 ml de agua destilada y se continuó la agitación magnética por al menos 3 h. Esta solución se filtró con una membrana Millipore® de 0.22 μm , el filtrado se llevó a un volumen de 10 ml con agua. Se tomó 1 ml de la solución anterior y se aforó nuevamente a 5 ml con agua destilada. Los 5 ml se mezclaron con 2 ml de H_3BO_3 0.65 M y 1 ml de I_2 0.05 M en KI 0.15 M para formar el complejo colorido. La absorbancia de la muestra resultante fue medida a $\lambda=640$ nm en el espectrofotómetro (Varian Cary Win 50 UV-Vis), la absorbancia obtenida se interpoló en la curva de calibración para obtener la concentración del sistema.

Cuando la lectura de absorbancia era baja o alta para ser interpolada en la curva de calibración se tomaron mayores volúmenes del filtrado o bien se hacían diluciones del mismo, llevando siempre a un volumen final de 5 ml antes de mezclar con los 2 ml de H_3BO_3 0.65 M y 1 ml de I_2 0.05 M en KI 0.15 M para formar el complejo colorido. Se utilizó como blanco un sistema de 5 ml de H_2O , 2 ml de H_3BO_3 0.65 M y 1 ml de solución de iodo I_2 0.05 M en KI 0.15 M (82). La curva de calibración para la cuantificación de PVAL fue lineal en un rango de concentraciones de 5-50 $\mu\text{g/ml}$, ($r^2=0.9999$).

3.2.3.3 Determinación de la eficiencia de entrapamiento y capacidad de carga de NCs y NPs de CAP

La eficiencia de entrapamiento (EE) se refiere a la cantidad de fármaco que puede ser entrapado o encapsulado con respecto a la cantidad inicial del fármaco en la formulación (Ecuación 1). La capacidad de carga (CC) se refiere a la cantidad de fármaco que está contenido en los nanosistemas con respecto a la cantidad total de nanosistemas obtenidos (Ecuación 2). La eficiencia de proceso (EP) se refiere a la cantidad de nanosistemas que pueden ser obtenidos con respecto a la cantidad inicial de los materiales presentes en la formulación (Ecuación 3). Se prepararon lotes de NCs y NPs en base a la mejor formulación, con la finalidad de evaluar la EE, la CC y la EP de fabricación, todos los lotes preparados fueron llevados a sequedad a 40-50 °C en una estufa por 24 h, después el polvo obtenido se colocó en un desecador a temperatura ambiente, para obtener el peso constante del polvo resultante. Los resultados obtenidos se analizaron empleando la ecuación 3 para obtener la EP en la elaboración de NCs o NPs.

$$\text{Eficiencia de entrapamiento/encapsulación} = \frac{\text{Cantidad de Fármaco cargado}}{\text{Cantidad inicial de Fármaco}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Capacidad de carga} = \frac{\text{Cantidad de Fármaco en el nanosistema}}{\text{Cantidad total de nanosistema obtenido}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Eficiencia de Proceso} = \frac{\text{Cantidad total de nanosistema obtenido}}{\text{Cantidad total de excipientes en la formulación}} \times 100 \quad (3)$$

Las NCs fueron preparadas con diferente cantidad de CHX (10, 20 y 30 mg) pero la misma cantidad de aceite de eugenol 365mg (Tabla 2). La cantidad de CHX en NCs de CAP fue determinado, siguiendo la siguiente metodología descrita; 10 mg de polvo de nanosistema (NCs/NPs) fueron disueltos 4 ml de NaOH 0.1 M y 5 ml de metiletilcetona para lograr la disolución completa del CAP y liberar la cantidad de fármaco encapsulado/entrapado, disolviéndose en la fase orgánica. La fase orgánica y acuosa obtenidas, fueron separadas y llevadas a sequedad a temperatura ambiente y cuyo residuo fue resuspendido en 10 ml de metanol bajo agitación

magnética por 10 min. Una muestra de esta última solución fue filtrada con una membrana Millipore® de 0.22 µm y analizada por HPLC para determinar la cantidad de CHX encapsulada o entrampada según sea el caso. Dicho procedimiento también fue replicado para la determinación de CHX contenida en NPs de acuerdo a la mejor formulación (Figura 10).

3.2.3.4 Determinación cuantitativa de CHX en NCs y NPs de CAP.

El método descrito anteriormente se adaptó para la cuantificación de CHX a partir de NCs o NPs. La cantidad de CHX fue determinada por HPLC fase reversa, empleando una columna LiChropher® 100 RP-18, 5 µm (125 mm X 4 mm) y un sistema cromatográfico Varian ProStar, equipado con una bomba, automuestreador y un detector de arreglo de diodos, conectados a un equipo de cómputo. La elución se llevó a cabo en condiciones isocráticas empleando una fase móvil que consistía de una mezcla de Acetonitrilo: Solución amortiguadora de acetato de sodio 30 mM (35:65)(v/v) ajustando el pH a 3.3 con ácido acético glacial y 0.5 % de trietilamina. El volumen inyectado de muestra tanto de fase acuosa como de fase orgánica fue de 20 µl. La detección fue realizada a 260nm a una velocidad de flujo 1 ml/min. La curva de calibración para la CHX fue lineal en un rango de concentraciones de 10-80 µg/ml. El tiempo de retención de la CHX fue aproximadamente de 6 min. Los cromatogramas obtenidos fueron analizados con el Software Galaxy siguiendo el método descrito y adaptado de H. Lboutonne *et al.* (2002) (63).

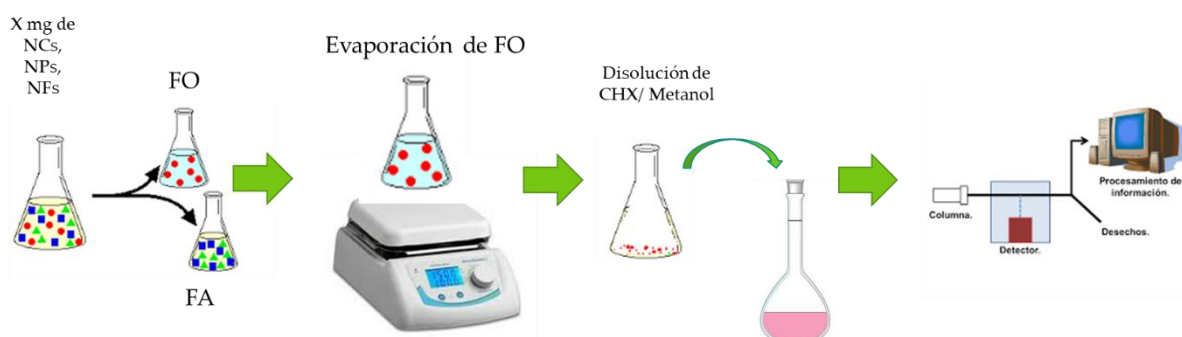


Figura 10. Representación gráfica del proceso de extracción de CHX para su cuantificación a partir de los diferentes nanosistemas obtenidos.

3.2.3.5 Análisis morfológico y superficial de NCs/NPs por MEB

La MEB fue empleada para examinar la morfología superficial y tamaño de muestras de NCs y NPs de CAP cargadas con CHX. Las muestras se prepararon realizando una dilución de la dispersión de NCs o NPs. Una gota de suspensión se colocó sobre un cubre objetos y se dejó secar a temperatura ambiente para después recubrirlas con un baño de oro (≈ 20 nm) empleando una cámara de vacío para recubrimiento JFG-1100 Sputter Coater. Las muestras fueron observadas con un microscopio electrónico de barrido (LV-SEM JSM-5600, JEOL, Japón) empleando un voltaje de 15-25 kV y una presión de 12-20 Pa, en la cámara de muestras.

Por otro lado, con la finalidad de evaluar la potencial infiltración de los nanosistemas en la bolsa periodontal, hilos dentales no encerados de nylon (SUPERFLOSS TM Oral-B®) fueron sumergidos en una dispersión al 5% (p/v) de nanosistemas (NCs-CAP-CHX o NPs-CAP-CHX) por 24 h, transcurrido el tiempo fueron retiradas y se dejaron secar a temperatura ambiente (Figura 11). Muestras de hilos completamente secos fueron montados en un porta muestras y preparados como se mencionó anteriormente para ser caracterizados por MEB empleando las mismas condiciones.

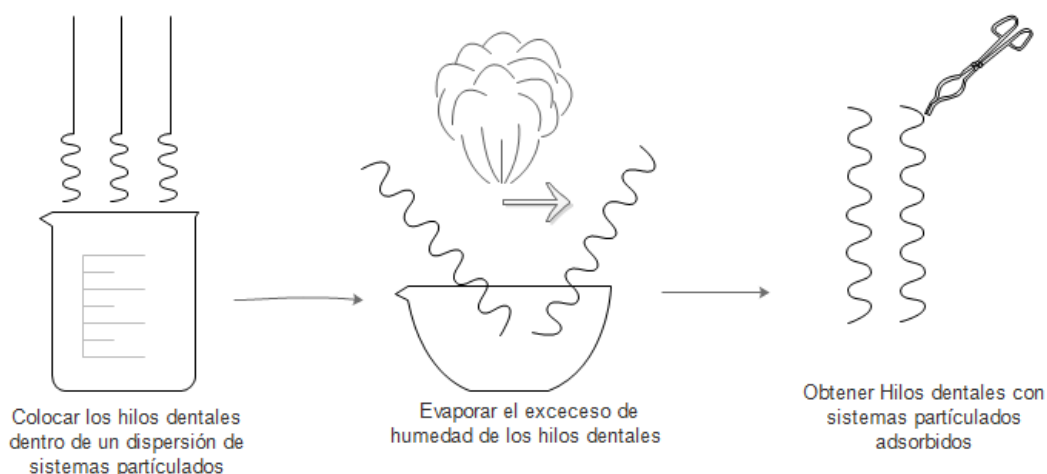


Figura 11. Procedimiento de adsorción de diferentes sistemas nanoparticulados a la superficie de hilos dentales no encerados.

3.2.3.6 Comportamiento térmico por Calorimetría Diferencial de Barrido.

La calorimetría diferencial de barrido fue empleada para caracterizar las propiedades térmicas de los componentes de la formulación ya optimizada, en particular para NCs. Se realizaron muestras de cada uno de los componentes de la formulación, una mezcla física, así como de NCs sin principio activo y NCs con principio activo. En primer lugar, el equipo fue calibrado con un estándar de indio, después de cada una de las muestras a estudiar, se pesaron de 3-5 mg directamente en charolas de aluminio herméticas, se sellaron y se escanearon. El escaneo se realizó a una temperatura de entre 0-400 °C a una velocidad de calentamiento de 10°C/min bajo atmósfera de nitrógeno a un flujo de 50 ml/min utilizando un calorímetro DSC Q10 (TA Instruments®, USA), previamente calibrado y ajustado.

3.2.4 Determinación de mecanismo y tipo de liberación del principio activo

El método empleado para la determinación del mecanismo de liberación a partir de NCs o NPs fue adaptado del descrito por Silvana Gjoseva *et al.* (2018) (83). Las pruebas de liberación de fármaco se realizaron bajo condiciones *sink*, empleando una cantidad equivalente a 1 mg de CHX contenida en cada nanosistema seco (NPs o NCs). Los nanosistemas fueron suspendidos en 20 ml de solución amortiguadora de fosfatos pH 7 adicionada con Brij 58® al 2.5%, colocándose en tubos de ensayo termostáticos cerrados, manteniéndolos a 37 °C con un baño de agua y una agitación de 50 rpm con una parrilla de agitación multiplaza. Las condiciones de disolución intentan simular el pH y la fuerza iónica de la saliva y líquido crevicular gingival (pH 7 / 75 mmol/L). A ciertos intervalos de tiempo predeterminados (NPs 0-20 min y NCs 0-100 min), se tomaron muestras de 2 ml del medio de liberación que inmediatamente fueron reemplazados con medio fresco de disolución (SBF pH 7). La cantidad de CHX liberada se determinó empleando el método cromatográfico, a las mismas condiciones y que ha sido previamente descrito. Los resultados obtenidos se ajustaron a los modelos de Higuchi y Korsmeyer-Peppas para determinar el mecanismo de transporte, el tipo de liberación y la cinética de liberación del principio activo.

3.2.5 Pruebas clínicas preliminares (estudio comparativo)

Se planeó el diseño de un modelo experimental comparativo para realizar una prueba de panel, empleando el nanosistema obtenido, como alternativa en el tratamiento de la periodontitis en cualquiera de sus fases y observar con esto la efectividad de los nanosistemas. Para ello, fueron invitados a participar voluntarios sanos, con enfermedad periodontal diagnosticada en un estadio preferentemente moderada-severa (Figura 4). El estudio fue realizado siguiendo los principios de experimentación que envuelven seres humanos establecidos en la declaración de Helsinki. El estudio fue sometido, revisado y aprobado por el comité de ética y bioseguridad del centro de salud TII Manuel Gutiérrez Zavala de la Ciudad de México. La prueba de panel fue realizada evaluando el uso de NCs de CAP cargadas con CHX contra un grupo tratado con una solución comercial que contiene CHX en presentación de enjuague bucal. El procedimiento a realizar fue explicado a cada participante antes de iniciar. Después de recibir su autorización y firmar el consentimiento informado en el cual acuerdan seguir con las indicaciones del tratamiento, se llevó a cabo un proceso de odontoxesis, el cual implica un sondeo periodontal y la eliminación del cálculo supragingival antes de determinar el porcentaje de placa dentobacteriana (PDB) mediante el índice de O`Leary. Para la evaluación del índice el paciente recibió una pastilla reveladora de placa, la cual se disuelve en la cavidad oral tiñendo las superficies que contiene PDB, los datos se registraron en un formulario de registro, donde cada diente se divide en cuatro sectores, (mesial, vestibular, distal y lingual). Para determinar el porcentaje final de PDB, se suma la cantidad de caras teñidas y se divide entre el número total de caras presentes en la cavidad, dicho resultado se multiplica por 100 para expresarse en porcentaje y así poder comparar los resultados (84–86). Por último, los participantes se someten a un procedimiento de profilaxis y después una cantidad equivalente a 9 mg de CHX contenida en el nanosistema (NCs) es aplicada a los pacientes una vez al día, cada tercer día, por un periodo de 15 días. La eficacia del sistema se monitorea mediante la determinación de porcentaje de PDB aplicando el índice de O`Leary como un indicador de la reducción de la placa. El mismo procedimiento fue realizado para el grupo en el cual se empleó una solución comercial de CHX al 0.2% y una dosis de 18 mg, empleándolo una vez al día, cada tercer día, por 15 días.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Resultados y discusión de nanofibras poliméricas.

1.1 Optimización del proceso de electrohilado.

Debido a que en el electrohilado influyen, tanto parámetros relacionados al proceso, como a la solución, es necesario investigar la influencia de cada uno de ellos en la obtención de fibras a partir de soluciones poliméricas de CAP. En las siguientes secciones se presentan los resultados obtenidos de dichas observaciones.

1.1.1 Determinaciones previas.

El equipo armado de electrohilado (*electrospinning*) se muestra en la Figura 12, el cual se compone principalmente de una fuente de poder de alto voltaje (0-100kV), una bomba de infusión, una jeringa con aguja de acero inoxidable (30-31 G) y una placa colectora de acero inoxidable. Idealmente, todo el equipo debe estar contenido en una cámara de acrílico, con la finalidad de controlar la humedad relativa (HR) durante el proceso de electrohilado ya que se ha reportado que esta impacta en la morfología superficial. Cabe mencionar que la HR fue monitoreada constantemente y controlada empleando un agente desecante, con la finalidad de descartar la influencia de este parámetro ambiental en la obtención y morfología de las nanofibras.

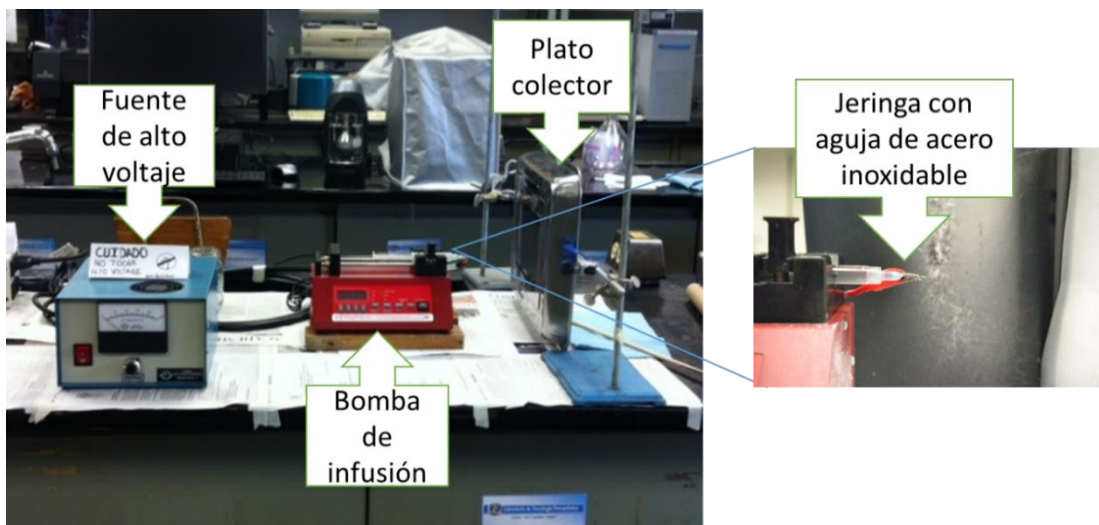


Figura 12. Equipo de electrohilado empleado para la elaboración de Nanofibras poliméricas.

1.1.2 Determinación de la solubilidad del polímero.

Las propiedades de la solución polimérica, las cuales dependen del tipo de disolvente y concentración de polímero, tienen gran influencia en el proceso de electrohilado. El disolvente o mezcla de disolventes deben permitir la completa disolución del polímero, además de poseer puntos de ebullición bajos, preferiblemente por debajo de los 50 °C, lo cual permitiría que se evapore fácilmente en el proceso de estiramiento de las fibras, colectando una membrana compuesta de fibras secas o con la mínima cantidad de disolvente residual, que no permita su fusión. Además, dichos disolventes deben poseer una constante dieléctrica preferiblemente alta, lo que mejoraría las propiedades de conductividad de la solución polimérica y con esto sería menos probable la necesidad de emplear altos voltajes en el proceso de electrohilado. Otra característica importante es que dichos disolventes deben ser preferentemente aprobados para su uso clínico. Se determinó la solubilidad del polímero CAP en diferentes mezclas de disolventes orgánicos a diferentes concentraciones. Como se ha mencionado anteriormente, para la elaboración de NFs poliméricas es necesario que el polímero se encuentre completamente disuelto, además de que los disolventes sean los apropiados para evaporarse rápidamente durante el proceso de electrohilado.

La Tabla 3 muestra que el polímero se encuentra completamente disuelto en las mezclas de disolventes Acetona:Etanol (1:1)(v/v), Acetona:Metanol (1:1)(v/v) y Acetona:Metanol (0.5:1.5)(v/v), a partir de las cuales se obtuvieron soluciones totalmente translúcidas, caso contrario a las mezclas Acetona:Agua (1.7:0.3)(v/v) y Acetona:Isopropanol (1:1)(v/v). Cabe mencionar que la mezcla Acetona:Isopropanol (1:1)(v/v) es altamente volátil, por lo que el CAP se disuelve, pero al evaporarse de la mezcla de disolventes el polímero tiende a precipitarse inclusive antes de emplearse, razón por la que dichas soluciones se descartaron.

Tabla 3. Solubilidad de CAP en diferentes mezclas de disolventes.

Concentración de la solución polimérica	Acetona:Agua (1.7:0.3) (v/v)	Acetona:Etanol(1:1) (v/v)	Acetona:Isopropanol (1:1)(v/v)	Acetona:Metanol (1:1)(v/v)	Acetona:Metanol (0.5:1.5) (v/v)
5%	Ligeramente turbia	Completamente disuelto	Soluble / precipitado	Completamente disuelto	Completamente disuelto
10%	Ligeramente turbia	Completamente disuelto	Soluble / precipitado	Completamente disuelto	Completamente disuelto
15%	Ligeramente turbia	Completamente disuelto	Soluble / precipitado	Completamente disuelto	Completamente disuelto

A partir de dichos resultados se optó por trabajar con aquellas mezclas de disolventes en donde se solubilizará completamente el CAP y que no presentaran cambios físicos durante al menos 1 semana de almacenamiento en refrigeración, aún y cuando se empleen concentraciones altas. En resumen, las mezclas de disolventes empleadas para preparar las soluciones poliméricas serán; Acetona:Etanol(1:1)(v/v); Acetona:Metanol(1:1) (v/v); Acetona:Metanol(0.5:1.5) (v/v) y a partir de la cuales se realizaron las pruebas de formación de fibras.

Otras de las propiedades de la solución polimérica que tendrán influencia en el proceso de electrohilado son la viscosidad y conductividad. Las Tablas 4 y 5 muestran las propiedades de viscosidad y conductividad de las soluciones poliméricas a diferente concentración de CAP, empleadas en las pruebas cualitativas de formación de fibras.

Tabla 4. Viscosidad de soluciones poliméricas a diferentes concentraciones empleando diferentes mezclas de disolventes.

Concentración (%)	Acetona:Agua (0.97:0.03) (Poise)	Acetona:Etanol(1:1) (Poise)	Acetona: Isopropanol (1:1) (Poise)	Acetona:Metanol (1:1) (Poise)	Acetona:Metanol(0.5:1.5) (Poise)
5%	0.594	0.432	0.353	0.576	0.432
10%	1.102	1.815	1.920	0.655	0.961
15%	2.630	2.450	3.600	3.710	4.176

Tabla 5. Conductividad de soluciones poliméricas a diferente concentración empleando diferentes mezclas de disolventes.

Concentración (%)	Acetona:Agua (0.9797:0.03) (mV)	Acetona:Etanol(1:1) (mV)	Acetona: Isopropanol (1:1)(mV)	Acetona/Metanol (1:1) (mV)	Acetona:Metanol (0.5:1.5) (mV)
5%	34	24.66	15.33	37.33	35.33
10%	39.33	32.33	17.33	51	52.33
15%	38.66	59	15	58.33	55.33
20%	50	40	16	57	57

En la Tabla 6 se resumen algunas de las propiedades fisicoquímicas de los disolventes orgánicos empleados para la preparación de las soluciones poliméricas. Cabe destacar que la mayoría de ellos posee puntos de ebullición bajos, por debajo de los 65 °C, lo que permitiría una rápida evaporación del disolvente en el proceso de estiramiento de las fibras, además de poseer una tensión superficial baja, menor a la del agua, que nos haría pensar que voltajes altos, no son necesarios para obtener fibras a partir de soluciones poliméricas que empleen este tipo de disolventes. Una desventaja es que poseen una constante dieléctrica baja, lo cual no es favorable para el proceso de electrohilado, ya que no podrían conducir las cargas eléctricas eficientemente, esto puede ser contrarrestado, ya sea por las propiedades inherentes del propio polímero empleado o agregando un agente químico que mejore las propiedades de conductividad.

Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas de los disolventes empleados en la preparación de soluciones poliméricas.

Disolventes	Tensión superficial (dina/cm)	Constante dieléctrica	Punto de ebullición (°C)	Densidad (g/ml)
Acetona	25.2	21	56.1	1.786
Metanol	22.3	33	64.5	0.791
Etanol	22.7	24	78.3	0.789

1.2 Influencia cualitativa de parámetros relacionados al proceso en la formación de NFs.

Empleando soluciones poliméricas a diferentes concentraciones (5-15%) y que emplean como disolvente las mezclas Acetona:Etanol(1:1)(v/v) (Disolvente A); Acetona:Metanol(1:1)(v/v) (Disolvente B) y Acetona:Metanol(0.5:1.5)(v/v) (Disolvente C), se realizaron pruebas de formación de fibras por electrohilado, teniendo como variable principal, el voltaje aplicado, con la finalidad de observar cualitativamente su influencia tanto en la EP como en el tipo de fibras obtenidas. Se realizaron un total de 144 experimentos de electrohilado, los cuales se resumen en la Figura 13 y Figura 14. En la Figura 14 se muestran imágenes obtenidas por microscopía óptica a un aumento de 100 X, en las cuales se observó que es posible

obtener fibras de CAP a partir de cierto rango de concentraciones de polímero, las cuales aparentemente disminuyen de tamaño de acuerdo con el tipo de disolvente empleado y concentración de polímero presente.

Uno de los principales parámetros del proceso, que afectan directamente en la formación, morfología y tamaño de las fibras es la fuerza del voltaje aplicado. Para observar esto, tres diferentes series de soluciones poliméricas fueron empleadas, variando la concentración de polímero y tipo de disolvente. Las soluciones poliméricas fueron electrohiladas aplicando diferentes voltajes en un rango de entre 7-15 kV. Teóricamente, un chorro líquido de bajo peso molecular impulsado eléctricamente formará gotas de diámetro pequeño (electroatomización). La formación de estas gotas se debe principalmente a la ruptura capilar del chorro giratorio por efecto de la tensión superficial. Para soluciones de polímeros, el patrón de ruptura cambia radicalmente, en lugar de romperse rápidamente, filamentos entre las gotas son formados y estabilizados, formando una estructura estable de perlas en cuerda (fibras con gotas). La razón de esto, es que las macromoléculas en espiral del polímero disuelto se transforman por el flujo de alargamiento del chorro, en redes orientadas y enredadas que persisten a medida que la fibra se solidifica. La contracción del radio del chorro, que es impulsada por la tensión superficial, hace que la solución restante forme perlas. A medida que aumenta la viscosidad de la solución, las perlas se hacen más grandes, la distancia promedio entre perla y perla es más larga, el diámetro de las fibras aumenta y la forma de las perlas cambia de esférica a forma de hueso (esfera contraída) (87).

En general, los resultados obtenidos muestran que cuando bajos voltajes son aplicados, no es posible llevar a cabo el proceso de electrohilado y sólo gotas, fibras cortadas o discontinuas son obtenidas debido a que el voltaje no es lo suficientemente grande para superar la tensión superficial de la gota de la solución polimérica y sólo se obtiene un proceso de atomizado a partir de una solución de baja concentración. También fibras cortadas y en forma de cinta son obtenidas a partir de soluciones con alta concentración de polímero. Cabe destacar que empleando voltajes en un rango de entre 12-15 kV son obtenidas fibras con una gran presencia de perlas y que aparentemente incrementan de tamaño al incrementar la concentración de la solución polimérica de entre 8-10%. Las fibras llegan a ser más uniformes y disminuye la presencia de perlas debido al aumento

de la viscosidad en soluciones por arriba del 11%, probablemente a que el voltaje es el adecuado para sobrellevar la tensión superficial de la gota de solución polimérica a partir de la cual será expulsado el chorro. Se debe tener especial cuidado con este parámetro ya que si se aplican voltajes muy elevados es posible obtener fibras en forma de cintas, lo que modificaría su relación volumen-superficie. A partir de estas observaciones, meramente cualitativas, se estableció que las condiciones óptimas de voltaje para obtener fibras uniformes en cuanto a longitud y diámetro de tamaño submicronico, preferentemente nanométrico y con poca presencia de perlas, empleando soluciones poliméricas de CAP, voltajes en un rango de entre 11-13 kV, preferentemente 12.5 Kv, son necesarios. Como se observa en la Figura 14 es posible obtener fibras uniformes aplicando este voltaje a ciertas concentraciones de polímero.

Voltaje aplicado (kV)	Sol. 5% A	Sol. 5% B	Sol. 5% C	Sol. 7% A	Sol. 7% B	Sol. 7% C	Sol. 8% A	Sol. 8% B	Sol. 8% C	Sol. 9% A	Sol. 9% B	Sol. 9% C	Sol. 10% A	Sol. 10% B	Sol. 10% C	Sol. 11% A	Sol. 11% B	Sol. 11% C	Sol. 12% A	Sol. 12% B	Sol. 12% C	Sol. 15% A	Sol. 15% B	Sol. 15% C	
5	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	
7.5	↓	t	↓	↓	↓	↓	↓	*	↓	↓	↓	↓	t*	↓	↓	↓	↓	↓	t	t*	t*	t*	↓	↓	
10	↓	t	↓	*	↓	↓	↓	*	↓	↓	*	*	t*	*	*	*	*	t*	t*	↓	t*	t*	t*	↓	↓
12.5	↓	a	↓	↓	*	↓	↓	t*	*	a	*	*	t*	*	*	*	*	t*	t*	t*	t*	t*	t*	t*	↓
15	↓	a	*	↓	a	*	*	*	t*	a	*	*	t*	*	t*	t*	t*	t*	t*	t*	t*	t*	t*	t*	↓
20	↓	a	↓	↓	a	↓	↓	↓	t	a	t*	t*	t*	t*	t*	t*	t*	t*	t*	t*	t*	t*	t*	t*	↓

Se forman gotas con fibras pero estas no son continuas
 Se forman gotas con fibras pero estas no son continuas
 Se forman gotas con fibras mas continuas
 Se forman gotas con fibras mas continuas
 Se forman fibras pero su apariencia es de cinta

CODIGO DE COLORES

	Formación de fibras uniformes
	Formación de fibras con gotas
	Formación de gotas
	No se obtienen sistemas

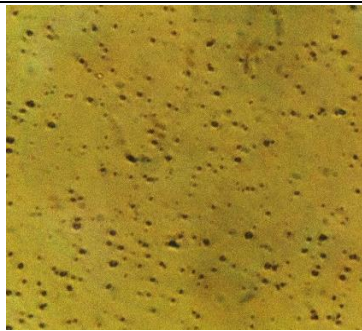

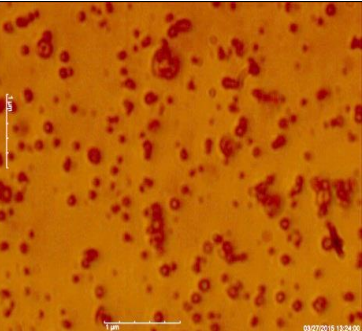
Condiciones de trabajo

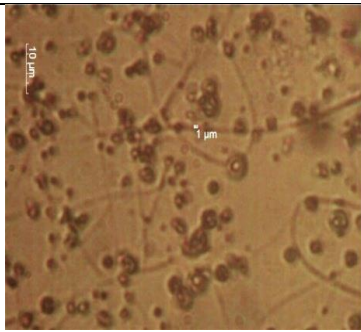
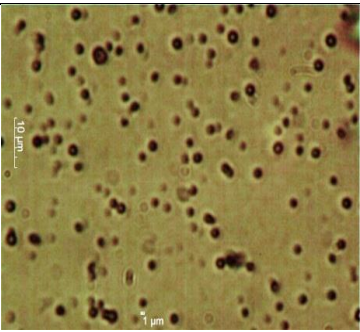
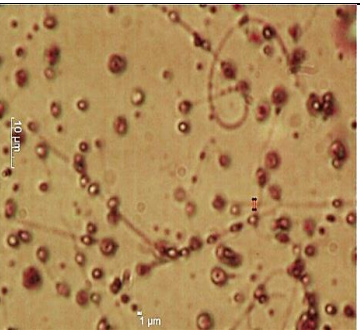
Distancia 20 cm
 Velocidad de flujo 10 µl/min
Disolventes
A Acetona: Etanol (1:1)(v/v)
B Acetona: Metanol (1:1)(v/v)
C Acetona: Metanol (0.25:0.75)(v/v)


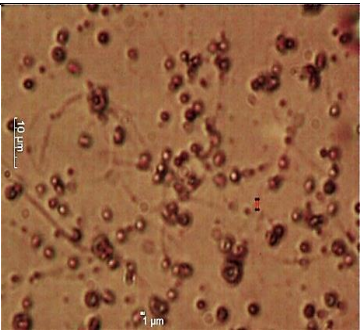

Notas

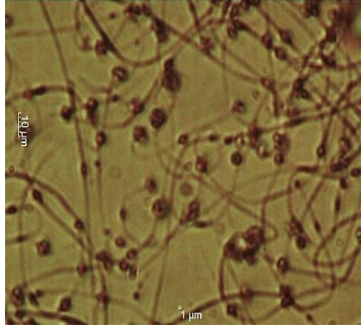
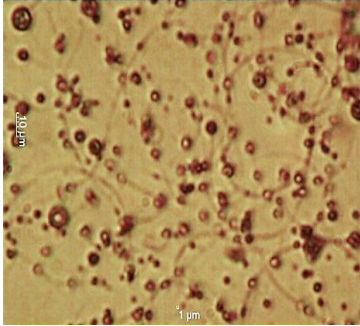
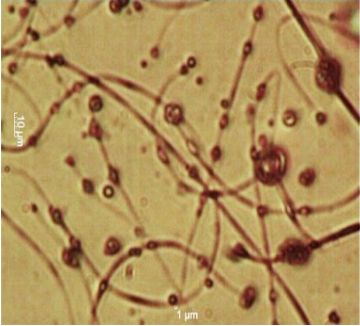
*	Fibras con diámetro aparentemente pequeño
t*	taponamiento de aguja, pero obtención de fibras con diámetro pequeño
↓	Chorro de solución polimérica de la punta
a	Acumulación de solución polimérica seca

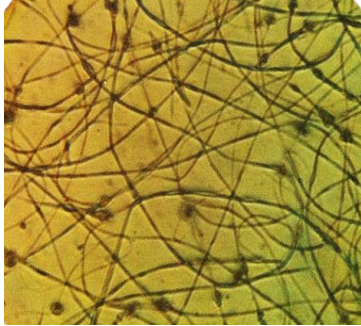
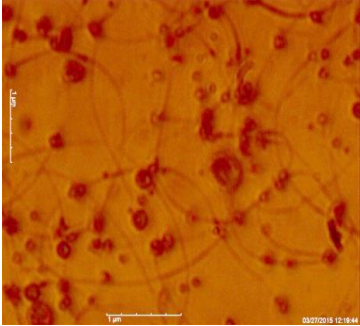
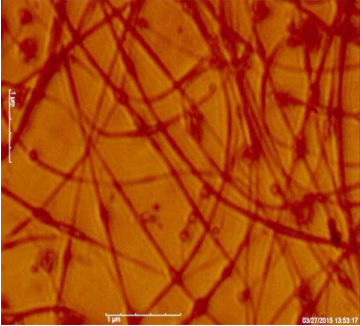
Figura 13. Formación de fibras empleando soluciones poliméricas a diferentes concentraciones, mezclas de disolventes en diferente proporción y variación de voltaje en un rango de 5-20 kV.

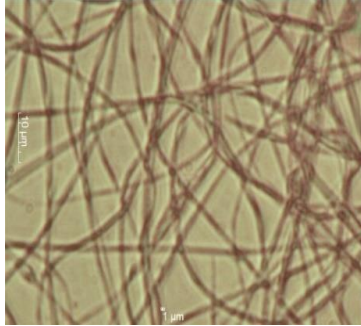

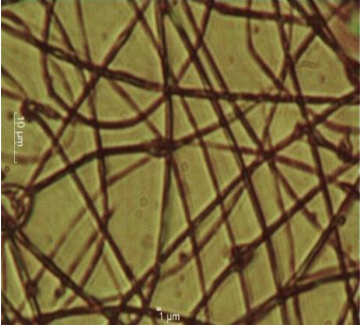
Solución 5 %, Disolvente A Voltaje 7.5 kV, Vel. flujo 10µL/min	Solución 5 %, Disolvente B Voltaje 7.5 kV, Vel. flujo 10µL/min	Solución 5 %, Disolvente C Voltaje 12.5 kV, Vel. flujo 10µL/min
		
<p>Solo se observan gotas muy pequeñas.</p>	<p>Al aumentar el voltaje las gotas incrementan de tamaño y se empiezan a aglomerar.</p>	<p>Conforme se aumenta el voltaje, el tamaño de las gotas incrementa y parecen aglomerarse.</p>

Solución 7 %, Disolvente A Voltaje 12.5 kV, Vel. flujo 10µL/min	Solución 7 %, Disolvente B Voltaje 10 kV, Vel. flujo 10µL/min	Solución 7 %, Disolvente C Voltaje 20 kV, Vel. flujo 10µL/min
		
<p>Al aumentar el voltaje las gotas crecen y disminuye la recolección, existe una aparente formación de fibras de diámetro pequeñas unidas a ellas</p>	<p>Al aumentar el voltaje aumenta el tamaño y uniformidad de las gotas.</p>	<p>A voltajes menores hay una mínima presencia de fibras, no son continuas ni uniformes, hay gotas unidas a ellas.</p>

Solución 8 %, Disolvente A Voltaje 15 kV, Vel. flujo 10µL/min	Solución 8 %, Disolvente B Voltaje 15 kV, Vel. flujo 10µL/min	Solución 8 %, Disolvente C Voltaje 20 kV, Vel. flujo 10µL/min
		
<p>Se obtienen fibras con gotas. Al aumentar el voltaje el tamaño de las gotas aumenta, parecen aglomerarse, las fibras no cambian, pero disminuye la recolección.</p>	<p>Se obtienen fibras con gotas. Al aumentar el voltaje el tamaño de las gotas presentes aumenta, solo a este voltaje hay mayor presencia de fibras aparentemente de diámetro pequeño.</p>	<p>Se obtienen fibras con gotas. A voltajes bajos no se forman fibras, pero a voltajes mayores a 15kV se empiezan a formar, de igual manera al aumentar el voltaje el tamaño de las gotas presentes aumenta.</p>

<p>Solución 9 %, Disolvente A Voltaje 12.5 kV, Vel. flujo 10µL/min</p>	<p>Solución 9 %, Disolvente B Voltaje 12.5 kV, Vel. flujo 10µL/min</p>	<p>Solución 9 %, Disolvente C Voltaje 15 kV, Vel. flujo 10µL/min</p>
		
<p>Se obtienen fibras con gotas. Al aumentar el voltaje las gotas presentes aumentan de tamaño. La longitud de la fibra obtenida entre gota y gota es mayor, así como su diámetro.</p>	<p>Se obtienen fibras con gotas. Al aumentar el voltaje disminuye la continuidad y uniformidad de las fibras y aumenta el tamaño de las gotas.</p>	<p>Se obtienen fibras con gotas. La longitud de la fibra obtenida entre gota y gota es corta. Al aumentar el voltaje el diámetro de las fibras aumenta al igual que el de las gotas presentes.</p>

<p>Solución 10 %, Disolvente A Voltaje 12.5kV, Vel. flujo 10µL/min</p>	<p>Solución 10%, Disolvente B Voltaje 12.5 kV, Vel. flujo 10µL/min</p>	<p>Solución 10%, Disolvente C Voltaje 15 kV, Vel. flujo 10µL/min</p>
		
<p>La longitud de las fibras obtenidas entre gota y gota aumenta. Se obtienen fibras más uniformes y la presencia de gotas disminuye. Al disminuir la velocidad de flujo a 5 µL/min el diámetro de las fibras disminuye.</p>	<p>Se obtienen fibras con gotas. La longitud de la fibra obtenida entre gota y gota aumenta. El diámetro de la fibra es pequeño. Al aumentar el voltaje el tamaño de las gotas presentes aumenta así como el diámetro de las fibras.</p>	<p>Se obtienen fibras con gotas. La longitud de la fibra obtenida entre gota y gota es grande, por lo que se aprecia poca presencia de gotas. El diámetro de la fibra obtenida aumenta. Al aumentar el voltaje las fibras se aplanan. La recolección se ve disminuida.</p>

<p>Solución 11 %, Disolvente A Voltaje 20 kV, Vel. flujo 10µL/min</p>	<p>Solución 11 %, Disolvente B Voltaje 15 kV, Vel. flujo 10µL/min</p>	<p>Solución 11 %, Disolvente C Voltaje 20 kV, Vel. flujo 10µL/min</p>
		
<p>Al aumentar el voltaje el diámetro de las fibras aumenta y la presencia de gotas es mínima.</p>	<p>Al aumentar el voltaje el diámetro de las fibras y las gotas aumentan. La recolección se ve disminuida.</p>	<p>Al aumentar el voltaje desaparece la formación de gotas en las fibras pero el diámetro de las fibras aumenta.</p>

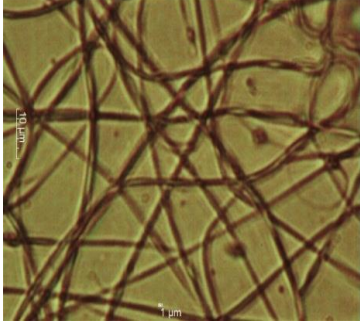
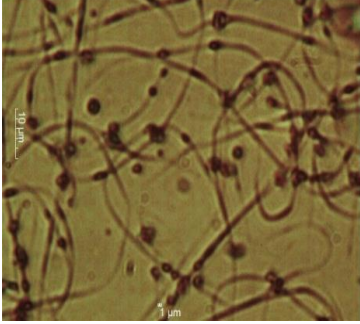

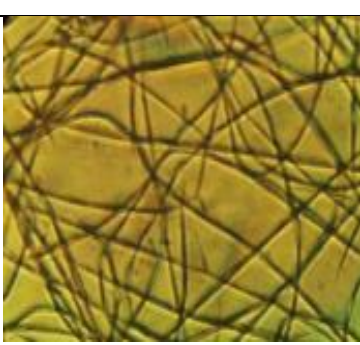
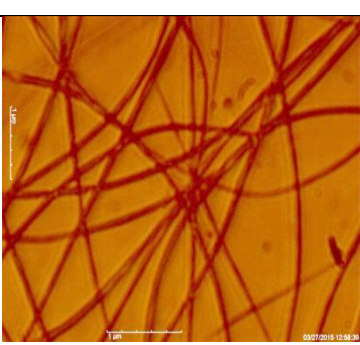
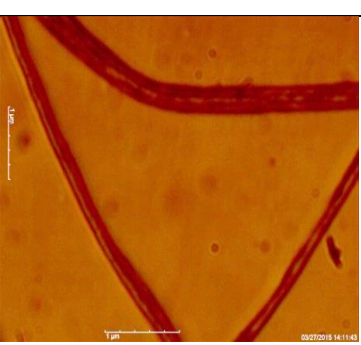
Solución 12 %, Disolvente A Voltaje 20 kV, Vel. flujo 10µL/min	Solución 12 %, Disolvente B Voltaje 15 kV, Vel. flujo 10µL/min	Solución 12 %, Disolvente C Voltaje 12.5 kV, Vel. flujo 10µL/min
 <p data-bbox="198 598 587 709">Al aumentar el voltaje las gotas desaparecen, aparentemente las fibras son continuas en longitud y su diámetro aumenta.</p>	 <p data-bbox="612 598 1002 682">Al aumentar el voltaje desaparecen las gotas pero aumenta el diámetro de las fibras.</p>	 <p data-bbox="1029 598 1419 709">Al aumentar el voltaje desaparecen las gotas, pero también aumenta el diámetro de las fibras.</p>
Solución 15 %, Disolvente A Voltaje 12.5 kV, Vel. flujo 10µL/min	Solución 15 %, Disolvente B Voltaje 12.5 kV, Vel. flujo 10µL/min	Solución 15 %, Disolvente C Voltaje 7.5 kV, Vel. flujo 10µL/min
 <p data-bbox="198 1171 587 1283">Al aumentar el voltaje se observan cambios aparentes en el diámetro y uniformidad de las fibras.</p>	 <p data-bbox="612 1171 1002 1304">Al aumentar el voltaje no se aprecian cambios aparentes en el diámetro y longitud de las fibras, además de ser continuas. El diámetro de las fibras aumenta.</p>	 <p data-bbox="1029 1171 1419 1304">Al aumentar el voltaje no hay cambios, el polímero se acumula en la punta de la aguja debido a la rápida evaporación del disolvente.</p>

Figura 14. Imágenes obtenidas por microscopia óptica 100 X de muestras obtenidas del proceso de electrohilado al emplear soluciones poliméricas de diferente concentración y tipo de disolvente.

Uno de los parámetros experimentales del proceso que no impacta directamente en la morfología y tamaño de las fibras, pero repercutirá en la EP, es la velocidad de flujo, la cual determina la cantidad de solución polimérica disponible en la punta de la aguja, lista para llevar a cabo el proceso de estiramiento.

Hipotéticamente, cuando se aplican altas velocidades de flujo se puede causar una disminución en la EP debido a que hay un límite en la velocidad de alimentación de la boquilla (aguja) y velocidades altas pueden provocar el goteo de la solución de la boquilla, por la fuerza de gravedad y por otro lado, cuando hay una gran cantidad

de solución de polímero, el cono de Taylor no se puede mantener uniformemente para obtener un chorro estable, debido al campo eléctrico insuficiente experimentado por las boquillas, lo que resulta en una extracción inadecuada de la solución. Además, los caudales altos pueden causar un secado insuficiente, lo que ocasiona defectos en las fibras y estructuras planas en forma de cinta, debido a que el campo eléctrico no fue suficiente para hacer girar toda la solución (88). Durante las pruebas realizadas se varió la velocidad de flujo (10, 15, 30 $\mu\text{L}/\text{min}$), observándose que altas velocidades de flujo provocan un exceso de solución polimérica en la punta de la aguja que no puede ser electrohilada además de acumularse y probablemente provocar el taponamiento de la aguja. Teniendo lo anterior presente, la velocidad de flujo fue disminuida hasta un rango en donde la acumulación de polímero en la punta de la aguja fuera la mínima, siendo esta 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, además se controló que el voltaje aplicado no exceda los 12.5 kV, con lo que se esperaba obtener fibras uniformes.

Varios autores han reportado que la distancia entre la punta de la aguja y el colector es otro factor que puede influir en el tamaño y la morfología de las fibras obtenidas, por lo que han propuesto que la distancia óptima debería estar en el rango de los 10 a 20 cm, lo que se considera una distancia de giro efectiva con los métodos convencionales de electrohilado. La distancia debe permitir la evaporación del disolvente para obtener fibras poliméricas secas y al mismo tiempo permitir el estiramiento lo suficiente como para ser recogido en forma de malla no tejida (42). De acuerdo con lo observado, la distancia óptima entre la aguja y el colector para obtener una membrana de fibras secas fue establecida en 15 cm, distancia suficiente para permitir la evaporación del disolvente y el estiramiento de las fibras. Por otro lado, además del tipo de disolventes empleados para lograr la disolución del polímero, se deben tomar en cuenta otras propiedades de la solución que influyen en el proceso de electrohilado, tipo y morfología de fibras obtenidas empleando dicha técnica.

La viscosidad es una de las propiedades de la solución a considerar en el proceso de electrohilado, esta se relaciona estrechamente con el entrelazamiento físico de las cadenas poliméricas dentro de la solución. Cuando la viscosidad de la solución es muy baja el fenómeno de electroatomizado puede ocurrir, formándose partículas en lugar de fibras. Durante el estiramiento de la fibra, es el entrelazamiento de las

cadena molecular lo que impide que el flujo sea discontinuo, por lo tanto, factores que afectan la viscosidad de la solución polimérica impactarán directamente en el proceso de electrohilado y con ello en la forma y tamaño de las fibras resultantes. En las pruebas realizadas (Figura 14), donde se emplean soluciones poliméricas a diferentes concentraciones (5-15%) se puede observar que cuando son empleadas soluciones poliméricas con baja concentración de polímero, además de bajos voltajes, el proceso de electrohilado no tiene lugar, obteniéndose sólo un atomizado de pequeñas partículas, pero conforme se incrementa la concentración de polímero y con ello la viscosidad de las soluciones además del voltaje aplicado en ciertos intervalos es posible obtener fibras de diferente morfología y tamaño.

Adicionalmente, la conductividad de la solución polimérica sometida a electrohilado influirá en si es posible llevar a cabo el estiramiento de la gota polimérica bajo ciertas condiciones además de repercutir en el tipo y tamaño de fibra recolectada. Como se ha mencionado, el electrohilado involucra el estiramiento de una microgota de solución polimérica, lo cual es causado por la repulsión de las cargas superficiales presentes en la solución, de esta manera si la conductividad de la solución es alta, más cargas podrán ser transportadas por el jet y un mayor estiramiento e inestabilidad tendrá el flujo, lo que disminuye la energía necesaria para llevar a cabo el estiramiento, es decir menores voltajes son necesarios. A partir de los resultados obtenidos podemos observar que las soluciones poliméricas que presentan una mejor conductividad son las que emplean como disolvente Acetona:Metanol (1:1)(v/v) pero sólo a concentraciones superiores al 8%, estas soluciones poliméricas, tienden a formar fibras más uniformes y aparentemente con un diámetro pequeño, además de que con este tipo de soluciones no es necesario emplear voltajes mayores a 12.5kV.

En general se puede observar que los mejores sistemas obtenidos aparentemente son aquellos formados a partir de soluciones poliméricas en un rango de concentraciones de 9-12% y un voltaje de 12.5 kV empleando como disolventes Acetona:Etanol (1:1)(v/v) y Acetona:Metanol (1:1)(v/v).

Por otro lado, cuando se emplea como disolvente Acetona: Metanol (0.5:1.5) se puede observar que empleando concentraciones menores al 7% p/v no es posible obtener fibras, pero conforme se incrementa la concentración de polímero en las soluciones se obtienen fibras de diferente morfología (fibras con gotas) hasta el

punto en que a concentraciones superiores al 10% p/v, la presencia de gotas disminuye y las fibras parecen ser más continuas y de tamaño micrométrico. Una desventaja al emplear esta mezcla de disolventes como disolvente de la solución es que presenta una rápida velocidad de evaporación, debido a la diferencia de proporciones en los disolventes, tal es el caso, que la gota de solución polimérica llega a solidificarse apenas sale de la punta de la aguja, cuando voltajes por debajo de los 10 kV son aplicados, lo que provoca un constante taponamiento de la punta de la aguja y con ello un bajo rendimiento en el proceso. Debido a esto, dicha solución polimérica fue descartada para la obtención de fibras.

En la Figura 15 se muestra una fibra con presencia de perla (gota) obtenida por electrohilado, al centro se puede apreciar que la estructura es porosa, tal efecto puede ser debido a dos parámetros importantes a considerar. El primero, la presencia de una humedad relativa alta, en donde la presencia de partículas de agua en el ambiente, pueden ser atrapadas en la matriz de las fibras o perlas durante el proceso de estiramiento, lo que provocaría que, al recolectarse y secarse, esta mínima cantidad de agua se evapore, dejando espacios vacíos que formarán los poros. Debido a esto es importante mantener un estricto control de la humedad relativa de trabajo. En segundo lugar, el tipo de disolvente empleado, en donde el disolvente al poseer un punto de ebullición alto no se alcanza a evaporar en su totalidad durante el proceso de estiramiento, por lo que partículas de disolvente al evaporarse darán lugar al mismo fenómeno de porosidad.

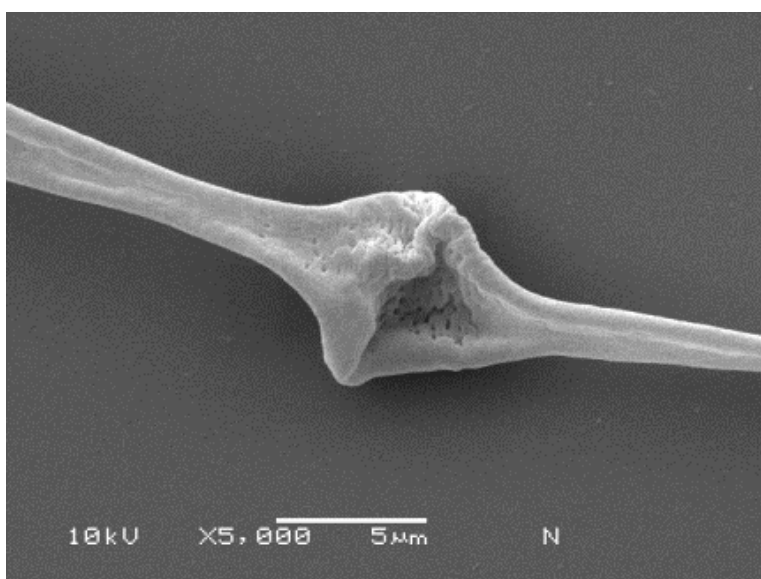


Figura 15. Micrografía de fibra polimérica de CAP, influencia de la humedad y tipo de disolvente.

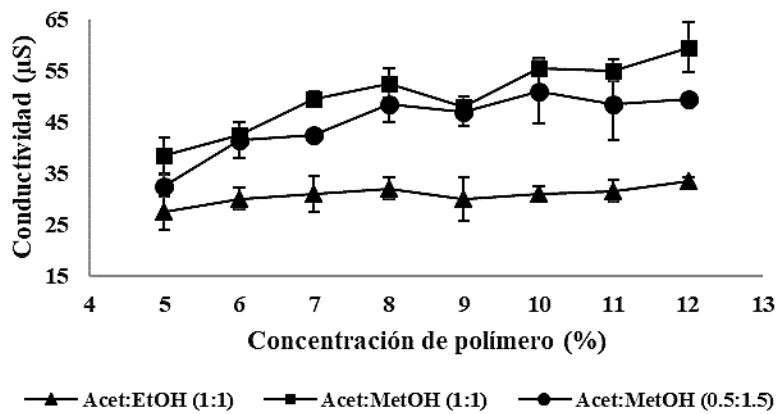
1.3 Influencia de los parámetros de la solución polimérica en la formación de NFs.

Otros factores que afectan el tamaño del diámetro, la morfología de las fibras y la EP del electrohilado, son los parámetros relacionados a la solución polimérica, entre los cuales se encuentran la concentración de polímero, estrechamente relacionada con la viscosidad, la conductividad y la tensión superficial. Estos parámetros de la solución impactarán directamente en la morfología y tamaño de las fibras obtenidas sin dejar de lado las condiciones de proceso en las cuales son obtenidas y las cuales han sido previamente optimizadas.

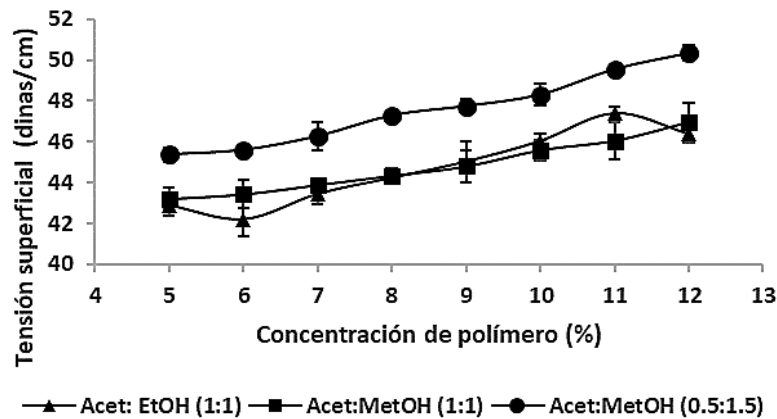
Las soluciones poliméricas empleadas fueron aquellas en donde la concentración de polímero está en el rango de 5-15% y los disolventes empleados son Acetona: Etanol(1:1)(v/v), Acetona:Metanol(1:1)(v/v) y Acetona:Metanol(0.5:1.5)(v/v). La Figura 16 a-c y la Tabla 7 muestran las propiedades de las soluciones poliméricas a las diferentes concentraciones empleadas.

La Figura 16 a-c muestra el comportamiento de las diferentes propiedades de las soluciones poliméricas de CAP empleadas, a diferente concentración (5-12%) y las cuales se disolvieron en tres diferentes disolventes. La Figura 16-a y 16-b muestra las propiedades de conductividad y tensión superficial respectivamente. Estos parámetros son dependientes de las propiedades del polímero y disolventes empleados. En la Figura 16-a podemos observar el comportamiento de la conductividad de las soluciones poliméricas a diferente concentración, a partir de los resultados obtenidos se observó que existe diferencia estadísticamente significativa en la conductividad de la solución polimérica cuando la concentración y el tipo de disolvente cambia, (p-valor= 0.0000, Anexo 2). Donde, las soluciones poliméricas que presentan mejores valores de conductividad son aquellas cuya concentración está por arriba del 10% y emplean la mezcla de disolventes Acetona:Metanol(1:1)(v/v), seguida por la mezcla Acetona:Metanol(0.5:1.5)(v/v) y Acetona:Etanol(1:1)(v/v). Con respecto a la Figura 16-b, el incremento de la tensión superficial tiene una diferencia estadísticamente significativa cuando la concentración de polímero es incrementada (p-valor = 0.0000) y se emplea diferente tipo de disolvente (p-valor =0.0000) (Anexo 2) en todas las concentraciones probadas. Desde este punto de vista, las soluciones poliméricas que presentan una

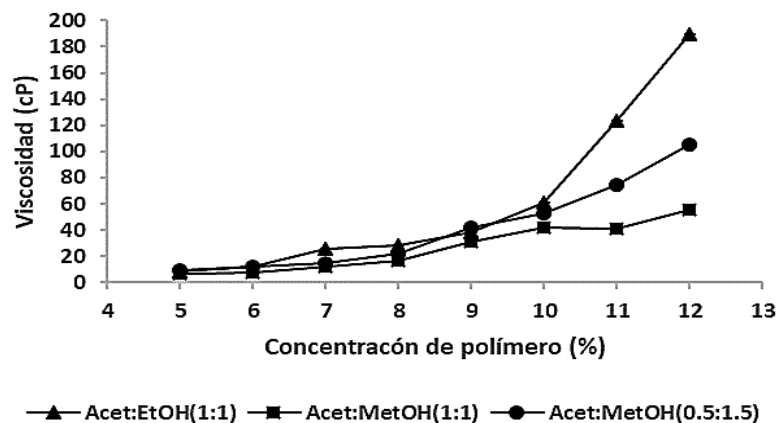
mayor tensión superficial son aquellas que emplean la mezcla de disolventes Acetona:Metanol(0.5:1.5)(v/v), seguida por aquellas que usan las mezclas Acetona:Metanol(1:1)(v/v) y Acetona:Etanol(1:1)(v/v), las cuales muestran un comportamiento muy similar. Cabe mencionar que altas tensiones superficiales involucran el uso de voltajes mucho más elevados que pueden causar una disminución en la EP de electrohilado o bien la formación de fibras con presencia de perlas y en algunos casos cuando el voltaje es demasiado elevado la formación de fibras en forma de cintas. La Figura 16-c muestra la tendencia de la viscosidad de las soluciones poliméricas empleadas. Se puede observar que la viscosidad de las soluciones poliméricas es directamente proporcional a la concentración de polímero presente, con respecto a esto, se observó que la concentración de CAP es estadísticamente significativa sobre la viscosidad de las soluciones (p -valor = 0.0000). En este caso, las soluciones que presentan una alta viscosidad son aquellas que emplean como disolvente la mezcla Acetona:Etanol(1:1)(v/v) seguidas por la mezcla Acetona:Metanol(0.5:1.5)(v/v) y Acetona:Metanol(1:1)(v/v). Esto significa que las diferentes mezclas de disolventes empleadas tienen un efecto estadísticamente significativo (p -valor = 0.0000) sobre la viscosidad de la solución. En resumen, el tipo de disolvente empleado afecta las propiedades de la solución polimérica preparadas a partir del polímero CAP. Teo *et al.* han reportado que, para obtener fibras uniformes, la concentración de la solución debe ser mantenida al mínimo y el disolvente debe constituir más del 70% de la masa de la solución, por lo que, sólo una fracción de la solución que pasa a través de la aguja y se estira, en realidad contribuye a la masa de la NFs producidas (89). La mezcla de disolventes Acetona:Metanol(0.5:1.5)(v/v) posee un bajo punto de ebullición, lo que causa el incremento en la viscosidad de la solución al tener una velocidad de evaporación alta. Además de causar el taponamiento de la aguja por la misma situación, lo que provoca una disminución en el rendimiento del proceso de electrohilado, lo cual no sería favorable como método de fabricación. Debido a esto, dicha solución fue descartada como formadora de fibras.



(a)



(b)



(c)

Figura 16. Propiedades de las soluciones poliméricas empleando diferente concentración de polímero y mezcla de disolventes; **a)** Conductividad, **b)** Tensión superficial, **c)** Viscosidad.

Tabla 7. Parámetros de las soluciones poliméricas empleadas para la elaboración de fibras por la técnica de electrohilado.

Concentración (%)	Acetona:Etanol (1:1)			Acetona: Metanol (1:1)			Acetona:Metanol (0.5:1.5)		
	Tensión Superficial (dina/cm)	Conductividad (μS)	Viscosidad (cP)	Tensión Superficial (dina/cm)	Conductividad (μS)	Viscosidad (cP)	Tensión Superficial (dina/cm)	Conductividad (μS)	Viscosidad (cP)
5	42.89	30	8.68	43.22	40	6.57	45.37	30	9.30
6	42.21	30	11.69	43.45	40	7.58	45.59	40	11.72
7	43.45	30	25.7	43.90	50	11.81	46.27	40	14.50
8	44.24	30	28.13	44.35	50	16.31	47.29	50	21.55
9	45.03	30	38.36	44.80	50	30.57	47.74	50	41.96
10	46.05	30	60.63	45.59	60	41.63	48.30	50	52.40
11	47.40	30	123.52	46.05	60	40.86	49.54	50	74.16
12	46.38	30	189.69	46.95	60	55.40	50.33	50	105.67

Tomando en cuenta las observaciones cualitativas realizadas referentes a los parámetros del proceso y parámetros de la solución, se empleó un diseño de experimentos factorial multinivel, como herramienta estadística, para observar si los parámetros de la solución polimérica (conductividad, tensión superficial, viscosidad), además de los parámetros experimentales (voltaje, velocidad de flujo), influyen en la morfología y tamaño de las fibras (Figura 17). En dicho diseño, sólo se emplearon aquellas soluciones poliméricas con concentraciones en el rango de 9-12% y las dos mezclas de disolventes que presentaron mejores propiedades, Acetona:Etanol(1:1)(v/v) y Acetona:Metanol(1:1)(v/v), cuyas características son las bajas tensiones superficiales, buenas propiedades de conductividad y viscosidad. La Figura 18 a-h muestran los resultados obtenidos por microscopia óptica a partir de las soluciones poliméricas empleadas en el diseño.

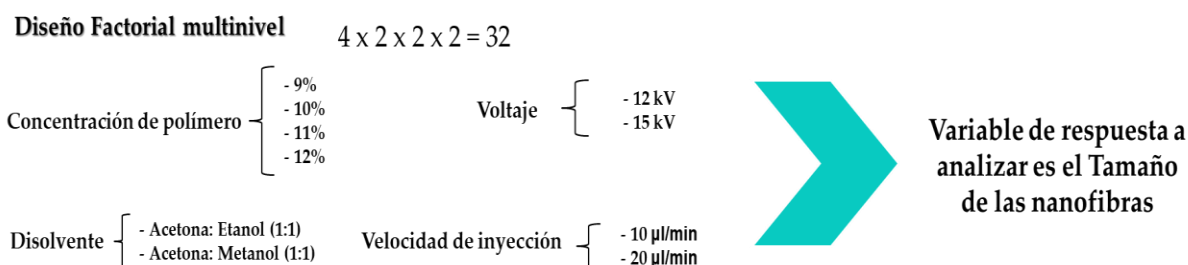
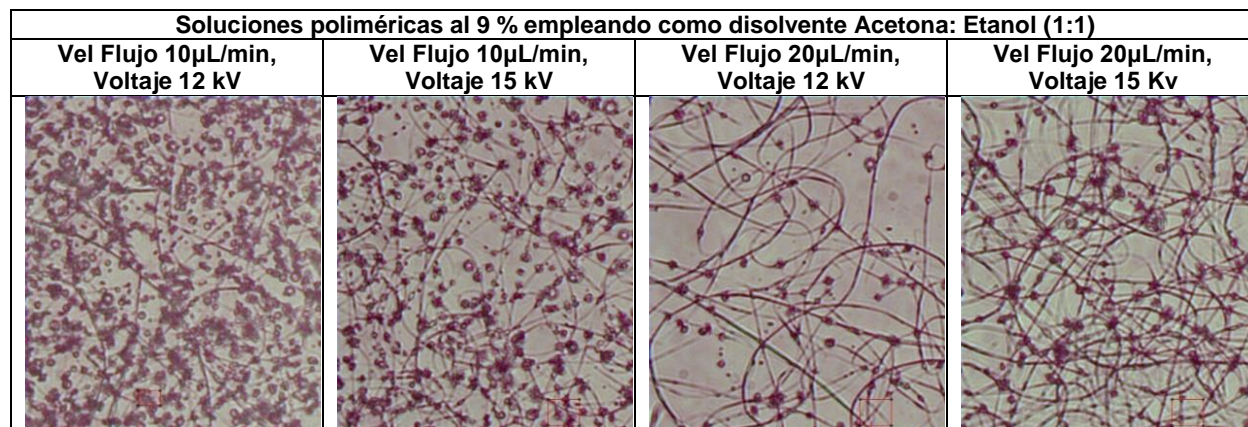


Figura 17. Diseño de experimentos empleado, tomando en cuenta las condiciones de proceso y solución como variables que afectan en el diámetro de las fibras.



(a)

Soluciones poliméricas al 9 % empleando como disolvente Acetona: Metanol (1:1)			
Vel Flujo 10 μ L/min, Voltaje 12 kV	Vel Flujo 10 μ L/min, Voltaje 15 kV	Vel Flujo 20 μ L/min, Voltaje 12 kV	Vel Flujo 20 μ L/min, Voltaje 15 kV

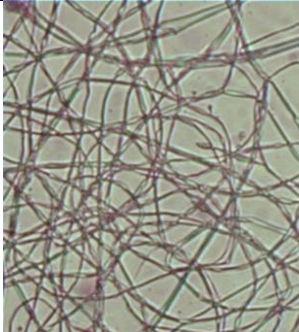
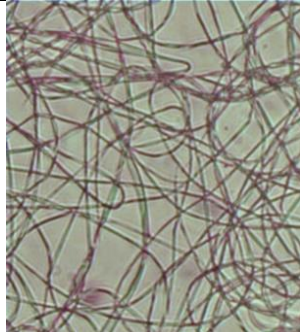
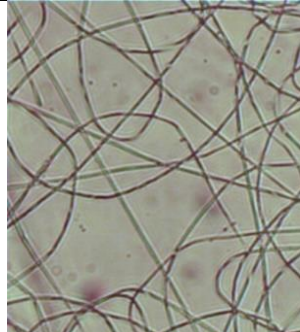
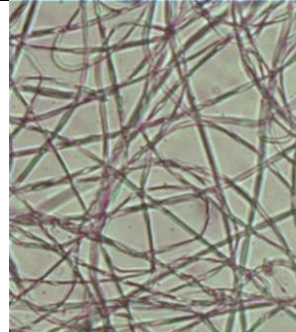
(b)

Soluciones poliméricas al 10 % empleando como disolvente Acetona: Etanol (1:1)			
Vel Flujo 10 μ L/min, Voltaje 12 kV	Vel Flujo 10 μ L/min, Voltaje 15 kV	Vel Flujo 20 μ L/min, Voltaje 12 kV	Vel Flujo 20 μ L/min, Voltaje 15 kV

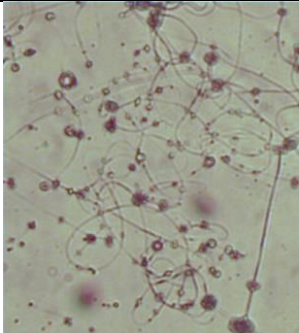
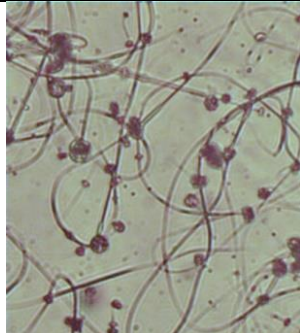
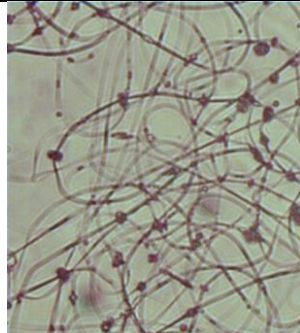
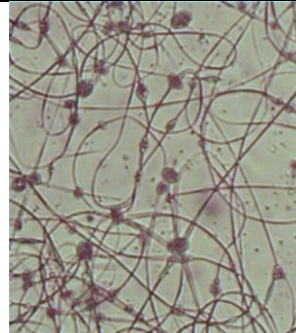
(c)

Soluciones poliméricas al 10 % empleando como disolvente Acetona: Metanol (1:1)			
Vel Flujo 10 μ L/min, Voltaje 12 kV	Vel Flujo 10 μ L/min, Voltaje 15 kV	Vel Flujo 20 μ L/min, Voltaje 12 kV	Vel Flujo 20 μ L/min, Voltaje 15 kV


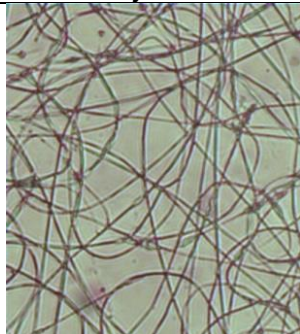

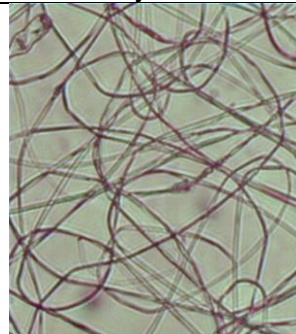
(d)

Soluciones poliméricas al 11 % empleando como disolvente Acetona: Etanol (1:1)			
Vel Flujo 10µL/min, Voltaje 12 kV	Vel Flujo 10µL/min, Voltaje 15 kV	Vel Flujo 20µL/min, Voltaje 12 kV	Vel Flujo 20µL/min, Voltaje 15 kV
			

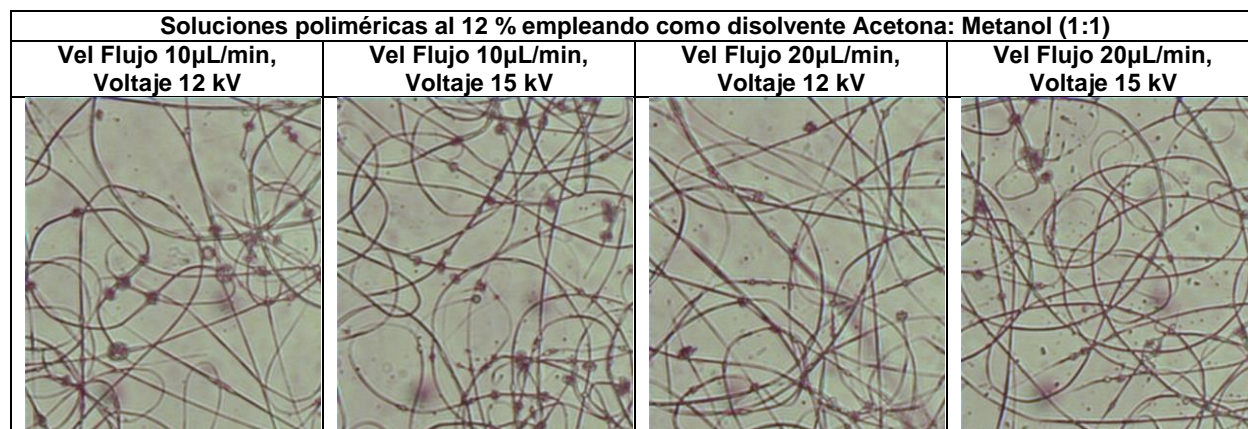
(e)

Soluciones poliméricas al 11 % empleando como disolvente Acetona: Metanol (1:1)			
Vel Flujo 10µL/min, Voltaje 12 kV	Vel Flujo 10µL/min, Voltaje 15 kV	Vel Flujo 20µL/min, Voltaje 12 kV	Vel Flujo 20µL/min, Voltaje 15 kV
			

(f)

Soluciones poliméricas al 12 % empleando como disolvente Acetona: Etanol (1:1)			
Vel Flujo 10µL/min, Voltaje 12 kV	Vel Flujo 10µL/min, Voltaje 15 kV	Vel Flujo 20µL/min, Voltaje 12 kV	Vel Flujo 20µL/min, Voltaje 15 kV
			

(g)



(h)

Figura 18. Imágenes obtenidas por microscopía óptica de fibras obtenidas por la técnica de electrohilado a partir de soluciones poliméricas de 9-12% (p/v) empleando un diseño de experimentos para optimizar las variables experimentales del proceso.

En las imágenes de la Figura 18 se puede observar que las fibras obtenidas a partir de soluciones poliméricas que emplean como disolvente Acetona:Etanol (1:1)(v/v), son fibras continuas, aparentemente de diámetro pequeño, las cuales presentan perlas unidas a ellas que disminuyen su presencia conforme se aumenta la concentración de polímero, en particular al 11 y 12%, observándose cualitativamente que el diámetro de las fibras también aumenta, lo cual fue corroborado mediante el análisis de imagen por MEB (Figura 19). Por otro lado, las fibras obtenidas a partir de soluciones poliméricas que emplean como disolvente Acetona:Metanol (1:1)(v/v) en un rango de concentración de 9-12% (p/v) presentan un tamaño menor visiblemente, además de seguir persistiendo la presencia de perlas unidas a las fibras y observarse que la distancia entre perla y perla es corta a concentraciones de 9 y 10% (p/v) y aumenta en concentraciones de 11 y 12% (p/v). Una de las causas por las cuales pudiese suceder dicho fenómeno, es la baja viscosidad de la solución polimérica ya que soluciones más viscosas tienen menos o nula presencia de deformaciones, además de que la conductividad de la solución Acetona:Metanol (1:1)(v/v) al ser más alta 60 μ S en comparación con la otra 30 μ S (Acetona:Etanol)(1:1)(v/v), podría ser la responsable de la disminución del diámetro de las fibras. Por último, la tensión superficial en ambas soluciones presenta el mismo comportamiento conforme se aumenta la concentración del polímero

presente en la solución, es por ello que se cree que esta propiedad no tiene gran influencia en la morfología y tamaño de las fibras obtenidas en este tipo de soluciones poliméricas, cabe mencionar que el voltaje aplicado es el suficiente para sobrepasar esta fuerza, provocando que se favorezca la deformación de la gota para formar el cono de Taylor, a partir del cual serán obtenidas las fibras por acción del campo eléctrico.

Partiendo de un proceso optimizado y conociendo las propiedades de las soluciones poliméricas en un rango de concentración del 9-12% (p/V), es de esperarse, que a partir de soluciones poliméricas de CAP, con buenas propiedades de conductividad y bajas tensiones superficiales, sea posible obtener una mejor formación de NFs (Figura 19).

La morfología y el diámetro promedio de las fibras obtenidas se corroboró y determinó empleando la MEB. Las Figuras 19 a-h muestran la morfología de las fibras obtenidas empleando soluciones poliméricas en un rango de concentraciones del 9-12% y que emplean como disolvente las mezclas Acetona:Etanol (1:1)(v/v) y Acetona:Metanol (1:1)(v/v). Las Figura 19 a-d muestran que es posible obtener fibras a partir de soluciones poliméricas con bajos valores de conductividad (30-33.5 μ S), esto es posible debido a que la tensión superficial de las soluciones es baja (45-46 Din/cm) y la viscosidad de las soluciones incrementa a medida que aumenta la concentración de polímero, en el orden de 38-189 cP, respectivamente. Por lo que las fibras pueden obtenerse aplicando el voltaje necesario para sobrellevar la tensión superficial y deformar la gota de la solución polimérica, a partir de la cual será proyectado el chorro para la formación de las fibras.

Por otro lado, sus propiedades de viscosidad permitirán mantener una gota estable y promover un proceso de estiramiento continuo además de que el tipo de disolvente empleado, posee una velocidad de evaporación óptima, para favorecer la obtención de fibras uniformes y secas. La Figura 19 a-d, por otro lado muestra que la morfología de las fibras obtenidas a partir de soluciones poliméricas de CAP y disolvente Acetona:Etanol(1:1)(v/v), cambia conforme se incrementa la concentración de polímero, llegando a ser uniforme (Figura 19 d).

Los sistemas obtenidos a partir de soluciones poliméricas que emplean como disolvente la mezcla Acetona:Metanol (1:1)(v/v) son mostrados en la Figura 19 e-h, de igual manera la concentración se emplea en el rango de 9-12% (p/v). La

conductividad en estas soluciones poliméricas (48-59 μS) fue mayor en comparación con las anteriores y su tensión superficial (44-47 dinas/cm) y viscosidad (30-55cP) son bajas. El proceso de electrohilado hipotéticamente se ve favorecido con este tipo de soluciones, ya que para inducir la deformación de la gota de solución polimérica a partir de la cual se formarán las fibras se necesita una menor energía al presentar bajas viscosidades lo que les permite fluir de una manera más flexible y ser menos resistentes a la deformación, por lo que puede ser posible obtener fibras con diámetros más pequeños (en el rango de los nanómetros), que aquellas obtenidas con soluciones más viscosas.

En la Figura 19 e-h se aprecia la morfología de las fibras obtenidas, ocurriendo el mismo fenómeno de disminución de la presencia de perlas conforme la concentración de polímero aumenta. Empleando soluciones poliméricas en concentraciones de 9% p/v, solo se aprecian fibras discontinuas con la presencia de perlas colapsadas, y mientras se aumenta la concentración de polímero y con ello la viscosidad de las soluciones, las fibras tienden a ser más continuas y la presencia de perlas se ve disminuida, debido a que la distancia entre perla y perla es mucho mayor (Figura 19-h).

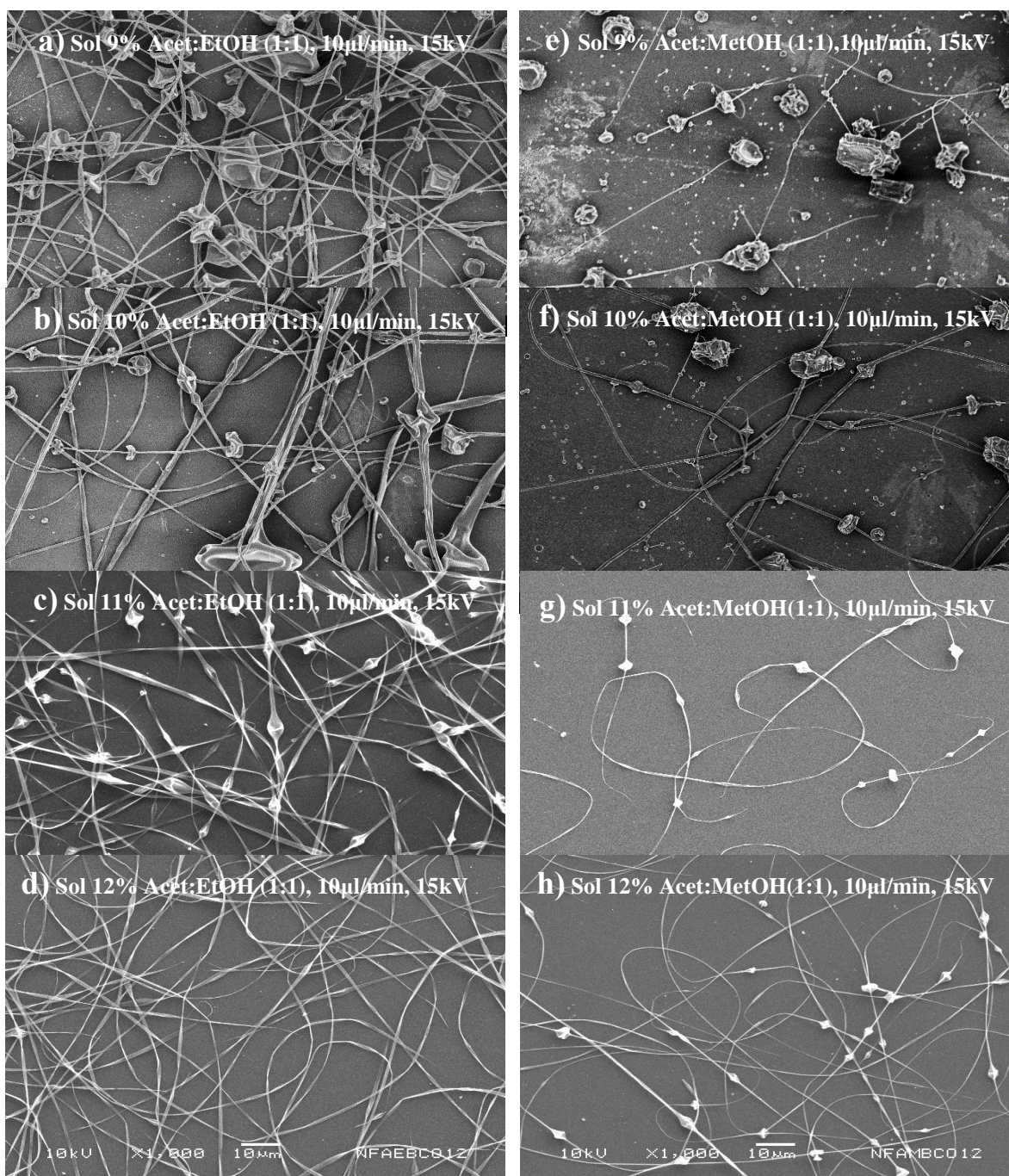


Figura 19. Micrografías de Nanofibras obtenidas a partir de soluciones de CAP a diferente concentración de polímero (9-12%) y mezcla de disolventes (Acetona:Etanol(1:1)(v/v) o Acetona:Metanol(1:1)(v/v)). Las condiciones de proceso fueron establecidas aplicando un voltaje de 15 kV, una velocidad de flujo de 10 μ L/min y una distancia de 15 cm.

Con respecto al diámetro promedio, este incrementa a medida que se aumenta la concentración de polímero para ambos casos de sistemas (Tabla 8). Las fibras obtenidas a partir de las soluciones que emplean como disolvente la mezcla

Acetona:Etanol (1:1)(v/v) muestran un diámetro promedio de entre 237.87 nm a 1067.21 nm, a diferencia de las obtenidas con soluciones poliméricas que emplean como disolvente la mezcla Acetona:Metanol (1:1) (v/v) cuyo diámetro promedio se encuentra en el rango de los 200 nm a 466.14 nm.

Adicionalmente, las micrografías realizadas mediante MEB mostraron que las nanofibras obtenidas con soluciones que emplean como disolvente la mezcla Acetona:Etanol (1:1)(v/v) poseen una superficie uniformes, tienden a aumentar de tamaño conforme se incrementa la concentración y la presencia de perlas desaparece a concentraciones iguales o mayores al 12%. A diferencia de aquellas fibras obtenidas con soluciones que emplean la mezcla de disolventes Acetona:Metanol (1:1)(v/v) las cuales muestran, poca o nula presencia de perlas, a pesar de que la concentración aumenta. Probablemente debido a que las soluciones que emplean esta mezcla de disolventes, los cuales tiene puntos de ebullición bajos, provocan que la deformación de la gota de solución polimérica no se lleve a cabo completamente a ciertas condiciones establecidas además de que el exceso en el flujo de solución y la rápida velocidad de evaporación del disolvente hacen que el estiramiento de la gota no sea favorecido completamente y sean obtenidas fibras con perlas unidas. Cabe señalar que la viscosidad en este tipo de soluciones es mucho menor con respecto a las soluciones anteriores.

En la Tabla 8 se muestra los diámetros promedios de las fibras obtenidas empleando soluciones poliméricas a diferente concentración y dos diferentes mezclas de disolventes. Podemos observar que el tipo de disolvente empleado influye en el diámetro de las fibras obtenidas. La Figura 20 nos muestra que la concentración de polímero es un factor que influye directamente en el diámetro de las fibras sin importar cuál es el tipo de disolvente.

Tabla 8. Diámetro promedio de NFs obtenidas empleando soluciones poliméricas a diferente concentración de polímero y dos diferentes mezclas de disolventes.

Sistema	Acetona: Etanol (1:1)(v/v)	Acetona: Metanol (1:1)(v/v)
Concentración de polímero (%)	Diámetro promedio \pm SD (nm)	Diámetro promedio \pm SD (nm)
9	237.87 \pm 64.58	200.14 \pm 60.04
10	413.52 \pm 120.26	249.01 \pm 64.56
11	1067.21 \pm 324.46	466.14 \pm 181.06
12	955.18 \pm 188.28	443.95 \pm 136.56

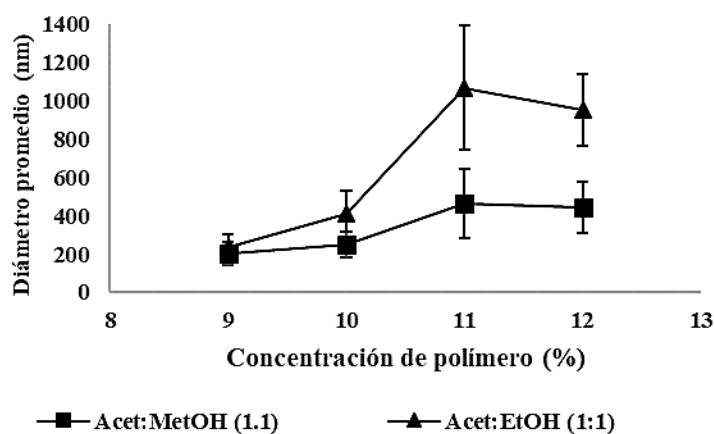


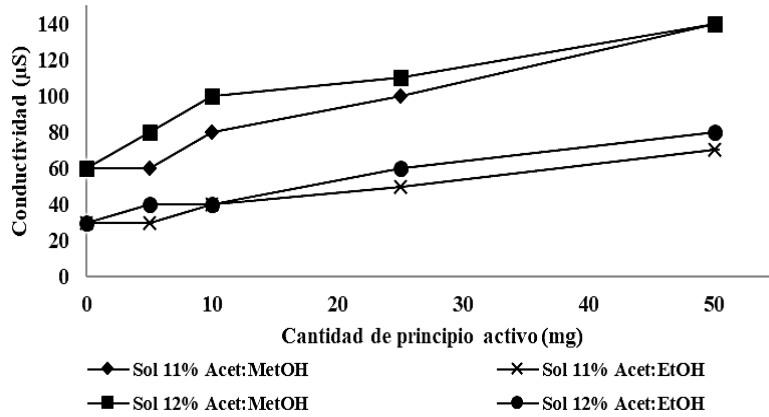
Figura 20. Comportamiento de diámetro de fibras poliméricas obtenidas a partir de soluciones poliméricas de CAP empleando como disolvente la mezcla Acetona:Etanol y Acetona:Metanol en una proporción 1:1 (v/v).

1.4 Incorporación del principio activo a las soluciones poliméricas empleadas para la obtención de NFs.

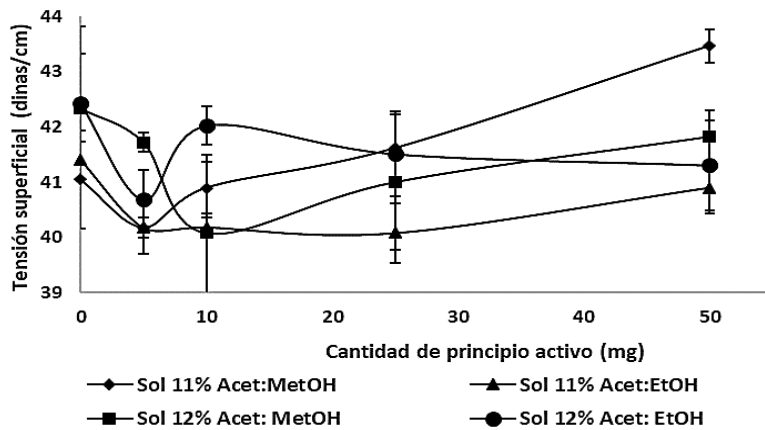
A partir de los resultados obtenidos, solo aquellas soluciones cuya concentración está en el rango de los 11-12% (p/v) y con las que es posible obtener fibras uniformes y con diámetros nanométricos fueron seleccionadas. Estas soluciones poliméricas fueron empleadas para evaluar la influencia de la incorporación del principio activo modelo (CHX), sobre las propiedades de la solución y la EP del electrohilado para obtener fibras continuas en longitud y de diámetros nanométricos. La Figura 21 a-c muestra el comportamiento de las propiedades de las soluciones poliméricas de CAP al adicionar diferente cantidad de CHX, donde las concentraciones son del 11 y 12% (p/v) y que usan como disolvente la mezcla de disolventes Acetona:Etanol (1:1)(v/v) o Acetona:Metanol (1:1) (v/v). En ambos

casos se agregaron diferentes cantidades de fármaco y se determinaron sus propiedades con respecto a la conductividad, la tensión superficial y la viscosidad. De acuerdo al análisis estadístico, el aumento en la cantidad de principio activo es estadísticamente significativo (p -valor < 0.05) sobre la conductividad de las soluciones poliméricas en ambos casos (Figura 21a), siendo la conductividad mayor en las soluciones poliméricas que emplean la mezcla Acetona:Metanol(1:1)(v/v) como disolvente en un rango de 60-1400 μ S, debido a que el fármaco modelo empleado (CHX) posee una carga iónica positiva, lo que provoca que una mayor cantidad de fármaco presente en la solución mejore la conductividad y facilite el proceso de electrohilado. Por otra parte, las soluciones poliméricas que usan la mezcla Acetona:Metanol son más polares (conductividad 55 μ S) en comparación con la mezcla Acetona:Etanol (conductividad 33 μ S), lo que conduciría a obtener fibras con diámetros más pequeños. En cuanto a la tensión superficial y la viscosidad, estas propiedades no muestran diferencias estadísticamente significativas (p -valor > 0.05) con respecto a la cantidad de fármaco agregado (Figura 21-b y 21-c). En el caso de la tensión superficial (Figura 21 b), disminuye en un rango de 6-10% en todos los casos cuando el principio está presente, pero con el incremento en la cantidad de principio activo en la solución, la tensión superficial tiende a aumentar ligeramente (41-43 dinas/cm). En el caso de las soluciones poliméricas que usan como disolvente la mezcla Acetona:Etanol (1:1)(v/v), la tensión superficial es ligeramente menor cuando la cantidad de principio activo es mayor en la formulación (42-40 Dinas/cm) en comparación con las soluciones poliméricas que usan Acetona:Metanol (1:1)(v/v) como disolvente, donde la tensión superficial aumenta ligeramente (41-42 dinas/cm) a medida que aumenta la cantidad de principio activo. Para el caso de la viscosidad (Figura 21-c), la presencia del principio activo en todas las soluciones poliméricas disminuye la viscosidad inicial entre 10 y 16% para la soluciones poliméricas que usa la mezcla Acetona:Metanol (1:1)(v/v) y hasta un 50% para el caso de soluciones poliméricas que usa Acetona:Etanol (1:1)(v/v) como disolvente. Al ir incrementando la cantidad de principio activo de 5 a 50 mg, la viscosidad aumenta ligeramente en ambos casos. Las soluciones de polímeros al 11 y 12% que utilizan como disolventes Acetona: Metanol (1:1)(v/v), presentaron valores de 34-37 cP y de 43-46 cP, respectivamente. Por otro lado, en soluciones poliméricas que utilizan como

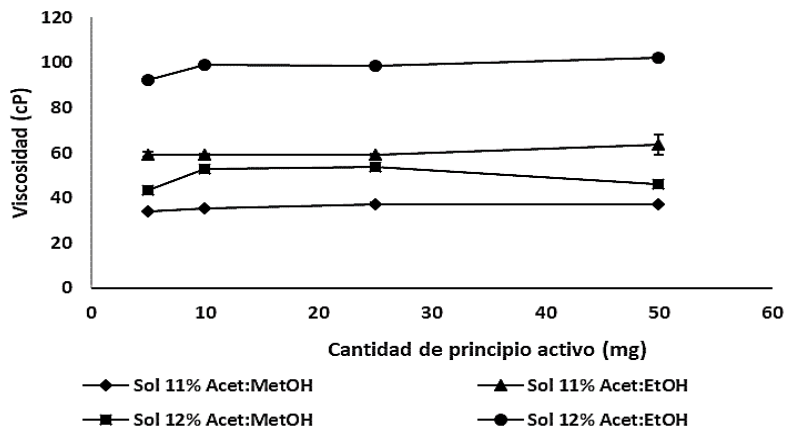
disolventes la mezcla de Acetona:Etanol (1:1)(v/v) la viscosidad es mucho mayor, estando en los rangos de 59-63 cP y 92-102 cP para una concentración de polímero de 11 y 12%, respectivamente (Figura 21-c).



(a)



(b)



(c)

Figura 21. Influencia de la incorporación del principio activo sobre las propiedades de la solución polimérica, (a) Conductividad, (b) Tensión superficial y (c) Viscosidad.

La Figura 22 a-d y la Figura 23 a-d muestran la morfología de NFs obtenidas a partir de soluciones poliméricas al 11 y 12 % (p/v) y que emplean como disolventes la mezclas Acetona:Etanol (1:1)(v/v) o Acetona:Metanol (1:1), cargadas con 10 ó 25 mg de CHX. Las micrografías muestran que es posible obtener NFs uniformes o con poca presencia de perlas empleando estas soluciones. La Figura 23-a muestra que las fibras obtenidas a partir de soluciones poliméricas al 12% y que emplean como disolvente Acetona:Etanol(1:1)(v/v) poseen una morfología uniforme (fibras largas y de diámetro nanométrico), pero cuando la cantidad de principio activo se incrementa a los 25 mg, fibras con presencia de perlas son obtenidas (Figura 23-b). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al diámetro promedio de las NFs cuando la concentración de polímero y principio activo varía en esta formulación (p-valor= 0.8208 y p-valor= 0.8264, Anexo 2).

La Tabla 9 muestra el diámetro promedio de NFs obtenidas a partir de soluciones poliméricas Acetona:Etanol (1:1)(v/v) y Acetona:Metanol (1:1)(v/v) variando la cantidad de principio activo en la formulación. Para las NFs obtenidas a partir de soluciones poliméricas Acetona:Etanol (1:1)(v/v) al 12% p/v, su diámetro es ligeramente mayor al incorporarse el principio activo a la solución (1049 nm), posiblemente a los cambios sufridos en las propiedades de la solución al incorporar el principio activo. En la Figura 23-a se puede apreciar que se obtienen fibras largas y de diámetro nanométrico empleando de estas soluciones.

Por otro lado, cuando la solución polimérica emplea la mezcla Acetona:Metanol (1:1)(v/v) como disolvente, en general el diámetro de las NFs disminuye hasta en un 45% con respecto a las NFs obtenidas a partir de soluciones poliméricas sin principio activo. Las NFs presentan un diámetro de 257 nm y aumentan hasta 306 nm conforme se incrementa la cantidad de principio activo, cuando la concentración de polímero es el 11% y se emplea como disolvente la mezcla Acetona:Metanol (1:1)(v/v), (Tabla 9). De una forma similar, el diámetro de las NFs se incrementa de 324 a 377nm al emplear soluciones poliméricas Acetona:Metanol (1:1)(v/v) con una concentración de polímero al 12%. El análisis estadístico muestra en este caso que, existe una diferencia estadísticamente significativa en el diámetro de las NFs cuando la concentración de polímero y principio activo varían en la solución polimérica (p-valor = 0.020 y p-valor = 0.027, Anexo 2). Las Figuras 22 c-d y Figura 23 c-d muestran la morfología de las NFs obtenidas, en donde se observa que la

presencia de perlas unidas a las fibras es constante en todas las formulaciones ensayadas. Hipotéticamente una mayor presencia de moléculas en la solución polimérica disminuye la capacidad disolución de los disolventes empleados (saturación del sistema), por lo que la cantidad de disolvente disponible será evaporado con una mayor velocidad, debido a que los disolventes poseen puntos de ebullición bajos. El diámetro pequeño de las NFs es posible debido a que al emplear pequeñas cantidades de principio activo la tensión superficial es pequeña.

Tabla 9. Diámetro de NFs obtenidas a partir de soluciones al 11 y 12%.

Sistema de disolventes/ concentración	Acetona:Etanol (1:1) (v/v) 11%	Acetona:Etanol (1:1) (v/v) 12%	Acetona:Metanol (1:1) (v/v) 11%	Acetona:Metanol (1:1) (v/v) 12%
Cantidad de CHX (mg)	Diámetro promedio ± SD(nm)	Diámetro promedio ± SD(nm)	Diámetro promedio ± SD(nm)	Diámetro promedio ± SD(nm)
0	1067.21±324.46	955.18±188.28	466.14±181.06	443.95±136.56
10	934.39±188.67	1049.52±349.39	257.86±153.57	324.29±84.15
25	1050.31±349.39	990.56±98.94	306.6±73.07	377.35±84.37

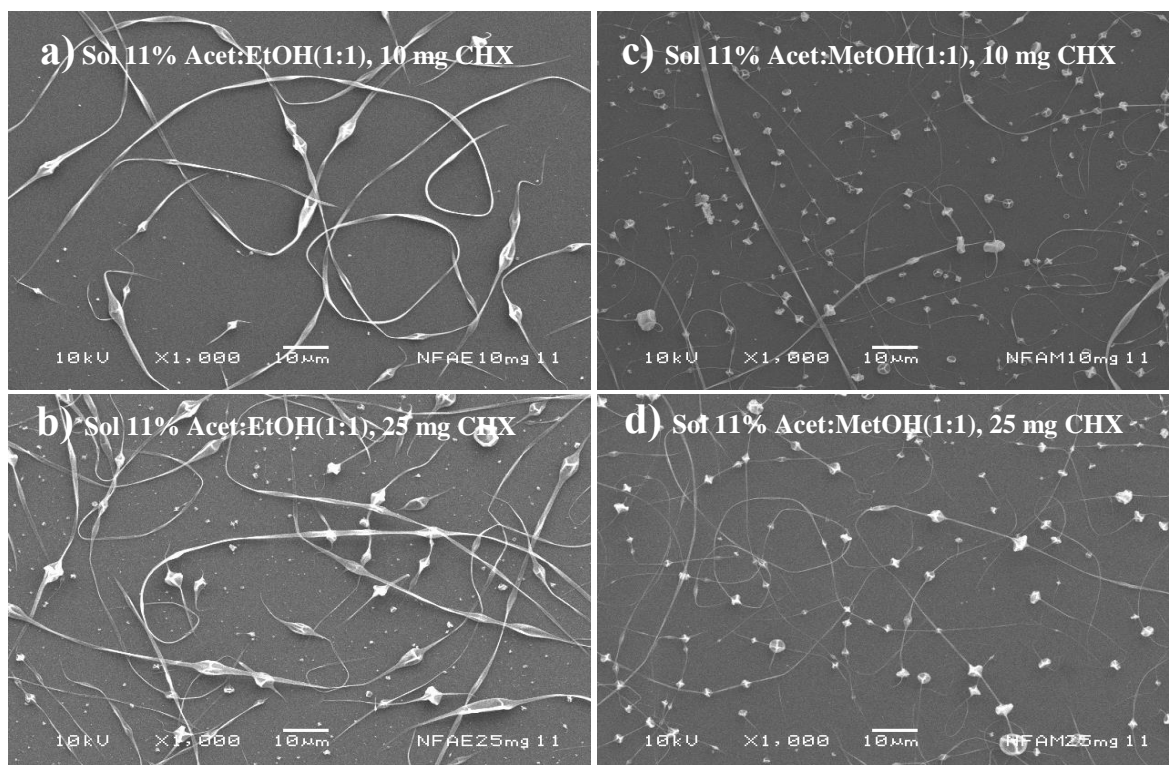


Figura 22. Micrografías de Nanofibras de CAP al 11% empleando dos diferentes mezclas de disolventes y diferente cantidad de principio activo.

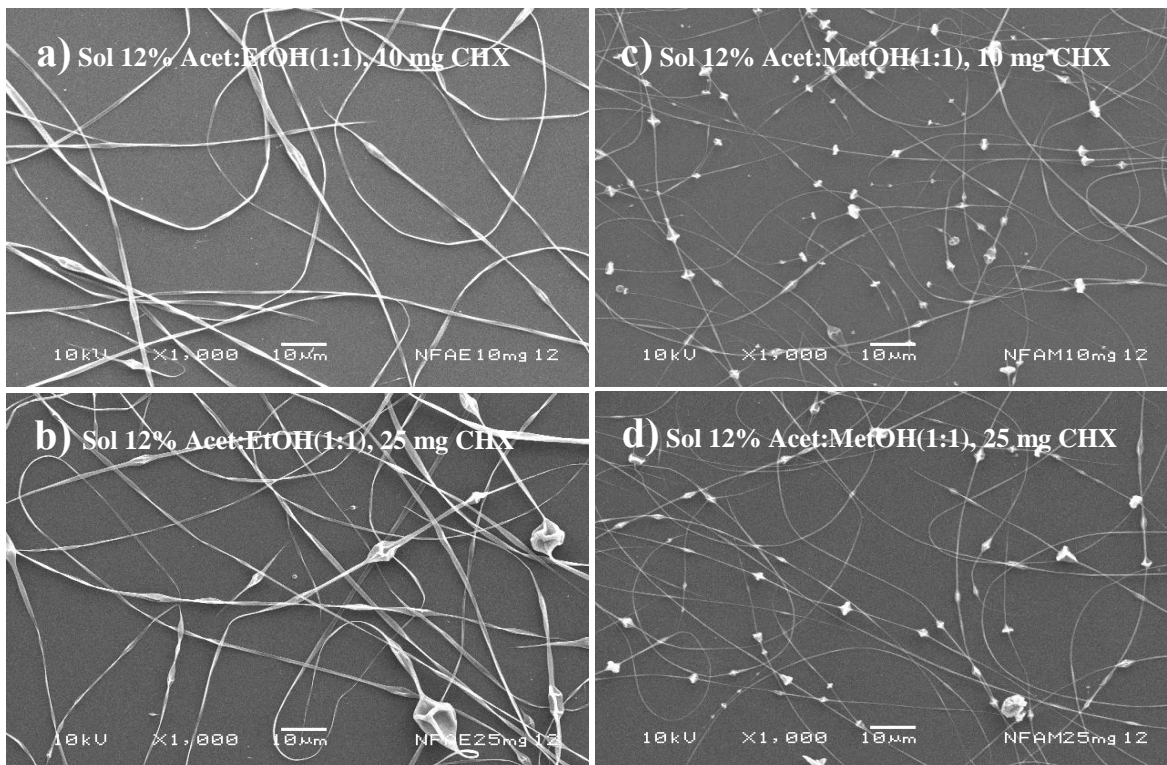


Figura 23. Micrografías de Nanofibras de CAP al 12% empleando dos diferentes mezclas de disolventes y diferente cantidad de principio activo.

1.5 Eficiencia de atrapamiento y eficiencia de proceso de electrohilado

El proceso de electrohilado para obtener NFs a partir de soluciones poliméricas de CAP donde la concentración de polímero y la cantidad de fármaco varía, se ha optimizado monitoreando los parámetros relacionados con el proceso y los parámetros relacionados con la solución. Las soluciones poliméricas Acetona:Etanol (1:1)(v/v) al 12% y Acetona:Metanol (1:1)(v/v) al 11% fueron elegidas para evaluar la EP y EE del proceso de electrohilado. La Figura 24 muestra que las mejores EP se obtienen utilizando soluciones poliméricas que emplean la mezcla Acetona:Etanol (1:1)(v/v) al 12% y por el contrario las solución poliméricas que emplean la mezcla Acetona:Metanol (1:1)(v/v) al 11% tiene una menor EP.

La Tabla 10 muestra que la EP no se ve afectada por el aumento de la cantidad de principio activo en la formulación para el caso de NFs obtenidas a partir de soluciones poliméricas Acetona:Etanol (1:1)(v/v) al 12%, pero para el caso de NFs

obtenidas a partir de soluciones poliméricas que emplean la mezcla Acetona:Metanol(1:1)(v/v) al 11%, la EP aumenta hasta un 50% cuando el fármaco se incorpora a la formulación. Probablemente se deba a que la adición del fármaco aumenta las propiedades de conductividad de la solución polimérica, lo que facilita el proceso de electrohilado al favorecer el flujo de cargas eléctricas, además de que se ve reducida la viscosidad al adicionarse el principio activo en la formulación. La EE de CHX en NFs mostró que el incremento del principio activo disminuye el entrapamiento de CHX en las cadenas poliméricas en ambos casos (Tabla 10).

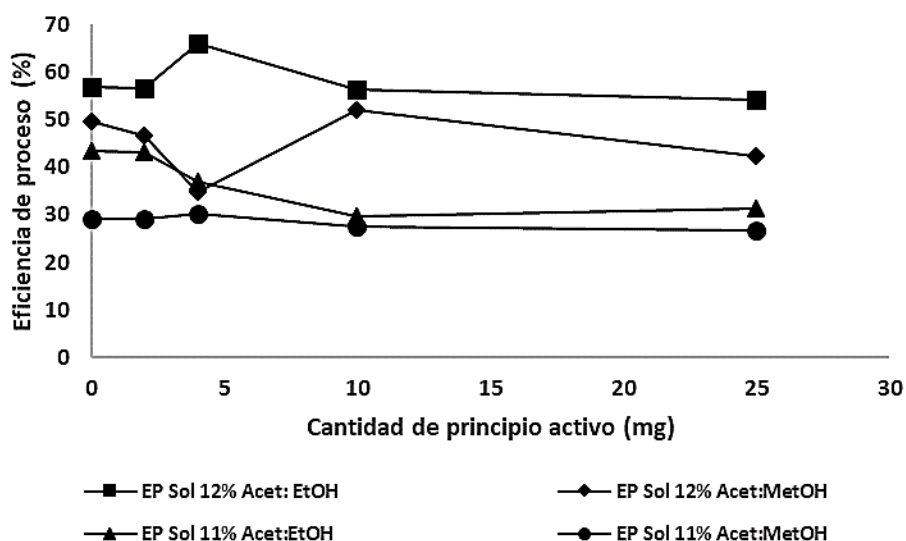


Figura 24. Eficiencia del proceso de electrohilado empleando diferentes soluciones poliméricas a diferente concentración de polímero y principio activo.

Tabla 10. Eficiencia del proceso y eficiencia de entrapamiento de NFs obtenidas a partir de soluciones poliméricas de CAP.

Sistema de disolventes/ concentración	Acetona:Etanol (1:1) (v/v) 12%		Acetona:Metanol (1:1) (v/v) 11%		
	Cantidad de CHX (mg)	Eficiencia de proceso \pm SD (%)	Eficiencia de Entrapamiento \pm SD (%)	Eficiencia de proceso \pm SD (%)	Eficiencia de Entrapamiento \pm SD (%)
0	0	56.94 \pm 4.76	-----	29.16 \pm 3.87	-----
2	2	58.21 \pm 4.63	72.86 \pm 4.75	44.90 \pm 1.50	88.67 \pm 2.34
4	4	55.07 \pm 2.45	42.60 \pm 5.67	40.68 \pm 9.16	32.78 \pm 3.87
10	10	57.19 \pm 6.57	35.37 \pm 2.56	40.49 \pm 2.97	29.3 \pm 2.95
25	25	56.98 \pm 5.29	38.00 \pm 4.89	43.27 \pm 0.59	9.28 \pm 1.78

1.6 Calorimetría Diferencial de Barrido de NFs poliméricas

Se realizaron estudios de calorimetría diferencial de barrido (DSC) para comprender las relaciones entre los componentes de las formulaciones. Se obtuvieron termogramas de CHX polvo (Figura 25-a), polímero CAP polvo (Figura 25-b) y NFs cargadas con CHX (Figura 25-c y 25-d) para definir el estado físico del fármaco y el polímero en las NFs y detectar posibles interacciones fármaco-polímero. Las NFs obtenidas a partir de las soluciones poliméricas que usaron como disolvente la mezcla Acetona:Etanol(1:1)(v/v) se usaron como un sistema modelo ya que presentan una mejor EP y EE. La Figura 25-a muestra la endoterma de absorción característico del punto de fusión de la CHX a 135.65 °C, seguida de su degradación. En el caso de NFs cargadas con CHX (Figura 25-c y 25-d), el pico característico del endoterma de absorción de la CHX no se observó en todas las concentraciones ensayadas. Este comportamiento sugiere que la CHX está atrapada en la estructura polimérica de las NFs, compuesta principalmente de CAP. Lo cual se puede corroborar en las micrografías, ya que no se observa la presencia de cristales de principio activo en las superficies de las NFs, (Figura 22a-d y Figura 23a-d).

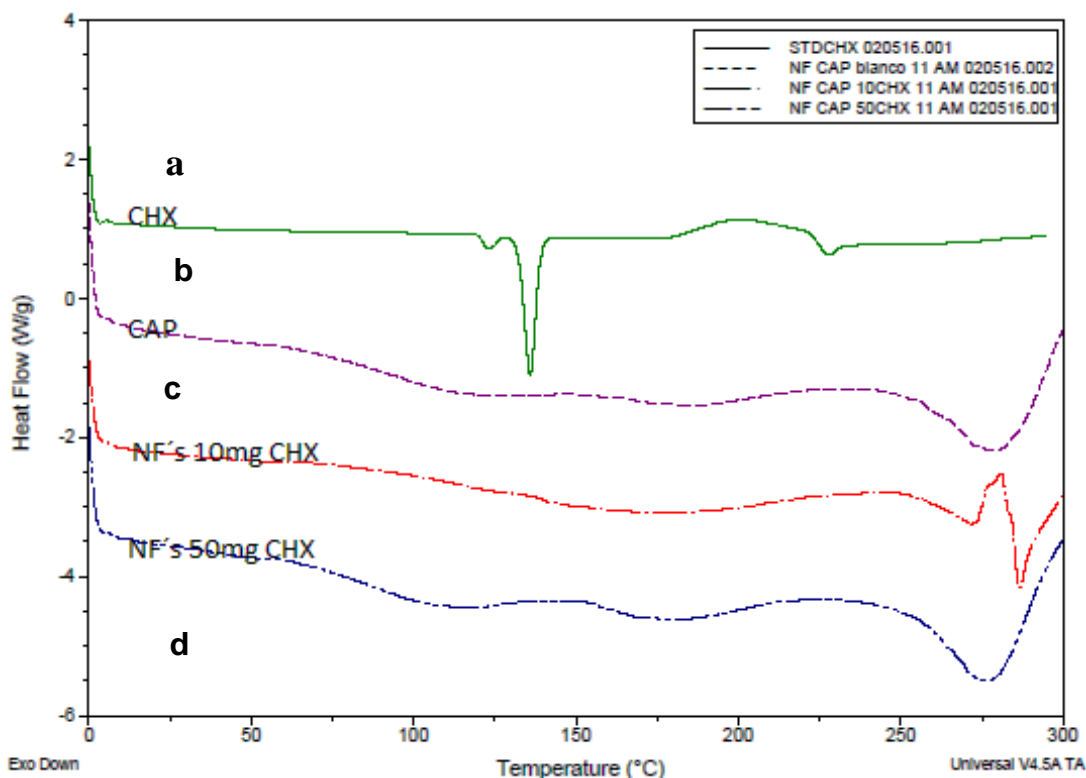


Figura 25. Termogramas obtenidos a partir de NFs cargadas con diferente cantidad de principio activo **a)** Clorhexidina base(CHX); **b)** Ftalato Acetato de Celulosa (CAP); **c)** NFs cargadas con 10mg de CHX; **d)** NFs cargadas con 50mg de CHX.

1.7 Determinación del mecanismo de liberación del principio activo a partir de NFs poliméricas de CAP.

Las Figuras 26 y 27 muestran los perfiles de liberación de CHX para las NFs-CAP-CHX que emplean como disolvente la mezcla Acetona: Etanol (1:1)(v/v) al 12% (**Sistema A**) y Acetona:Metanol (1:1)(v/v) al 11% (**Sistema B**) cargados con 4 mg de CHX cada uno. Se observó una rápida liberación del principio activo para ambos sistemas, obteniendo una completa liberación dentro de los 25 min para el sistema A y 50 minutos para el sistema B, empleando un medio de disolución a pH 7, compuesto de una solución amortiguadora de fosfato adicionada con Brij® 58 al 2.5% (p/v), con la finalidad de mejorar la solubilidad de la CHX en este medio. Esta diferencia en los tiempos puede atribuirse a la arquitectura de los nanosistemas, los nanosistemas obtenidos a partir del sistema A, presentan una estructura continua a diferencia de los nanosistemas obtenidos con el sistema B, los cuales presentan una estructura discontinua (fibras con presencia de perlas).

Se debe resaltar que ambos sistemas son matriciales. Un sistema matricial generalmente se libera por difusión, y se espera que pueda ocurrir un comportamiento similar en condiciones *in vivo*. En este sentido la CHX está clasificada como un principio activo clase II de la clasificación biofarmacéutica de medicamentos, lo que significa que la disolución es el factor limitante en las pruebas *in vitro*. Los fármacos de clase II tienen una estrecha correlación *in vitro-in vivo*, con lo que se espera que permitan una buena predicción del rendimiento de la formulación *in vivo* en base a estudios de perfil de liberación de fármacos *in vitro* (90,91). Las formas farmacéuticas comúnmente empleadas para tratar la EPD generalmente requieren varias aplicaciones a lo largo del día, debido a la rápida eliminación del medicamento del sitio. De hecho, sólo intervalos más cortos entre administraciones pueden garantizar un efecto farmacológico local (92). Estas aplicaciones adicionales generalmente tienen el costo de la comodidad del paciente y pueden afectar el cumplimiento del tratamiento. Los sistemas propuestos aquí pueden ser aplicados directamente en la bolsa periodontal, por lo que sería posible efectuar menos administraciones y obtener un alto efecto terapéutico. Debido a que las NFs obtenidas a partir de ambos sistemas A y B son sistemas dependientes del pH, se espera una rápida liberación del fármaco en caso de una EPD leve, debido a

que el pH ligeramente básico del FCG promueve la rápida disolución del polímero CAP. Por el contrario, se esperaría que la liberación fuese mucho más lenta en caso de EPD moderada-severa ya que el microambiente del FCG tiende a volverse ácido durante la infección, debido a las acciones combinadas del metabolismo bacteriano y la respuesta inmune del huésped (67,93).

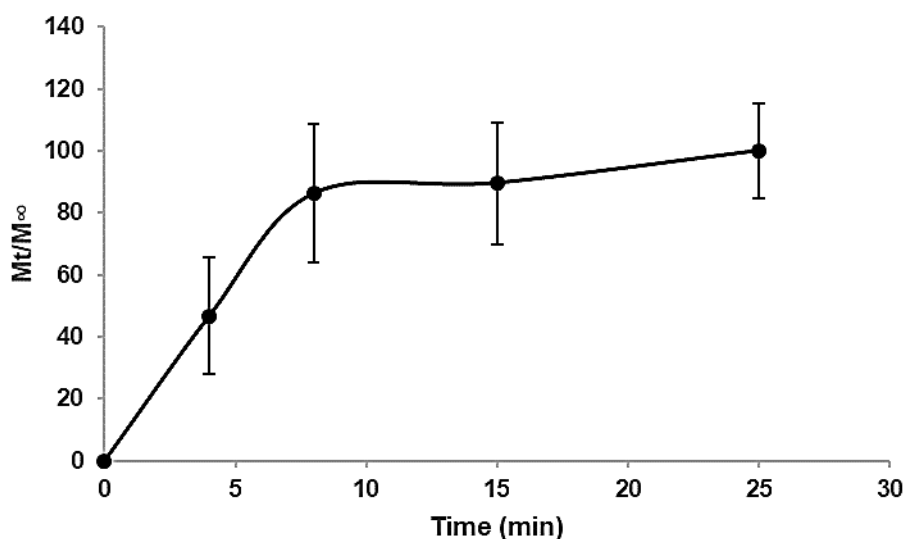


Figura 26. Perfil de liberación de clorhexidina a partir de Nanofibras poliméricas de CAP que emplean como disolvente la mezcla Acetona:Etanol (1:1)(v/v) al 12%.(n=3)

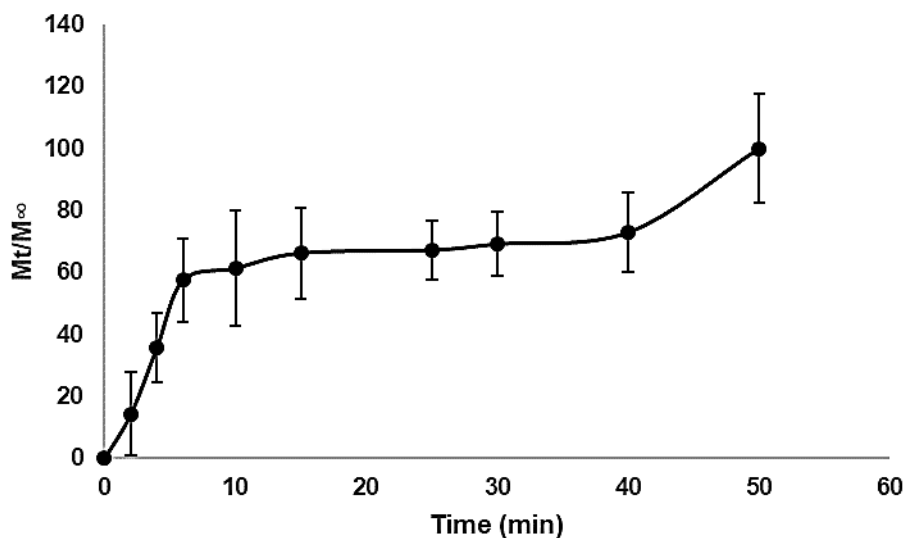


Figura 27. Perfil de liberación de clorhexidina a partir de Nanofibras poliméricas de CAP que emplean como disolvente la mezcla Acetona:Metanol (1:1)(v/v) al 11%.(n=3)

Los resultados fueron ajustados a los modelos matemáticos Korsmeyer-Peppas y Higuchi para determinar si el transporte de CHX se basa en la difusión Fickiana o no Fickiana. Los resultados de la liberación *in vitro* se muestran en la Tabla 11. En ambos casos, sistema A y sistema B, se ajustaron al modelo de Korsmeyer-Peppas. Este modelo semiempírico se desarrolló explícitamente para matrices poliméricas y se utiliza para dilucidar el mecanismo de liberación debido a su capacidad para diferenciar y luego clasificar sistemas geométricos distintos al interpretar sus exponentes (n). En el presente caso, las NFs se asemejan a una forma geométrica cilíndrica, lo que teóricamente significa valores para una $n=0,45$ para una difusión de Fickiana y valores más altos de n, entre 0,45 y 0,89, o $n=0,89$, para una transferencia de masa bajo una difusión no Fickiana.

Tabla 11. Coeficientes de correlación y constantes de los modelos de cinética de liberación a partir de NFs, ecuación de Korsmeyer-Peppas y Higuchi.

Nanosistema	Korsmeyer- Peppas		Higuchi	
	r^2	n	r^2	K_H (mg/min ^{1/2})
Sistema A Acetona:Etanol 12%	0.9807	0.4303	0.9843	0.2064
Sistema B Acetona:Metanol 11%	0.7808	0.453	0.7954	0.1075

El Sistema A mostró una rápida liberación de la cantidad total de CHX a los 25 min. Este sistema se ajusta al modelo de Korsmeyer-Peppas mostrando un coeficiente de determinación de 0.9807, un exponente de difusión (n) igual a 0.4303 y $K_H = 0.2064$ mg/min^{1/2}. Estos resultados indican que la liberación de CHX siguió una difusión Fickiana, lo que implica procesos de difusión-erosión debido a la difusión molecular de CHX desde la matriz de las NFs como consecuencia de su gradiente químico y la relajación de las cadenas de polímeros de CAP. Por otro lado, el sistema B, tuvo una liberación más lenta que el sistema A, ya que habían liberado la cantidad total de fármaco a los 50 minutos, con un exponente de difusión de n igual a 0.453 y una constante de liberación de $K_H = 0.1075$ mg / min^{1/2}. De la misma forma este sistema siguió una difusión Fickiana, se cree que este comportamiento pueda ocurrir porque las NFs del sistema B tienen en su estructura perlas unidas a

las fibras, las que podrían disolverse posteriormente al disolverse la parte totalmente estirada de las NFs, que debido a su pequeño diámetro se disuelven en primera instancia. En algunos casos, el fármaco puede actuar como un agente plastificante de la solución polimérica, lo que probablemente retrase la liberación del fármaco en el medio de disolución compuesta por una solución amortiguadora de fosfatos pH 7, adicionada con Brij® 58 al 2.5%. Las condiciones de disolución permiten relajar las cadenas poliméricas de CAP, las cuales están formando parte de la estructura de las NFs, con lo que se permitiría la difusión del fármaco hacia el medio hasta un punto donde esta se erosiona por completo y se puede liberar la cantidad total de fármaco.

La comparación de los resultados obtenidos de ambos sistemas nos permite afirmar que la difusión Fickiana proporcionaría el mecanismo de liberación más predominante, aunque es importante tener en cuenta que los cambios en el pH del medio de liberación pueden retrasar el tiempo de liberación de la cantidad total de fármaco. Esta propiedad, podría permitir una liberación prolongada durante largos períodos, ya que el pH del FCG en el bolsillo periodontal cambia de alrededor de 7 en condiciones normales a 5 a medida que la EP progresa debido a la inflamación y la acumulación de bacterias. A medida que disminuye el pH del medio (es decir, del FCG en la bolsa periodontal), las NFs-CAP pueden disminuir su velocidad de liberación ya que el polímero CAP se vuelve menos soluble a pH ácidos. Un ligero aumento en el pH del medio, es el resultado de una mejora en la etapa de la EP. En casos EP leves, el pH de la bolsa periodontal que contiene el FCG es ligeramente básico, cercano a 7. A medida que disminuye la presencia de bacterias, la etapa de la enfermedad mejora hasta que la inflamación y otras molestias características desaparecen. Es en ese punto que el pH de la bolsa periodontal cambia de ligeramente básico a ligeramente ácido, con lo que se esperaría que esta disminución del pH del medio de la bolsa periodontal, donde las NFs son depositadas o colocadas directamente en las encías, retarde la liberación del fármaco de los nanosistemas formulados con el polímero CAP.

Derivado de las observaciones y resultados obtenidos se puede sugerir que dichos nanosistemas pueden ser de gran ayuda en el área odontológica, como es el caso del tratamiento de la EPD u otras aplicaciones, como por ejemplo la regeneración tisular.

2. Resultados y discusión de otros sistemas nanoparticulados (NCs y NPs)

Los resultados de las pruebas de solubilidad de los componentes de la formulación para NCs y NPs se resumen en la Tabla 12.

2.1 Determinación de la solubilidad de CHX

En la Tabla 12 se muestra que la solubilidad de la CHX en dos diferentes tipos de aceites que pueden ser empleados como centro oleoso en la formulación de NCs además de que servirían como medio de disolución y vehículo del principio activo. Se observó que la CHX es muy soluble en aceite de Eugenol, pero no así en los triglicéridos de cadena media (Captex 200) en el cual es casi insoluble. La solubilidad de la CHX en eugenol fue de 6.6 mg/ml y en aceite Captex 200, 0.85 mg/ml.

Se ha reportado que el eugenol en combinación con algunos antibióticos presenta un efecto sinérgico aumentando el efecto terapéutico del antibiótico lo que reduce la concentración mínima inhibitoria para provocar la muerte a los microorganismos (74). Además, se observó que el CAP es ligeramente soluble en el aceite de eugenol, caso contrario al polivinilalcohol (PVAL), el cual es completamente insoluble tanto en el aceite de eugenol como en el Captex 200.

Por otro lado, se observó que el polímero CAP, el eugenol y la CHX son solubles en metiletilcetona y acetato de etilo, ambos disolventes orgánicos probados. Este tipo de disolventes orgánicos son ampliamente utilizados en la industria farmacéutica debido a su baja toxicidad para los humanos, mientras que el PVAL fue completamente insoluble en este tipo de disolventes y muestra ser completamente soluble en agua. Cabe señalar que en la formación de NPs y principalmente en NCs, se requiere que el polímero y el o los materiales a encapsular se encuentren completamente disueltos en la fase orgánica pero insolubles en la fase acuosa. Tomando en cuenta esto, se eligió la metiletilcetona como disolvente orgánico y agua como fase acuosa para la preparación de NCs o NPs según sea el caso.

Adicionalmente se determinó la solubilidad de la CHX y eugenol en dos diferentes disolventes etanol y metanol. Observándose que la CHX es más soluble en metanol que en etanol y que el eugenol es muy soluble en ambos disolventes, por lo cual se decidió emplear metanol en caso de ser necesario. Este disolvente orgánico se

utilizará como disolvente en el método de cuantificación de CHX contenida en las NCs o NPs debido a su buena solubilidad.

Tabla 12. Resultados de la prueba cualitativa de solubilidad en diferentes disolventes de los diferentes materiales empleados en la formulación de NCs y NPs.

Material	Captex 200	Eugenol	Metiletilcetona	Acetato de etilo	Etanol	Metanol	Agua
Clorhexidina	No	Si	Si	Si	Si	Si	No
Ftalato de Acetato de Celulosa	No	Si	Si	Si	No	No	No
Eugenol	Si	-----	Si	Si	Si	Si	No
Polivinilalcohol	No	No	No	No	No	No	Si

2.2 Elección del método analítico para la cuantificación de CHX, Espectrofotometría UV-Vis / HPLC

En las Figuras 28-32 se muestran los espectros de absorción obtenidos a partir de soluciones de Eugenol, CHX y una mezcla de ambos analitos, empleando como disolventes etanol y metanol, disolventes en donde presentaron mejor solubilidad. En la Figura 28 se observa que la longitud de máxima absorción del eugenol es de 280 nm en ambos disolventes, de la misma manera en la Figura 29 se observa que la longitud de máxima absorción para la CHX es de 260 nm. Los espectros de absorción obtenidos a partir de una solución que contenía ambos analitos Eugenol-CHX disueltos en etanol o metanol se muestran de en la Figura 30, donde se observó una supresión de la señal de la CHX ya que esta absorbe a una longitud de onda muy cercana a la del eugenol y que interfiere con la señal específica de la CHX. Las Figuras 31 y 32 muestran la comparación de una solución estándar concentrada y una diluida, en donde se corroboró que efectivamente se suprime la señal de la CHX en ambos disolventes. Debido a esto, se determinó que la Espectrofotometría UV-Vis no es la técnica adecuada para llevar a cabo la cuantificación del principio activo contenido en las NCs y NPs, Por lo que es necesario emplear una técnica de separación que permita cuantificar con exactitud y precisión la cantidad de principio activo contenido en los nanosistemas. El método analítico fue adaptado y optimizado, empleando la técnica de Cromatografía de líquidos de alta resolución para llevar a cabo dicha determinación.

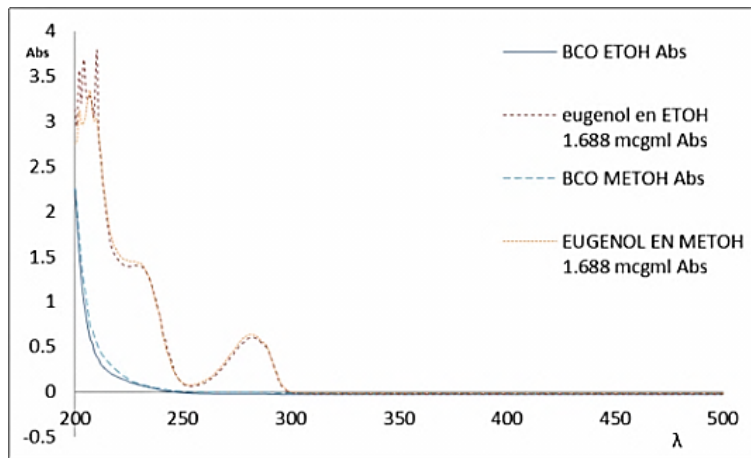


Figura 28. Espectros de absorción de aceite de eugenol disuelto en etanol y metanol

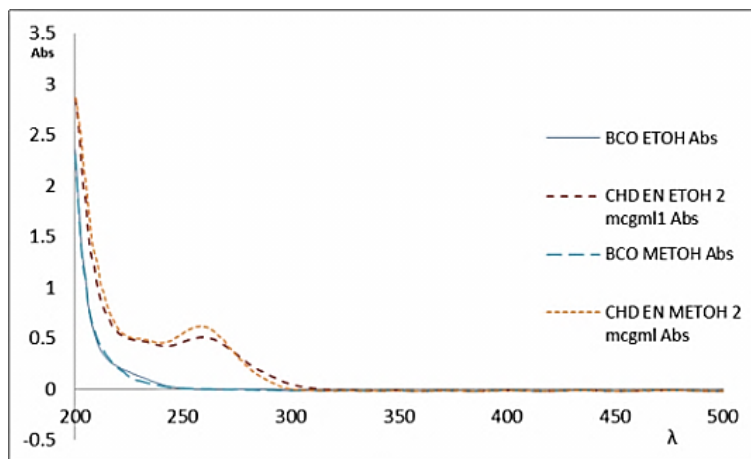


Figura 29. Espectros de absorción de CHX disuelta en etanol y metanol.

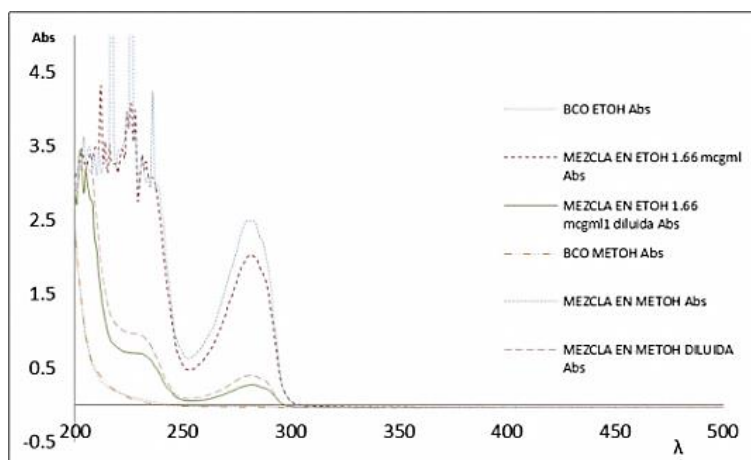


Figura 30. Espectros de absorción de la mezcla CHX-eugenol en etanol y metanol.

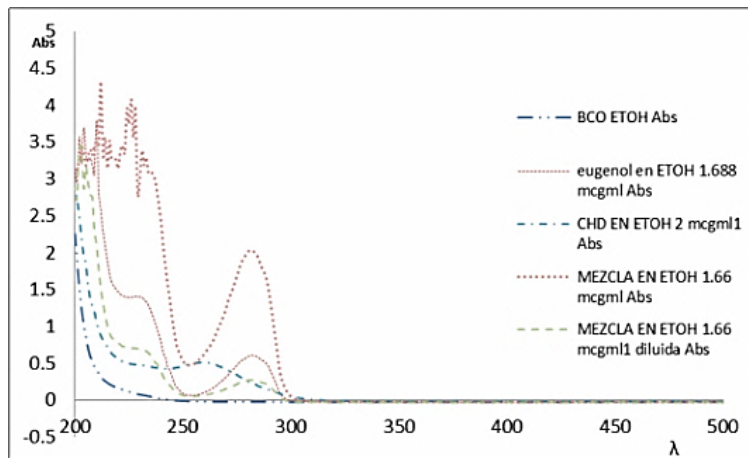


Figura 31. Comparación de espectros de absorción de CHX, eugenol y mezcla utilizando como disolvente etanol.

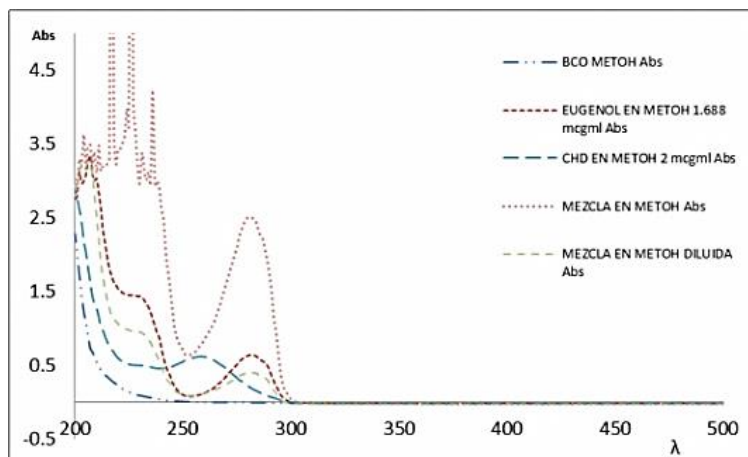


Figura 32. Comparación de espectros de absorción de CHX, eugenol y mezcla utilizando como disolvente metanol.

2.3 Curva de calibración para el complejo colorido de PVAL

El polímero empleado como estabilizante durante la preparación de las NCs o NPs por el método de emulsificación-difusión, fue el PVAL, ya que evita la agregación de las NCs cuando se encuentran en dispersión y con ello disminuye su velocidad de sedimentación, obteniendo sistemas mucho más estables. Este proceso se da, ya que las cadenas de PVAL poseen una gran afinidad a la superficie de las NCs o NPs y se une fuertemente a la superficie de éstas formando una capa estable, lo cual fue propuesto por Quintanar-Guerrero, D., *et al.*, 1998 (15). El principal inconveniente al emplearlo, es que al unirse fuertemente a la superficie puede coalescer con otras partículas en suspensión y formar aglomerados de partículas, es

por ello que es necesario remover el exceso de éste polímero estabilizante, lo cual es considerado como difícil de remover completamente de las NCs o NPs obtenidas, ya que se requiere una serie de lavados.

La cantidad residual de polímero estabilizante (PVAL) en las NCs se determinó basándose en un método validado por Raygoza, T., *et al.*, 1995 (94). Dicho método es la formación de un complejo colorido con yodo en presencia de ácido bórico en presencia de PVAL, el complejo formado es de color verde y estable por 15 min. Para dicha prueba se llevó a cabo el montaje de una curva de calibración con la finalidad de determinar la cantidad de PVAL residual en las NCs. Se demostró la linealidad del método, al observar que se obtuvo una r^2 0.9996, (Figura 33). El porcentaje de CV es aceptable, ya que el valor obtenido para este método espectrofotométrico es menor 3%, lo cual nos indica que la dispersión del conjunto de los datos de la curva de calibración es baja.

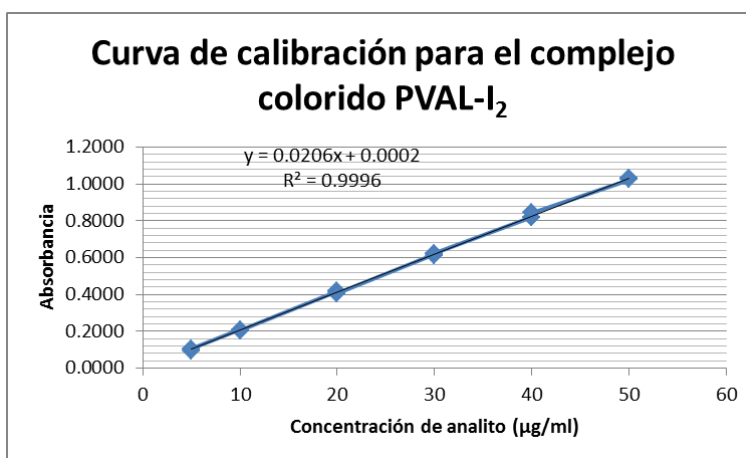


Figura 33. Curva de calibración para el complejo colorido PVAL-I₂.

Para todos los lotes se obtuvieron residuos de PVAL por debajo del 5%, como se observa en la Tabla 13, lo cual indica que los lavados realizados durante el proceso con la finalidad de eliminar el exceso de PVAL fueron suficientes y adecuados. Quintanar-Guerrero, D. *et al.* (1998) han reportado 6-8% de PVAL residual en nanoesferas de PLA preparadas por el método de emulsificación difusión (15), así como Piñón-Segundo, E. *et al.* (2003), que reportó cantidades de PVAL residual menores al 4% para nanoesferas de PLGA, PLA y CAP preparadas por el mismo método (95).

Tabla 13. Porcentaje de PVAL residual en NCs.

Lote	% PVAL residual
1	4.7412
2	3.6303
3	4.5520

2.4 Optimización del método analítico para la determinación de CHX por HPLC

El método analítico empleado para la cuantificación de CHX en los nanosistemas fue optimizado empleando una solución estándar de CHX de concentración 20 µg/ml, la cual fue inyectada al sistema cromatográfico para determinar su longitud de máxima absorción, su resolución y tiempo de retención en diferentes condiciones de trabajo.

Como se mencionó anteriormente, la CHX presenta un pico con una longitud de onda de máxima absorción a 260 nm, pero al mezclarse con el eugenol el cual presenta un pico de máxima absorción a 280 nm, la señal de CHX se suprime lo que imposibilita detectarla y con ello cuantificarla. La técnica elegida para la cuantificación de CHX en las NCs y NPs fue la cromatografía de líquidos HPLC, para ello se realizaron pruebas inyectando una serie de muestras al sistema cromatográfico variando la composición de la fase móvil. Las Figuras 34-38 muestran los cromatogramas obtenidos bajo ciertas condiciones de trabajo. Las muestras que presentan mejor resolución se detectaron a 260 nm y una velocidad de flujo de 1ml/min de fase móvil en una proporción 35:65 (v/v).

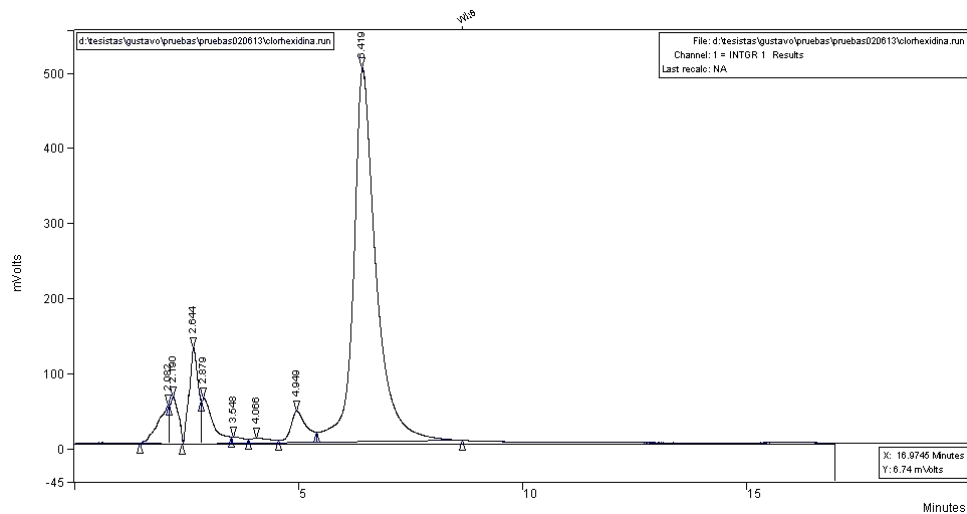


Figura 34. Cromatogramas de solución estándar de CHX.

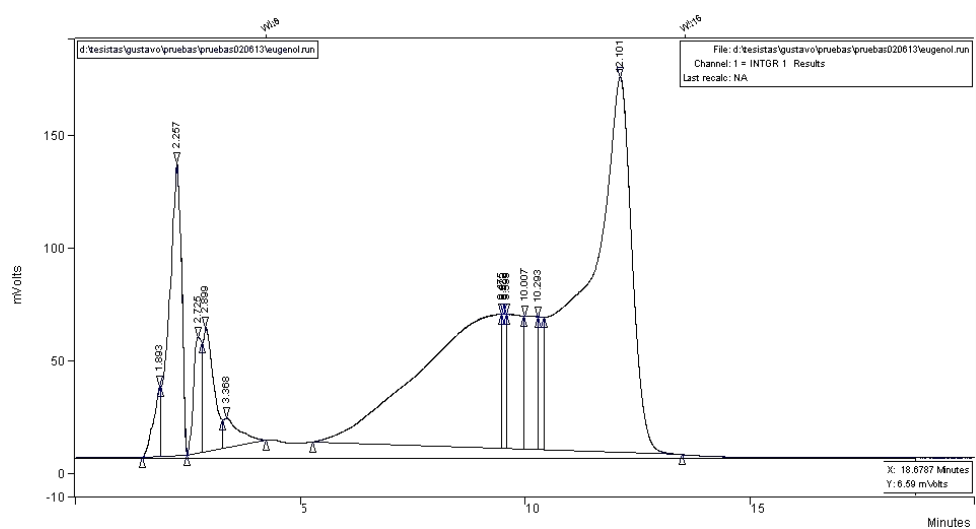


Figura 35. Cromatogramas de solución estándar de eugenol.

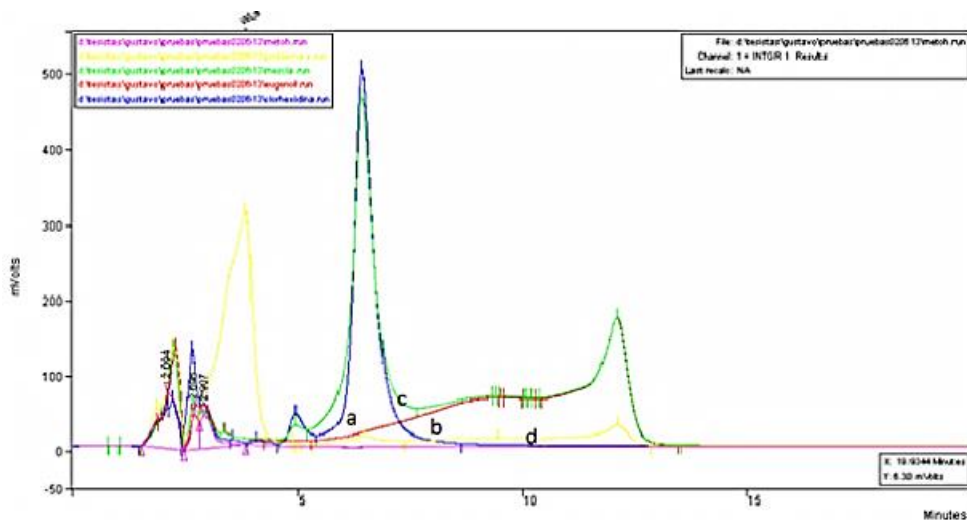


Figura 36. Cromatogramas obtenidos a partir de una solución estándar de; (a) CHX, (b) solución estándar de eugenol, (c) mezcla de CHX-eugenol y (d) muestra problema, empleando una fase móvil Acetonitrilo: Solución amortiguadora de acetatos pH 3.3 al 0.5% TEA (35:65)(v/v).

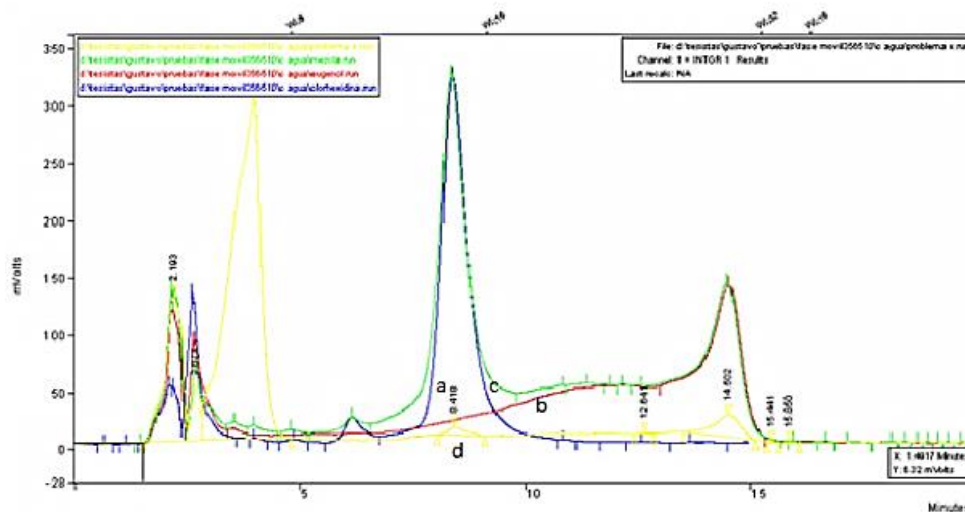


Figura 37. Cromatogramas obtenidos a partir de una solución estándar de; (a) CHX, (b) solución estándar de eugenol, (c) mezcla de CHX-eugenol y (d) muestra problema, empleando una fase móvil Acetonitrilo: Solución amortiguadora de acetatos pH 3.3 al 0.5% TEA: Agua (35:65:10)(v/v/v).

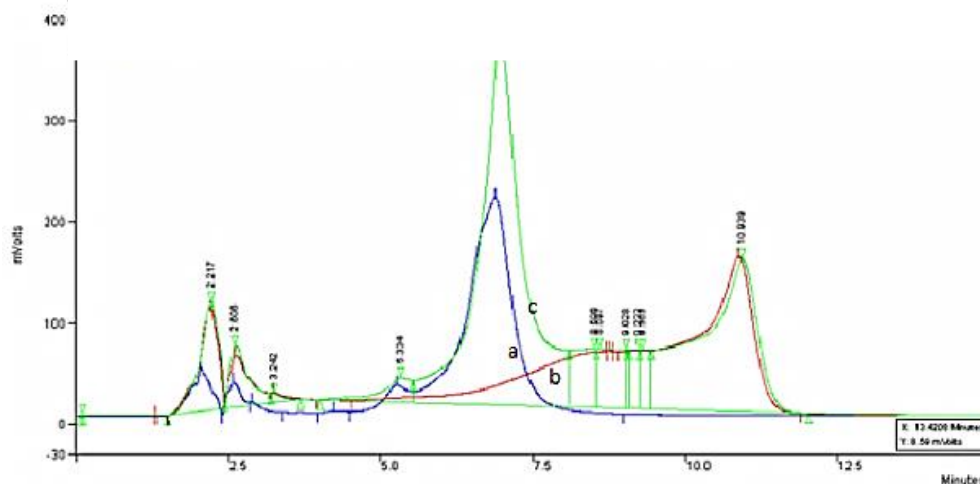


Figura 38. Cromatogramas obtenidos a partir de una solución estándar de; (a) CHX, (b) solución estándar de eugenol, (c) mezcla de CHX-eugenol, empleando una fase móvil Acetonitrilo: Solución amortiguadora de acetatos pH 3.3 al 0.5% TEA: Metanol (35:65:10)(v/v/v).

Con la finalidad de optimizar el método analítico, se inyectó una solución estándar de CHX de concentración conocida ($\approx 20\mu\text{g/ml}$), una solución estándar de aceite de eugenol ($\approx 738.5\mu\text{g/ml}$) y una mezcla de ambos analitos de concentración $\approx 758.5\mu\text{g/ml}$. En las Figuras 36-38 se observa que el tiempo de retención de la CHX varía conforme se modifica la composición de la fase móvil ($t_{\text{ret}} = 6.419, 8.364, 6.871$, respectivamente) debido a que se utilizó la cromatografía en fase reversa para llevar

acabo la separación, lo que significa que los compuestos menos polares serán retenidos por la fase estacionaria y los más polares serán arrastrados por la fase móvil con mayor facilidad de acuerdo a su composición. En las Figuras 36 y 37 se puede observar que el pico de CHX presenta una resolución adecuada y no así en la Figura 38, donde la altura del pico disminuye. Por otro lado, al inyectar la mezcla de ambos analitos al sistema cromatográfico no se observa una completa separación de los analitos debido a que la muestra tenía una concentración elevada (Figuras 36, 37, 38) pero al inyectar una muestra problema de extracción de CHX a partir de NCs se observa que hay una separación de ambos analitos (Figura 36, 37). Dichos resultados fueron empleados para determinar que las condiciones óptimas para llevar a cabo la cuantificación de CHX contenida en las NCs o NPs se obtienen utilizando una columna LiChrospher 100RP-18, 5 μ m (125x4 mm), una fase móvil con una mezcla Acetonitrilo: Solución amortiguadora de acetatos pH 3.3 al 0.5 % de trietilamina (TEA) en una proporción 35:65 (v/v) en condiciones isocráticas, una velocidad de flujo de 1 ml/min y una detección a 260 nm.

2.5 Validación del método analítico para la cuantificación de CHX mediante la técnica de HPLC

La Tabla 14 muestra los resultados obtenidos de la validación del método analítico para la cuantificación de CHX contenida en NFs, NCs y NPs de CAP.

Tabla 14. Parámetros obtenidos de la validación del método analítico para la cuantificación de CHX por HPLC.

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado
Linealidad del método	Valor de $r^2 \geq 0.9999$	$r^2 = 0.9994$
Precisión del método, repetibilidad	CV \leq 3.0 %	2.19 %
Precisión del método, reproducibilidad	CV \leq 3.0 %	2.47 %
Exactitud del método	DEA \leq 3.0 %	2.95 %
% Recobro	95-105 %	99.61 %

2.6 Preparación de NCs y NPs por el método de emulsificación-difusión

Las NCs y NPs fueron preparadas por el método de emulsificación-difusión como se describió anteriormente, esta técnica involucra el uso de disolventes orgánicos parcialmente miscibles con agua, los cuales son previamente saturados entre sí, con la finalidad de asegurar el equilibrio termodinámico de ambos líquidos. La selección del tipo de disolventes a utilizar para la preparación de las NCs y NPs se apoyó en investigaciones previas, en las cuales se han preparado nanoesferas (NSphs) y NCs a partir de PLA, PLGA y CAP (79). Cabe recordar que los compuestos o principios activos que pueden ser encapsulados por la técnica de emulsificación-difusión deben ser insolubles en agua. El principio activo modelo incorporado en las NCs y NPs fue la CHX, la cual es ampliamente utilizada como agente antimicrobiano en el área odontológica. La CHX es insoluble en agua y soluble en disolventes orgánicos a diferencia de sus sales que son muy solubles en medios acuosos.

2.7 Caracterización fisicoquímica de NCs y NPs obtenidas por el método de emulsificación-difusión

2.7.1 Tamaño y potencial Z

El tamaño de partícula y la distribución del tamaño de partícula son características importantes de los sistemas nanoparticulados, debido a que ellos determinan su distribución *in vivo*, su destino biológico, su toxicidad, su capacidad de dirección, además de influenciar en la carga de fármaco y en la estabilidad de los nanosistemas. La liberación del fármaco es afectada por el tamaño, esto se debe a que las partículas pequeñas tienen una gran área superficial lo que facilita una rápida liberación a diferencia de partículas grandes que poseen un mayor núcleo por lo que la difusión del fármaco será lenta. Debido a su tamaño, las NPs tienen un alto riesgo de agregación durante su almacenamiento y transportación (96,97).

Para la medición de tamaño de partícula se utilizó el equipo de medición de diámetro promedio de partículas Zetasizer[®] basado en la dispersión de luz dinámica, en donde las partículas son iluminadas con un láser; la intensidad de las fluctuaciones

de la dispersión de luz y su rango van a depender del tamaño de las partículas obteniendo así el llamado diámetro hidrodinámico y se refiere a como difunde una partícula en un fluido. Los resultados del diámetro promedio de partícula, índice de polidispersidad y potencial Z de los lotes preparados con diferente cantidad de principio activo se muestran en la Tabla 15.

Todos los lotes muestran tamaños inferiores a los 350 nm. Es importante destacar que las NCs de CAP cargadas con eugenol y CHX tenían tamaños entre un 60%-79% mayor que el de las NPs de CAP cargadas con CHX las cuales mostraron sólo un aumento del 37% con respecto al lote control. Esto indica que el 33-42% del aumento en el tamaño de las partículas puede ser atribuible a la presencia del aceite de eugenol, el cual se incorporó a la formulación de NCs preparadas por el método de emulsificación-difusión, para obtener posiblemente un efecto sinérgico (98,99). Piñón Segundo *et al.* (2005), encontraron que la nanoencapsulación de triclosán empleando CAP generó NPs con un tamaño de 192-235nm, que aumentaron de tamaño al incrementar la cantidad de triclosán (79).

Hipotéticamente el aumento en el tamaño de las partículas también puede atribuirse a la presencia de aceite de eugenol en las NCs además del tamaño de la molécula de CHX. La presencia de grupos -OH permite que el sistema se establezca formando hemiacetales unidos (100). En las NCs, el cambio de concentraciones de CHX de 10 a 20 mg aumentó ligeramente el tamaño de las partículas, mientras que el índice de polidispersidad (IP) aumentó ligeramente cuando se emplearon 20 a 30 mg de CHX. Se puede apreciar que al aumentar la cantidad de CHX en la formulación de NCs el tamaño de partícula se incrementa ligeramente, así como el IP.

La dispersidad es una medida de la heterogeneidad de los tamaños de las moléculas o partículas en una mezcla. Una colección de partículas se denomina monodispersas si las partículas tienen el mismo tamaño, forma, o masa. Una muestra de partículas que tienen una inconsistente distribución del tamaño, de la forma y de la masa es llamada polidispersa. Los rangos del índice de polidispersión varían desde un valor teórico de 0.000, para una población de gotas idealmente monodispersas a 0.500 para las distribuciones relativamente amplias. En la práctica, los valores de índice de polidispersión de 0.030-0.050 son encontrados para las dispersiones látex estándares consideradas como monodispersas. Los lotes con mayor cantidad de principio activo presentan una mayor desviación estándar en la

distribución del tamaño de partícula, lo cual es indicativo de un aumento en su índice de polidispersidad que nos indicaría la presencia de una población polidispersa, lo cual se observa en las Figuras 39, 40, 41.

Las diferencias entre las NCs y NPs pueden ser atribuibles principalmente al efecto del aceite de eugenol sobre el comportamiento interfacial durante el proceso de formación (mecanismo de difusión-evaporación), ya que esto puede aumentar la agregación de las proto-nanopartículas debido a una capa de difusión más grande. Cuando la cantidad de CHX en la formulación aumenta, el tamaño de partícula también aumenta ligeramente, al igual que el índice de polidispersidad, lo que indica que la cantidad de principio activo (10-30 mg) no tiene un efecto significativo sobre el tamaño de las NCs, (p-valor = 0.4797, Anexo 3).

Tabla 15. Resultados de pruebas de caracterización fisicoquímica de NPs control, NCs cargadas con diferente cantidad de CHX y NPs cargadas con CHX.

Formulación	Cantidad de CHX (mg)	Diámetro promedio \pm SD (nm)	Índice de Polidispersión \pm SD	Potencial-Z \pm SD (mV)	Eficiencia de proceso \pm SD (%)	Eficiencia de entrapamiento \pm SD (%)
Control	–	180.6 \pm 0.70	–	-10.83 \pm 0.77	–	–
	10	290.65 \pm 15.70	0.14 \pm 0.02	-20.16 \pm 2.64	84.30 \pm 0.74	61.93 \pm 4.28
NCs	20	324.46 \pm 55.46	0.238 \pm 0.02	-18.77 \pm 3.46	72.00 \pm 1.66	64.49 \pm 0.80
	30	296.35 \pm 39.00	0.291 \pm 0.05	-18.71 \pm 5.21	69.25 \pm 0.43	59.88 \pm 2.77
NPs	10	247.60 \pm 9.61	0.242 \pm 0.01	-20.35 \pm 1.91	57.17 \pm 1.23	77.36 \pm 0.62

Las cargas eléctricas tienen un importante papel en la determinación de la interacción de las partículas indicando la estabilidad física de la dispersión coloidal. El potencial Z de una nanopartícula es utilizado para caracterizar la carga de la superficie; este refleja el potencial eléctrico de las partículas y es influenciado por la composición de la matriz y por el medio en el que son dispersadas. Como se muestra en la Tabla 15 las NPs con potencial Z entre $|30 \text{ mV}|$ son estables en suspensión y la carga en la superficie previene la agregación de las partículas. El potencial Z puede ser empleado para determinar si un material con carga activa (principio activo) se encuentra encapsulado en el centro de una nanocápsula o adsorbido en la superficie, también si se encuentra disperso en la matriz de una nanopartícula (101).

Tabla 16. Estabilización de suspensiones en base a su potencial Z.

Estabilidad	Potencial Z (mV)
Muy buena	-100 a -60
Buena	-60 a -40
Moderada	-40 a -30
Umbral de dispersión	-30 a -15
Umbral de aglomeración	-15 a -10
Fuerte aglomeración y precipitación	-10 a -5

El potencial Z fue medido en un Zetasizer® empleando una celda de capilar doblado y mediante la aplicación de un campo eléctrico a través de la suspensión de NPs, las partículas con carga migran hacia el electrodo de carga opuesta, con una velocidad proporcional a la magnitud del potencial Z. El potencial Z mide el grado de repulsión entre partículas cargadas similarmente en una dispersión. De manera general cuando este es relativamente bajo, una atracción excede la repulsión y la dispersión puede flocular (102). Una dispersión de NPs con un potencial Z por arriba de $|30 \text{ mV}|$ ha demostrado ser estable, en gran parte debido a que la carga de la superficie impide la agregación de las partículas al provocar la repulsión entre éstas (97). El objetivo de la determinación del potencial Z es predecir la estabilidad que presentan las NCs y NPs, además de observar si el principio activo modelo (CHX) se encontraba encapsulado o adsorbido en la superficie.

Los resultados de potencial Z obtenidos para las NCs y NPs se muestran en la Tabla 15 y las Figuras 42,43,44, observándose que todos los lotes preparados presentan una potencial Z de alrededor de -20 mV lo cual sugiere que los nanosistemas son estables en dispersión, además de poseer carga negativa en su superficie. En base a lo reportado, en la Tabla 16 las NCs y NPs se encuentran en el umbral de dispersión, cabe mencionar que la dispersión de sólidos en líquidos puede ser estabilizada tanto por ausencia o presencia de barreras eléctricas o por barreras estéricas y en este caso el mecanismo de acción del estabilizante PVAL no es por repulsión de cargas si no por protección estérica debida a las cadenas de estabilizante que se encuentran adsorbidas en la superficie de las NCs o NPs, lo que impide su aglomeración, adicionalmente la talla nanométrica de los sistemas les confiere una adecuada dispersión (103–105). Todos los lotes presentaron una

cantidad residual de PVAL menor al 5% (Tabla 13), se cree que esta cantidad es suficiente para lograr una buena dispersión y estabilidad de los nanosistemas ya que la concentración de PVAL adsorbido a la superficie de las NPs previene su agregación por repulsión estérica, ya que forma una capa gruesa estable y fuertemente unida (51,80). Por otro lado, la carga que presentan las NCs y NPs es negativa, lo que podría ser indicativo que la CHX está encapsulada en el centro oleoso de las NCs o dispersa en la matriz de las NPs, ya que ésta presenta carga positiva y la carga negativa detectada se debe a la presencia del PVAL adsorbido en su superficie. Además, la carga positiva que posee la CHX contribuye a aumentar de manera positiva el valor del potencial Z en aproximadamente 10 mV, comparando los lotes controles contra los lotes cargados.

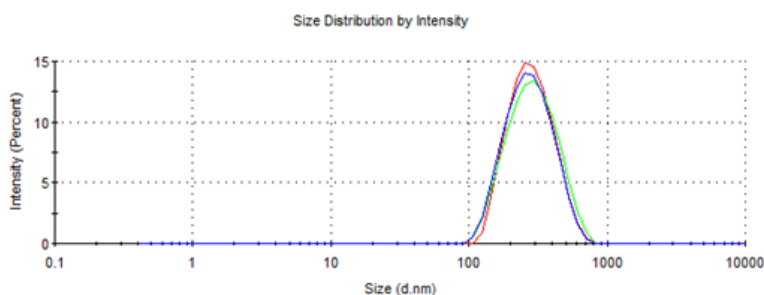


Figura 39. Distribución de tamaño de partícula de Nanocápsulas con 10 mg de CHX.

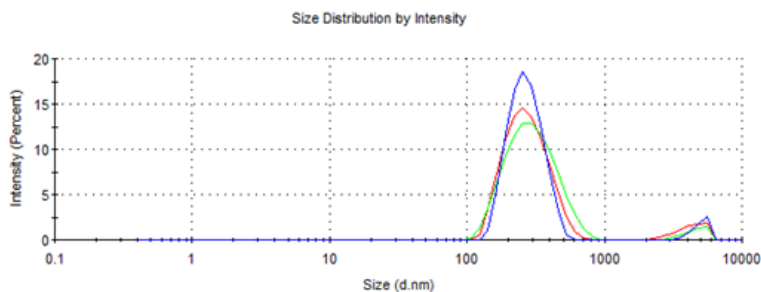


Figura 40. Distribución de tamaño de partícula de Nanocápsulas con 20 mg de CHX.

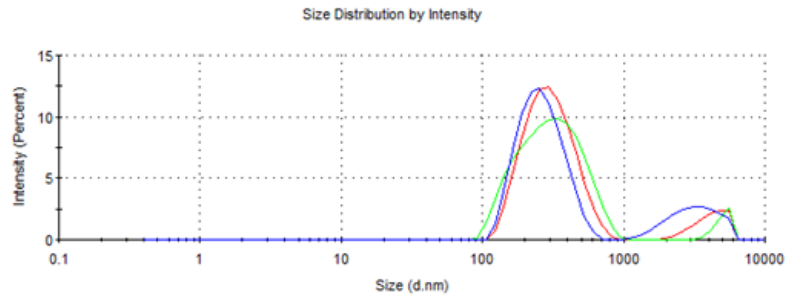


Figura 41. Distribución de tamaño de partícula de Nanocápsulas con 30 mg de CHX.

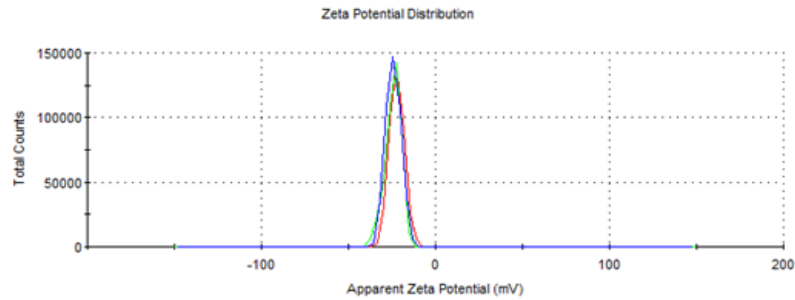


Figura 42. Potencial Z de Nanocápsulas con 10 mg de CHX.

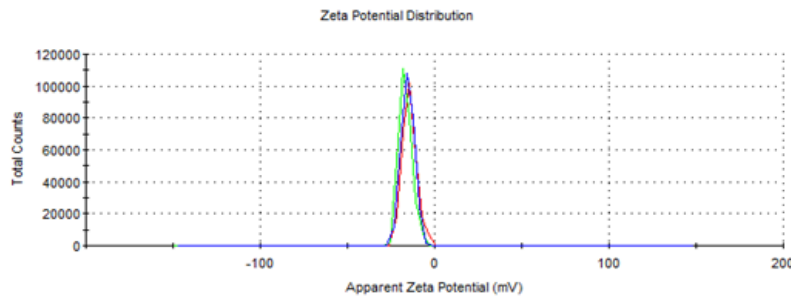


Figura 43. Potencial Z de Nanocápsulas con 20 mg de CHX.

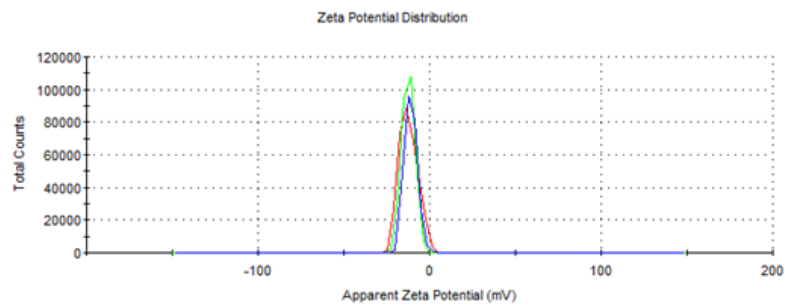


Figura 44. Potencial Z de Nanocápsulas con 30 mg de CHX.

2.7.2 Eficiencia de entrapamiento y eficiencia de proceso de NCs y NPs de CAP obtenidas por emulsificación-difusión.

La Tabla 15 muestra que la EP varía conforme se varía la cantidad de CHX presente en la formulación en un rango de 84 a 69 %. Por lo que una gran cantidad de principio activo disminuye la EP, debido a que esto incrementa la agregación de las cadenas poliméricas. Lo que podría deberse a que el proceso de elaboración de las NCs no soporta el aumento de principio activo, ya que al momento de realizar los lotes con 20 y 30 mg de CHX se observó una precipitación del polímero, que puede ser por una sobresaturación del sistema. También se puede observar que la CHX disminuye la eficiencia del estabilizante y con ello la eficiencia en la formación de NCs (106). Para todos los lotes preparados de NCs con diferente cantidad de CHX, los resultados muestran una diferencia estadísticamente significativa en la EP con un nivel de significancia del 95% (p -valor = 0.0000, Anexo 3). Posiblemente la EP en lotes cargados con 10 mg de CHX es mayor que en los lotes de NPs con la misma cantidad de CHX, debido a la presencia de aceite de eugenol, en donde la CHX fue disuelta antes de la adición del polímero, por lo que la agregación de las cadenas poliméricas es mucho menor lo que brinda una mayor EP de alrededor del 84.3%. Se ha propuesto que la presencia de eugenol promueve la formación de una interfaz definida de nanogotas de aceite y medio, formando una nanoemulsión donde el coacervado de polímero forma una película delgada a su alrededor. Por el contrario, la formación de NPs depende de la agregación de las cadenas poliméricas y la funcionalidad del estabilizador para evitar la coalescencia de las proto-nanopartículas, que está más influenciada por la presencia de CHX, estos sistemas presentaron una EP de alrededor de 57.17% (107).

Después de determinar la cantidad de CHX presente en las NCs y NPs por medio de la técnica HPLC se procedió a determinar la EE. Los datos se muestran en la Tabla 15, donde se considera que para todos los lotes el porcentaje de encapsulación puede considerarse como alto para CHX, alrededor de 60% con respecto a la cantidad inicial de CHX en la formulación pues es difícil alcanzar EE altas. Este comportamiento puede explicarse porque durante su proceso de formación no fue posible encapsular la cantidad total del aceite presente en la formulación, lo que significa que se perdió parte del principio activo disuelto en el aceite no encapsulado. En estos lotes, la pérdida de fármaco en la fase continua es

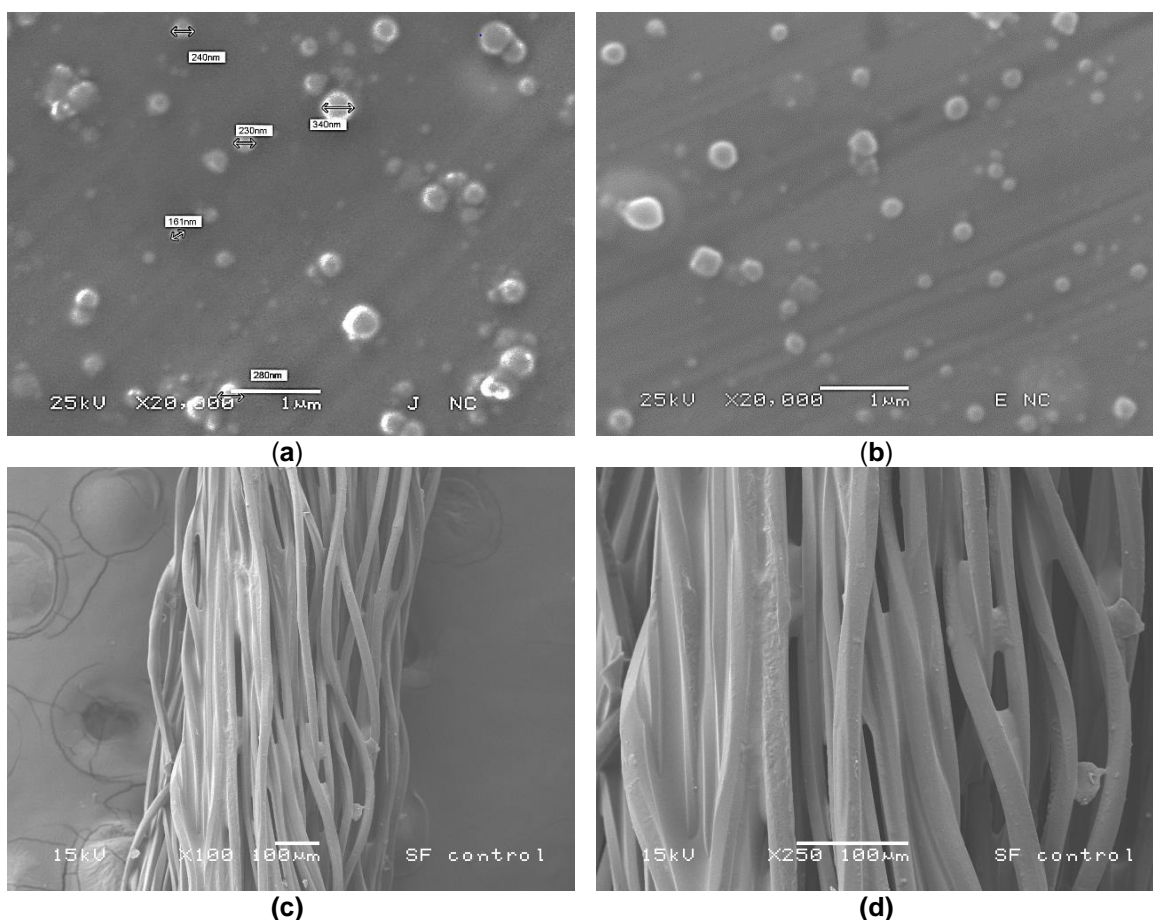
constante bajo las condiciones de trabajo establecidas. Por otro lado, en la formación de NPs es posible obtener altas EE de alrededor del 77%, debido a que el fármaco se mezcla directamente con el polímero que formará la matriz polimérica y sólo una pequeña cantidad de CHX no quedará atrapada en las cadenas poliméricas. Lboutonne *et al.*(2002), quienes encapsularon CHX en NCs poliméricas de poli(ϵ -caprolactona) como polímero y Labrafac hydrophile® WL 1219 como aceite, obtuvieron resultados similares (63). Se ha observado que es difícil lograr altas EE y EP debido a que el proceso de elaboración requiere de varias etapas de preparación y purificación, que de cierta forma podrían permitir la liberación y pérdida del principio activo antes de la formación de las NCs. En este sentido y considerando la alta volatilidad del aceite de eugenol, la cantidad de eugenol que permaneció presente en el procesamiento de las NCs se determinó mediante el método cromatográfico HPLC descrito anteriormente. Los resultados demostraron que hay una pérdida de alrededor del 90% de eugenol con respecto a la cantidad inicial. Ying Shao *et al.* (2018) han informado una EE de alrededor del 11-61% en nanoemulsiones de Eugenol-Quitosan, cuando son preparadas por tratamiento ultrasónico empleando una solución de ácido acético-quitosan que contiene 1% p/v de Tween 20 en proporciones de Quitosan- Eugenol (1:1) (108). Sin embargo, esta cantidad puede ser considerada suficiente para contribuir al efecto terapéutico, ya que se ha reportado que concentraciones de 10^{-8} a 10^{-5} M son efectivas en el tratamiento de la periodontitis (75,109). Es importante señalar que, cuando se combina con algunos antibióticos, el eugenol tiene un efecto sinérgico que aumenta el efecto terapéutico del antibiótico (74,110). Hanene Miladi *et al.* (2017) ha reportado un efecto sinérgico del aceite de eugenol y la tetraciclina con una tasa de reducción que oscila entre dos y ocho veces en la concentración mínima inhibitoria (MIC) (111).

Las capacidades de carga para los lotes de NCs fueron 2.72% para el más bajo (10 mg), 5.44% para el medio (20 mg) y 7.65% para la concentración más alta (30 mg). Por lo tanto, la cantidad de CHX en NCs no muestra una influencia estadísticamente significativa en el tamaño, aunque sí determina la capacidad de carga y la eficiencia del proceso. Con base a los resultados obtenidos se determinó que la mejor formulación sería aquella en donde la cantidad de CHX es de 10mg, la cual presenta un tamaño de partícula en un rango de entre 250-300nm, una población considerada

como monodispersa, una EE de alrededor del 60% y con una alta EP aproximada del 80%. Lo que nos aseguraría tener un sistema estable, el cual fue empleado para la realización de las siguientes pruebas de caracterización. Por otro lado, a partir de estos resultados se elaboraron NPs, considerando que para estos sistemas el aceite de eugenol no es incorporado a la formulación y los demás excipientes son incorporados en la misma proporción y condiciones.

2.7.3 Microscopia Electrónica de Barrido de NCs y NPs de CAP

Los estudios de MEB fueron realizados con las NCs cargadas con 10 mg de CHX, las cuales presentaron mejores resultados en cuanto a tamaño, EP y EE. Las micrografías de la Figura 45 (a-j) muestran que la morfología de las NCs y NPs cargadas con CHX es esférica y aparentemente de superficie homogénea sólida sin evidencia de cristales de principio activo en su superficie. Por otro lado, se demostró que los sistemas poseen un tamaño submicrónico y el tamaño de partícula concordó con el determinado por el método de dispersión de luz medido en el Zetasizer®.



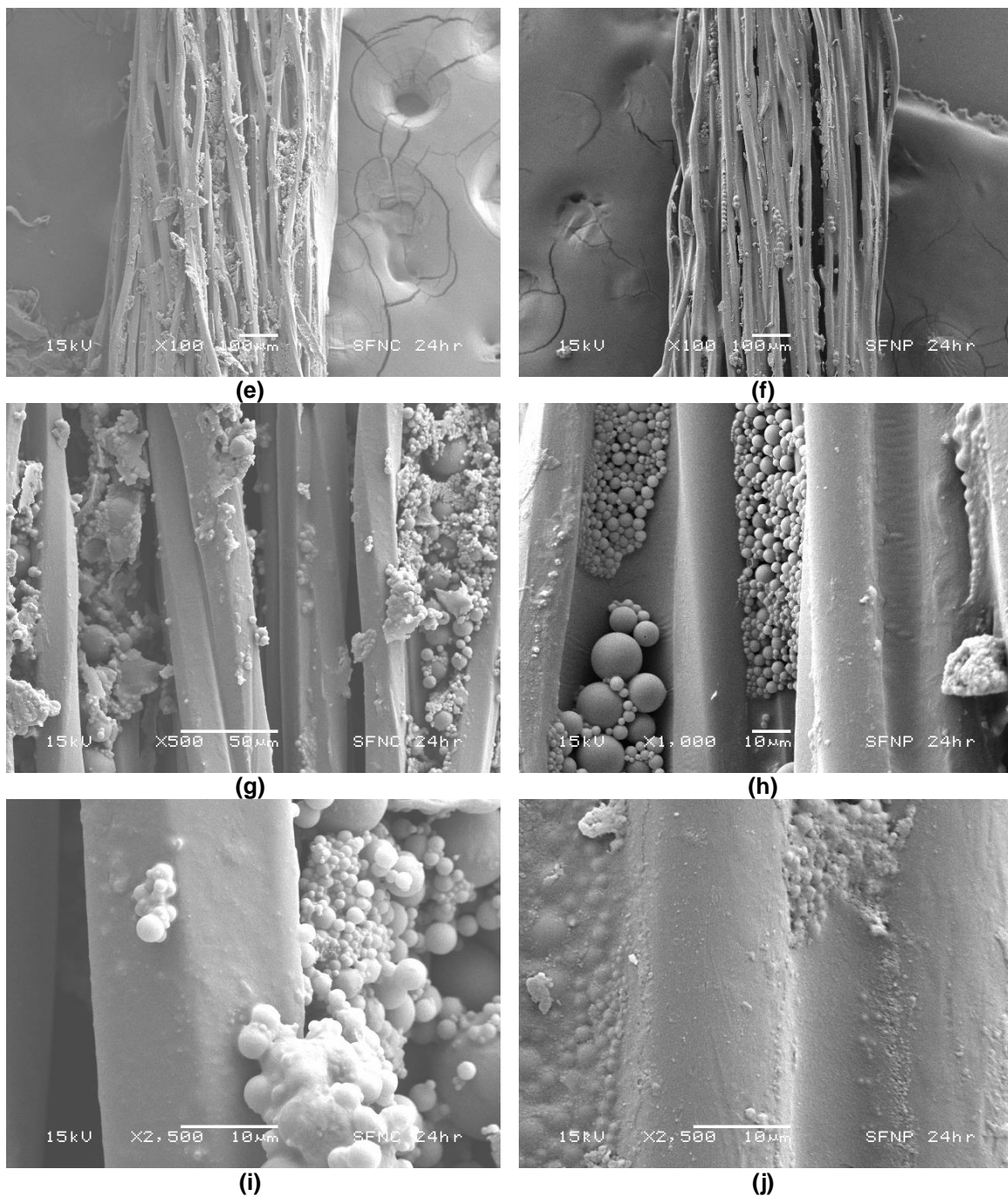


Figura 45. (a) Micrografías de NCs-CAP-CHX; **(b)** NPs-CAP-CHX; **(c, d)** Superficie y cuerpo de hilos dentales no encerados **(e, g, i)** NCs-CAP-CHX adsorbidas en la superficie de hilos dentales y **(f, h, j)** NPs-CAP-CHX adsorbidas en la superficie de hilos dentales.

Para demostrar la capacidad de infiltración de estos nanosistemas, NCs y NPs se infiltraron en hilos dentales no encerados sumergiendo estos en una suspensión al 5% (p/v) de cada nanosistema. Después de una inmersión por un periodo de 24 h,

la cantidad adsorbida de nanosistemas fue determinada, correspondiendo a 5.8 mg para NCs y 2.8 mg para NPs. La Figura 45 e-j muestra que tanto NCs como NPs fueron retenidos en la superficie y los espacios pequeños de los hilos dentales, lo cual es un hallazgo indicativo de su capacidad para infiltrarse y ser adsorbidos en diferentes superficies. En este sentido, se debe destacar que el pequeño tamaño de estos sistemas les permitiría infiltrarse en la bolsa periodontal aplicándose en forma de suspensión siempre y cuando esta se mantenga en un área específica o se infiltren directamente en el sitio, además de que los hilos dentales cargados con nanosistemas podrían fungir como un dispositivo de administración de NCs o NPs cargadas con algún principio activo en los espacios interdentales y alcanzar el surco gingival, lo cual podría ser una forma de prevención de periodontitis, al ejercer un efecto bacteriostático empleando bajas dosis de principio activo.

2.7.3 Propiedades térmicas de los componentes de la formulación por Calorimetría Diferencial de Barrido

Mediante DSC, se puede establecer la relación que existe entre los componentes de la matriz de las NCs y el fármaco, con la finalidad de observar si éste se encuentra disperso molecularmente en la matriz o en forma de cristales. Cuando existe una dispersión molecular del fármaco en las NCs no se detecta el pico endotérmico característico de la fusión del principio activo, por lo que se caracterizaron las NCs cargadas con clorhexidina mediante esta técnica. En la Figura 46 se presentan los termogramas correspondientes a la CHX polvo, aceite de eugenol, PVAL, CAP, una mezcla física de todos los componentes de la formulación y NCs cargadas con CHX. Cabe mencionar que el sistema de NCs fue empleada como sistema modelo de estudio ya que para su formulación se requieren la mayoría de los componentes empleados en la elaboración de NPs. En la Figura 46-c se observa el endoterma de fusión de la CHX a 135.65°C seguido de su degradación. La mezcla física (Figura 46-e) muestra un amplio pico entre las temperaturas de fusión del aceite de eugenol y el de la CHX, correspondiente a la interacción de dos sustancias. La disminución en el pico endotérmico de la CHX en esta mezcla física podría atribuirse a un efecto de dilución. Además, se observan ligeros cambios endotérmicos que indican la presencia de PVAL y CAP. En el caso

de las NCs cargadas con CHX (Figura 46-f) no se observa el pico endotérmico característico del punto de fusión de la CHX, además de observarse una disminución en la temperatura de transición vítrea del polímero. Este comportamiento nos sugiere que la CHX está disuelta en el eugenol, el cual está encapsulado en una membrana polimérica compuesta por el polímero CAP. Una observación particularmente importante es la ausencia del pico cristalino del CAP en el sistema de NCs, lo que sugiere que la CHX y el eugenol pueden actuar como plastificantes del polímero.

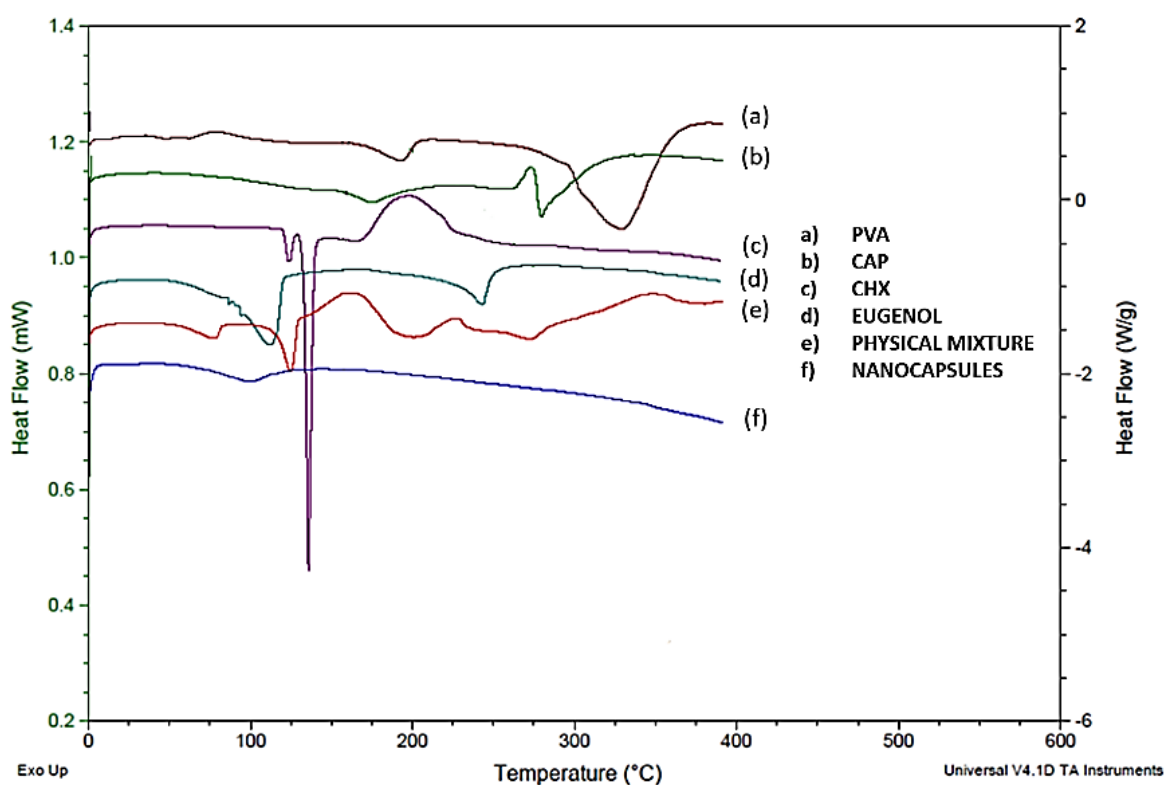


Figura 46. Termogramas obtenidos a partir de los componentes individuales de la formulación de Nanocápsulas; (a) PVAL; (b) CAP; (c) CHX; (d) Aceite de eugenol; (e) Mezcla física y (f) NCs-CAP-CHX.

2.8 Determinación de mecanismo de liberación del principio activo a partir de NCs y NPs.

Las Figuras 47 y 48 muestran los perfiles de liberación de CHX para NPs-CAP-CHX y NCs-CAP-CHX respectivamente. Ambos sistemas presentaron una rápida liberación de la CHX. Para NPs-CAP-CHX una completa liberación fue obtenida a los 15 min, mientras que para NCs-CAP-CHX esta se logró a los 80 min, empleando un medio de disolución compuesto de una solución amortiguadora de fosfatos pH 7 adicionada con Brij 58® al 2.5%(p/v). Debido a que la arquitectura de los nanosistemas es diferente, la velocidad de liberación se ve modificada. Las NPs poseen una estructura matricial, mientras que la estructura de las NCs es capsular. Un sistema matricial usualmente libera el principio activo mediante un mecanismo de difusión, mientras que un sistema capsular puede liberar el principio activo ya sea por difusión a través de la membrana o por rompimiento u explosión de la cápsula. Es de esperarse que ocurra un comportamiento similar bajo ciertas condiciones *in vivo*. Como se mencionó anteriormente la CHX es un principio activo clase II, lo que significa que su solubilidad es un factor limitante cuando se intenta simular las condiciones *in vivo* en las pruebas de liberación. Estos fármacos poseen una estrecha relación *in vitro-in vivo*, lo que permite realizar una buena predicción del rendimiento de la formulación *in vivo*, basándose en los resultados de los estudios de liberación de fármacos *in vitro* (90,91).

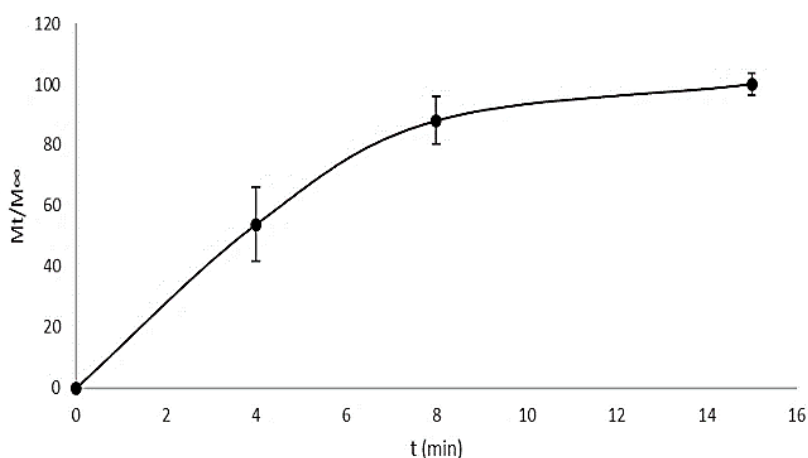


Figura 47. Perfil de liberación de CHX a partir de Nanopartículas.

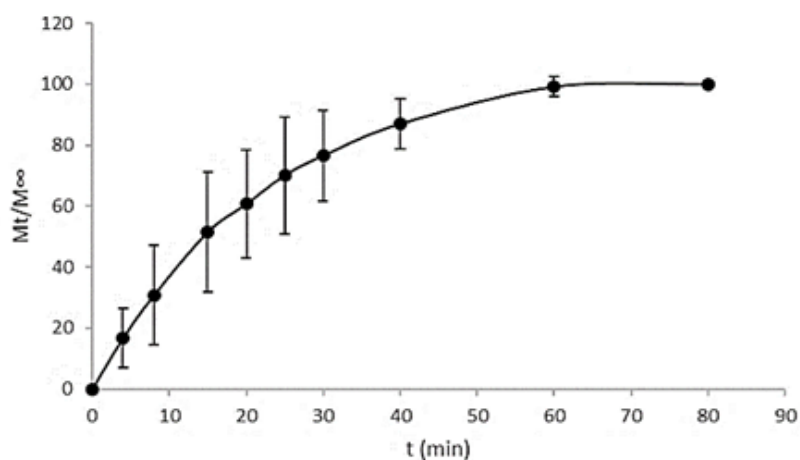


Figura 48. Perfil de liberación de CHX a partir de Nanocápsulas.

Las formas farmacéuticas convencionales utilizadas para tratar la EPD generalmente requieren varias aplicaciones a lo largo del día, debido a la rápida eliminación del medicamento del sitio. De hecho, sólo intervalos más cortos entre administraciones pueden garantizar un efecto farmacológico local (92). Estas aplicaciones adicionales pueden tener el costo en la aceptación del tratamiento por parte del paciente y pueden afectar su cumplimiento. Los sistemas desarrollados en el presente trabajo buscan mejorar la retención del principio activo en la bolsa periodontal, lo que significaría que se podrían reducir el número de administraciones para tener un alto efecto terapéutico. Debido a que NPs-CAP-CHX y NCs-CAP-CHX son elaborados a base de un polímero dependiente del pH, se espera que el principio activo se libere de forma rápida en casos de periodontitis leve, ya que el pH ligeramente básico del FCG promueve una rápida disolución del polímero CAP. Debido a que el ambiente de la bolsa periodontal tiende a volverse ácido durante la infección por las acciones combinadas del metabolismo bacteriano y la respuesta inmune del huésped, (67,93), las NCs de CAP no se erosionan en este medio por lo que pueden distribuirse en el FCG y a medida que el medio se basifica por la mejora de la EPD, debido a la acción antimicrobiana del propio polímero, las NCs liberan el principio activo a una mayor velocidad.

Los resultados del modelado matemático de los datos obtenidos de las pruebas de liberación *in vitro* se muestran en la Tabla 17. Para determinar si el mecanismo de transporte de la CHX se basa en una difusión Fickiana o no Fickiana, se utilizaron los modelos Korsmeyer-Peppas y Higuchi. Para ambos casos, es decir NPs y NCs,

los resultados se ajustaron al modelo de Korsmeyer-Peppas. Este es un modelo semiempírico que se desarrolló explícitamente para matrices poliméricas y se utiliza para elucidar el mecanismo de liberación, debido a su capacidad para diferenciar y clasificar sistemas con apariencia geométrica distintas, al interpretar sus exponentes (n). Las NCs y NPs presentan una forma geométrica similar a una esfera, lo que teóricamente significaría que para valores de $n=0.5$ una difusión Fickiana es predominante. Valores más altos de n, entre 0.5 y 1, ó $n = 1$, el mecanismo de transporte predominante es la transferencia de masa, correspondiente a una difusión no-Fickiana (112,113).

Tabla 17. Coeficientes de correlación y constantes de los modelos de cinética de liberación a partir de NPs y NCs, ecuación de Korsmeyer-Peppas y Higuchi.

Nanosistema	Korsmeyer-Peppas		Higuchi	
	r^2	n	r^2	K_H (mg/min ^{1/2})
NPs	0.913	0.471	0.890	0.2402
NCs	0.9464	0.6083	0.9343	0.1313

Las NPs mostraron una rápida liberación de la cantidad total de CHX a los 15 min. Los datos fueron ajustados al modelo matemático descrito por Korsmeyer-Peppas al mostrar un coeficiente de determinación de $r^2= 0.913$, un exponente de difusión de (n) igual a 0.471 y una $K_H= 0.2402$ mg/min^{1/2}. Estos resultados indican que la liberación de CHX siguió una difusión Fickiana y por lo tanto se involucran procesos de difusión-erosión, además de que la difusión molecular de la CHX tuvo lugar desde la matriz polimérica de las NPs, como consecuencia de un gradiente de concentraciones y la relajación de las cadenas poliméricas de CAP. Por otro lado, las NCs muestran una liberación más lenta que las NPs, ya que se obtiene una liberación completa del principio activo a los 80min, con un exponente de difusión (n) igual a 0.6083 y una $K_H = 0.1313$ mg/min^{1/2}. Por lo tanto, las NCs presentan una difusión no Fickiana; es decir, un transporte anómalo. Presumiblemente este comportamiento puede ocurrir debido a la presencia del aceite de eugenol, el cual actúa como un agente plastificante del polímero CAP, lo que probablemente retrasa la liberación del principio activo en el medio de disolución empleado, compuesto de

una solución amortiguadora de fosfatos pH 7 adicionado con Brij® 58 al 2.5%. El medio promueve la relajación de las cadenas poliméricas de CAP, las cuales forman parte de la membrana de las NCs, lo que permite la difusión del principio activo hacia el medio hasta un punto donde se erosiona por completo y se puede liberar la cantidad total del principio activo.

La comparación de los resultados obtenidos de ambos nanosistemas nos permite afirmar que la difusión Fickiana es el mecanismo de liberación predominante en ambos nanosistemas, además no debemos olvidar que, al emplear un polímero dependiente del pH, cambios en el pH del medio de liberación pueden retrasar el tiempo de liberación de la cantidad total de principio activo. Esta propiedad podría permitir una liberación prolongada durante largos periodos de tiempo, debido a que el pH del FCG en la bolsa periodontal cambia de alrededor de 7 en condiciones normales a 5 a medida que la EPD progresa debido a la inflamación y la acumulación de bacterias. En el caso de las NCs que contienen aceite de eugenol, este probablemente actúa en primera instancia reduciendo la inflamación del tejido y carga microbiana gracias a sus propiedades antiinflamatorias y antimicrobianas, con lo que se elevaría el pH del medio (FCG) y se conduciría a la disolución del polímero para liberar la cantidad restante de principio activo. A medida que disminuye el pH del medio las NCs pueden reducir su velocidad de liberación debido a que el polímero CAP disminuye su solubilidad en medios con pH ácidos. En el caso de EPD leve, el pH de la bolsa periodontal que contiene el FCG es ligeramente básico cercano a 7, y a medida que la presencia de bacterias disminuye el estadio de la enfermedad mejora hasta el punto en que la inflamación y otras molestias desaparecen. Es en este momento que el pH de la bolsa periodontal cambia de ligeramente básicos a ligeramente ácido, por lo que esperaríamos que esta disminución en el pH del medio de la bolsa periodontal, donde se infiltraran y depositaran las NPs o NCs, retrasara la liberación del principio activo a partir de nanosistemas formulados con CAP. La infiltración de NPs ha sido documentada por Ganem-Quintanar, 1997, quienes emplearon microscopia confocal para evidenciar su infiltración en el surco gingival. Por lo tanto, cuando las NPs o NCs se aplican suavemente en el surco gingival, pueden penetrar en el epitelio de unión. Estos resultados sugieren que las NPs pueden proporcionar un posible sistema de transporte *intrapocket* para el suministro de sustancias activas (19).

2.9 Prueba de panel, estudio Comparativo-Prospectivo

Se planeó el diseño de un ensayo clínico fase I comparativo-prospectivo, para realizar una prueba de panel, empleando el nanosistema obtenido como alternativa en el tratamiento de la EPD y observar con esto la efectividad del sistema. Para dicha prueba se propuso el empleo de dos formulaciones, una que incluye NCs de CAP conteniendo CHX, y otra un enjuague oral comercial que contenga CHX.

Los resultados del ensayo se resumen en la Figura 49, en donde se representa la evolución clínica de los pacientes con EPD mediante el monitoreo del porcentaje de reducción de placa dentobacteriana por la técnica de índice de O'Leary. Una breve descripción del procedimiento que se llevó a cabo se describe a continuación;

1. En primer lugar, se llevó a cabo un proceso de odontoxesis, con el cual se pretende eliminar la mayor parte del cálculo supragingival (sarro).
2. Enseguida se realizó un curetaje cerrado por cuadrante.
3. Se realizó el sondaje periodontal para determinar el estado clínico de la periodontitis.
4. Medición del porcentaje de placa bacteriana utilizando el índice de O'Leary, Llenado de periodontograma.
5. Profilaxis con cepillo, copa de hule y pasta para profilaxis sin flúor.
6. Instrucciones de la técnica de cepillado de Bass.
7. Toma de impresión de cavidad oral con Alginato.
8. Corrido de modelos para la realización de guardas oclusales.
9. Obtención de modelos, marcaje y elaboración de guarda en acetato blando calibre 80.
10. Recorte de guarda oclusal superior e inferior.
11. Asignación y explicación del manejo del sistema a utilizar por el paciente.
12. Colocación o administración del sistema sobre guardas.
13. Colocación de guardas en el paciente.
14. Monitoreo subsecuente del porcentaje de placa dentobacteriana utilizando el índice de O'Leary.

Los voluntarios fueron tratados con el procedimiento descrito anteriormente, recibiendo instrucciones de administrar una cantidad equivalente a 9 mg de CHX contenida en una suspensión de NCs por un periodo de 15 días, aplicada cada

tercer día, una vez al día. Cabe recalcar que la suspensión fue aplicada a través del uso de guardas oclusales (protectores dentales) que sólo son utilizadas por el paciente en el transcurso de la noche, cuando la actividad bacteriana es incrementada y el movimiento mecánico y el flujo de saliva se ve disminuido. La medición del índice de O'Leary muestra una disminución en el porcentaje de placa dentobacteriana como se observa en la Figura 49, que va de un 76% en la primera semana de tratamiento, a un 26% al término de las tres semanas, al emplear NCs-CAP-CHX, en comparación con un 91 al 67.5% cuando es empleada una solución comercial al 0.2% de CHX y se administra una cantidad equivalente a 18 mg de CHX en las mismas condiciones establecidas. Dichos resultados son consistentes con la mejora física de las encías de los voluntarios ya que muestran una mejora gradual al desinflamarse sus encías y disminuir la presencia de sangrado. Por otro lado, fue posible observar la aceptación del paciente a emplear el tratamiento, ya que al aplicar la suspensión de NCs no es necesario que la formulación sea aplicada varias veces al día, además de que su administración es nocturna y no interfiere en la rutina diaria de los pacientes. Cabe mencionar que las guardas oclusales tenían una consistencia suave que no causaba irritación a la cavidad oral de los pacientes. Se debe recalcar que la dosis administrada con el empleo de NCs es mucho menor que las dosis usualmente aplicadas con el uso de enjuagues bucales. Rodrigues *et al.* (2007), evaluaron la respuesta clínica del tejido periodontal tras la aplicación de un sistema denominado Periochip, dicho sistema fue comparado con el método tradicional de raspado y alisado radicular, demostrando una gran reducción en la profundidad de la bolsa periodontal y una mejora clínica, mediante el empleo de un sistema de administración de fármaco local en la bolsa periodontal (114). Kida Dorota *et al.* (2019), demostraron la disminución de la profundidad de la bolsa periodontal y del sangrado después de la aplicación clínica de matrices compuestas de hidroxietilcelulosa cargadas con metronidazol (115). Por otro lado, un estudio realizado por Beatriz, Norma *et al.* (2012) demostró una reducción del 26% en el porcentaje de PDB después de 14 días de tratamiento empleando un enjuague bucal de CHX al 0.12% (116).

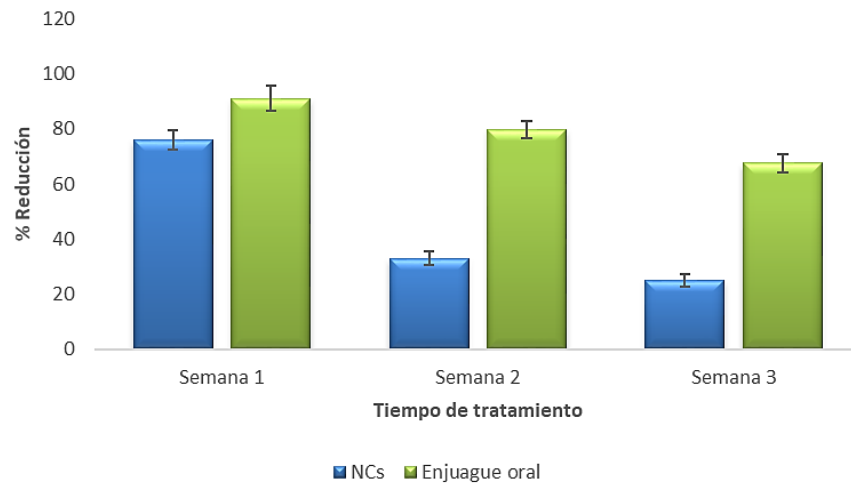


Figura 49. Porcentaje de reducción de la placa dentobacteriana tras el uso de Nanocápsulas cargadas con CHX o un enjuague oral conteniendo CHX al 0.2%.

CONCLUSIONES

Los sistemas nanoparticulados, llámense NPs, NCs o NFs, ofrecen grandes ventajas debido a que pueden ser incorporados diversos principios activos en ellos, dependiendo de su método de elaboración y a partir de diferentes materiales formadores de la matriz se puede modificar su velocidad de liberación, al ser administrados de manera local o sistémica. De manera general se puede concluir:

1. Se optimizó la técnica de electrospinning para la obtención de NFs poliméricas de CAP. Obteniéndose las mejores condiciones de proceso cuando la HR está por debajo del 30%, el voltaje es de 12.5kV, la velocidad de inyección es de 10 μ l /min y la distancia aguja-colector es de 15 cm.
2. Se analizaron las propiedades de la solución polimérica en la obtención de NFs poliméricas de CAP, observándose que la conductividad, tensión superficial y viscosidad, varían cuando la concentración de polímero, el tipo de disolvente y la cantidad de principio activo es diferente.
3. Se desarrolló, optimizó y validó el método analítico para la cuantificación de CHX contenida en los nanosistemas (NFs, NCs, NPs) mediante HPLC.
4. NFs de CAP fueron obtenidas y caracterizadas fisicoquímicamente, determinando su tamaño, morfología, EE, EP y comportamiento térmico. Las NFs obtenidas mostraron una mejor EE cuando una baja cantidad de principio activo es empleada, la cual llega hasta un 88,67%, con buenas EP, además de que fue posible obtener NFs de diámetros nanométricos. Los estudios de DSC mostraron que la introducción de CHX en la formulación disminuye la temperatura de transición vítrea del polímero y no se observa ninguna interacción fármaco-polímero.
5. Las pruebas de liberación de CHX mostraron que las NFs-CAP-CHX se ajustaron a los modelos Higuchi y Korsmeyer-Peppas, mostrando una difusión Fickiana que depende del tiempo y que implica un proceso de difusión-erosión. Los resultados indican que estos nanosistemas podrían ser de gran ayuda en el área odontología, por ejemplo, para tratar la enfermedad periodontal u otras afecciones de la cavidad oral además de posiblemente tener aplicaciones como la regeneración de tejidos.

6. Se optimizó el método de emulsificación-difusión, que permitió obtener sistemas nanoparticulados (NCs, NPs) estables, con un rendimiento y una EE de CHX adecuados.
7. Las NCs y NPs obtenidas fueron caracterizadas fisicoquímicamente en cuanto tamaño, potencial Z, EE, EP y comportamiento térmico, los resultados obtenidos nos indican que estos sistemas son adecuados para ser incorporados y utilizados como una formulación novedosa, para el tratamiento de la enfermedad periodontal.
8. Las NCs y NPs fueron adsorbidas en la superficie de hilos dentales, demostrando su capacidad para penetrar y adherirse en espacios pequeños, además dichos hilos podrían fungir como un dispositivo de administración.
9. Se determinó el mecanismo de liberación de CHX a partir de NCs y NPs, observan que la estructura matricial tiene influencia en la velocidad de liberación del principio activo además de ser afectada por el pH del medio, ya que CAP es un polímero pH dependiente.
10. Se realizó una prueba clínica preliminar, aplicando dos diferentes sistemas que contienen CHX, con la finalidad de observar la efectividad del sistema realizado, obteniéndose que el sistema que presenta mejores resultados en base a la reducción de la placa dentobacteriana, son las NCs, reduciendo la presencia de placa en un periodo de 15 días, aun siendo administrada en una dosis menor a las comúnmente empleadas por los enjuagues orales.

REFERENCIAS

1. Saunders SA. Current practicality of nanotechnology in dentistry. Part 1: Focus on nanocomposite restoratives and biomimetics. *Clin Cosmet Investig Dent*. 2009;1(1):47–61.
2. Andrew AM. NANOMEDICINE/BASIC CAPABILITIES. Landes Bio. Jr. RAF, editor. Vol. I. Austin, Texas: Robotica 18, 6; 2000. 345–347 p.
3. J.H.Kinney, S.Habelitz SJM and GWM. The importance of intrafibrillar mineralization of collagen on the mechanical properties of dentin,. *J Dent Res*. 2003;82(12):957–61.
4. J.W. Freeman, L.D. Wright, C.T. Laurencin SB. Nanostructures. In: C.T. Laurencin LSN by KE. GCRH, editor. *Biomedical Nanostructures*. Biomedical. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2008. p. 3–24.
5. Fahlman BD. Materials Chemistry. In: *The Netherlands*. Berlín; 2007. p. 282–3.
6. Jain N, Jain GK, Javed S, Iqbal Z, Talegaonkar S, Ahmad FJ, et al. Recent approaches for the treatment of periodontitis. *Drug Discov Today*. 2008;13(21–22):932–43.
7. A. Luzardo Álvarez, F. Otero Espinar JBM. The Application of Microencapsulation Techniques in the Treatment of Endodontic and Periodontal Diseases. *Pharmaceutics*. 2011;3:538–71.
8. Pragati S, Ashok S, Kuldeep S. Recent advances in periodontal drug delivery systems. *Int J Drug Deliv*. 2009;1:1–14.
9. Jessica D. Schiffman & Caroline L. Schauer. A review: Electrospinning of biopolymer nanofibers and their applications. *Polym Rev*. 2008;48(2):317–52.
10. Kriegel, C., Kit, K.M., McClements, D.J., Weiss J. Electrospinning of chitosan–poly(ethylene oxide) blend nanofibers in the presence of micellar surfactant solutions. *Polymer*. 2009;50(1):189–200.
11. Seeram Ramakrishna, Kazutoshi Fujihara, Wee-Eong Teo, Teik-Cheng Lim ZM. An introduction to electrospinning and nanofibers. In: *World Scientific*. 1st Edn. Singapore: Publishing Co. Pte. Ltd; 2005. p. 69–73.
12. Torres-Giner S. Desarrollo de nuevos materiales nanoestructurados obtenidos por la técnica de electroestirado de interés en aplicaciones alimentarias, farmacéuticas y biomédicas. Tesis Doctoral. IATA-CSIC, Valencia, España; 2010.
13. Lagaron, J. M., Gimenez, E., Sanchez-Garcia, M. A., Ocio, M. J., & Fendler A. Second generation nanocomposites: A must in passive and active packaging and biopackaging applications. In: *The 15th IAPRI World conference in packaging*. Tokyo, Japon; 2006.
14. Li D, Xia Y. Electrospinning of Nanofibers: Reinventing the Wheel? *Adv Mater*. 2004;16(14):1151–70.
15. Quintanar-Guerrero D, Allémann E, Fessi H. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev Ind Pharm*. 1998;24:1113–28.
16. Kashi T.S., Eskandarion S., Esfandyari-Manesh M., Marashi S.M., Samadi N., Fatemi S.M., Atyabi F., Eshraghi S. DR. Improved drug loading and antibacterial activity of minocycline-loaded PLGA nanoparticles prepared by solid/oil/water ion pairing method. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:221–34.

17. Bhardwaj A, Bhardwaj S, Pandey R. Advances in periodontal drug delivery systems. *Int J Nov Drug Deliv Technol.* 2012;2:271–5.
18. S.K. Sahoo, S. Parveen JJP. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine.* 2007;3(1):20–31.
19. A. Ganem-Quintanar. Étude de la perméabilité de la muqueuse orale: évaluation de différentes approches pour augmenter le passage des principes actifs. (Ph.D. thesis). Université de Genève/Université Claude Bernard, Lyon, Genève; 1997.
20. Sharma S, Cross SE, Hsueh C, Wali RP, Stieg AZ. Nanocharacterization in Dentistry. *Int J Mol Sci.* 2010;11(6):2523–45.
21. J. van der OF. Anti-plaque agents. Rationale and prospects for prevention of gingivitis and periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1991;18(6):447–54.
22. Villafuerte Robles L. Nanotecnología farmacéutica. Razón y palabra. 2009;(68):9.
23. ISO/TC 229. Draft standard on Nanotechnologies - Terminology and definitions for nanoparticles. 2008.
24. ISO/TS27687. Nanotechnologies- Terminology and definitions for nano-objets: Nanoparticle, nanofibre and nanoplate. 2008.
25. Marín Márquez P. MTP. Diseño y estudio de una máquina de electrospinning. Tesis de Maestría. Universidad Politécnica de Cataluña; 2009.
26. EL-Rafei AM. Optimization of the electrospinning parameters of Mn₂O₃ and Mn₃O₄ nanofibers. *Ceram Int.* 2015;41(9):12065–72.
27. Asis Patanaik, Rajesh D. Anandjiwala, R. S Rengasamy, Anindya Ghosh HP. Nanotechnology in fibrous materials - a new perspective. *Text Prog.* 2007;39(2):67–120.
28. Ladd MR, Hill TK, Yoo JJ, Lee SJ. Electrospun nanofibers in tissue engineering. In: *Nanofibers - Production, properties and functional applications.* InTech; 2011. p. 347–72.
29. Niu H, Wang X, Li T. Needleless Electrospinning: Developments and Performances. In: *Nanofibers - Production, Properties and Functional Applications.* InTech; 2011. p. 17–36.
30. Huang ZM, Zhang YZ, Kotaki M, Ramakrishna S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Compos Sci Technol.* 2003;63(15):2223–53.
31. Andrady AL. Science and Technology of polymer nanofibers. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey; 2008. 27–50 p.
32. Bosworth Lucy A, Downes S. Electrospinning for tissue regeneration. 1st ed. Oxford-Cambridge-Philadelphia-New Delhi: Woodhead Publishing Series in Biomaterials; 2011. 424 p.
33. Bhardwaj N, Kundu SC. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol Adv.* 2010;28(3):325–47.
34. Yu DG, Williams GR, Gao LD, Bligh SWA, Yang JH, Wang X. Coaxial electrospinning with sodium dodecylbenzene sulfonate solution for high quality polyacrylonitrile nanofibers. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2012;396:161–8.
35. Cheng J, Li H, Cao Z, Wu D, Liu C, Pu H. Nanolayer coextrusion : An efficient and environmentally friendly micro / nano fiber fabrication technique. *Mater Sci Eng C.* 2019;95:292–301.

36. Patel GC, Yadav BK. Polymeric nanofibers for controlled drug delivery applications. In: Grumezescu AM, editor. *Organic Materials as Smart Nanocarriers for Drug Delivery*. William Andrew Publishing; 2018. p. 147–75.
37. Pelipenko J, Kocbek P, Kristl J. Critical attributes of nanofibers: Preparation, drug loading, and tissue regeneration. *Int J Pharm*. 2015;484(1–2):57–74.
38. Kamble P, Sadarani B, Majumdar A, Bhullar S. Nanofiber based drug delivery systems for skin: A promising therapeutic approach. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2017;41:124–33.
39. Ghafoor B, Aleem A, Najabat Ali M, Mir M. Review of the fabrication techniques and applications of polymeric electrospun nanofibers for drug delivery systems. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2018;48:82–7.
40. Chen S, Li R, Li X, Xie J. Electrospinning: An enabling nanotechnology platform for drug delivery and regenerative medicine. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018;132:188–213.
41. Daewoo Han, Xinjun Yu, Qinyuan Chai, Neil Ayres AJS. Stimuli-responsive self-immolative polymer nanofiber membranes formed by coaxial electrospinning. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017;9(13):11858–65.
42. Bhattarai RS, Bachu RD, Boddu SHS, Bhaduri S. Biomedical Applications of Electrospun Nanofibers : Drug and Nanoparticle Delivery. *Pharmaceutics*. 2019;11(5):1–30.
43. Shenoy D, Little S, Langer R AM. Poly (ethylene oxide)-modified poly (β amino ester) nanoparticles as a pH-sensitive system for tumor targeted delivery of hydrophobic drugs. 1. In vitro evaluation. *Mol Pharm*. 2005;2(5):357–66.
44. Petersen PE, Ogawa H. The global burden of periodontal disease: Towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontol 2000*. 2012;60(1):15–39.
45. Hatipoglu H, Yaylak F, Gungor Y. A brief review on the periodontal health in metabolic syndrome patients. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev*. 2015;9(2):124–6.
46. Oruba Z, Łabuz P, Macyk W, Chomyszyn-Gajewska M. Antimicrobial photodynamic therapy-A discovery originating from the pre-antibiotic era in a novel periodontal therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2015;12(4):612–8.
47. Friedman M, Steinberg D. Sustained-release delivery systems for treatment of dental diseases. *Pharm Res*. 1990;7(4):313–7.
48. H.R. R, Dhamechac D, Jagwanic S, Raoa M, Jadhavd K, Shaikhc S, et al. Local drug delivery systems in the management of periodontitis: A scientific review. *J Control Release*. 2019;307:393–409.
49. Hajishengallis G. The inflammophilic character of the periodontitis-associated microbiota. *Mol Oral Microbiol*. 2014;29(6):248–57.
50. Sundararaj SC, Thomas MV, Peyyala R, Dziubla TD P DA. Design of a Multiple Drug Delivery System Directed at Periodontitis. *Biomaterials*. 2013;34(34):8835–42.
51. Phaechamud T, Setthajindalert O. Cholesterol in situ forming gel loaded with doxycycline hyclate for intra-periodontal pocket delivery. *Eur J Pharm Sci*. 2017;99:258–65.
52. Hughes FJ. Periodontium and Periodontal Disease. In: Vishwakarma A, Sharpe P, Shi S, Ramalingam M, editors. *Stem Cell Biology and Tissue*

- Engineering in Dental Sciences. 1st Editio. Elsevier Inc.; 2014. p. 433–44.
53. Yue IC, Poff J, Cortés ME, Sinisterra RD, Faris CB, Hildgen P, et al. A novel polymeric chlorhexidine delivery device for the treatment of periodontal disease. *Biomaterials*. 2004;25(17):3743–50.
 54. Harvey JD. Periodontal Microbiology. *Dent Clin North Am*. 2017;61(2):253–69.
 55. Reverdy ME. La chlorhexidine, in: J. Fleurette, J. Frueney, M.-E. Reverdy (Eds.), *Antisepsie et Désinfection*. ESKA, Paris; 1995. 135–168 p.
 56. Kopytynska-Kasperczyk A, Dobrzynski P, Pastusiak M, Jarzabek B, Prochwicz W. Local delivery system of doxycycline hyclate based on - caprolactone copolymers for periodontitis treatment. *Int J Pharm*. 2015;491(1–2):335–44.
 57. Huynh TTN, Padois K, Sonvico F, Rossi A, Zani F, Pirot F, et al. Characterization of a polyurethane-based controlled release system for local delivery of chlorhexidine diacetate. *Eur J Pharm Biopharm*. 2010;74(2):255–64.
 58. Matthijs S, Adriaens PA. Chlorhexidine varnishes: a review. *J Clin Periodontol*. 2002;29(1):1–8.
 59. Cavallari C, Brigidi P, Fini A. Ex-vivo and in-vitro assessment of mucoadhesive patches containing the gel-forming polysaccharide psyllium for buccal delivery of chlorhexidine base. *Int J Pharm*. 2015;496(2):593–600.
 60. Senior N. Some observations on the formulation and properties of chlorhexidine. *J Soc Cosmet Chem*. 1973;24(4):259–78.
 61. Zeng P, Zhang G, Rao A, Bowles W, Wiedmann TS. Concentration dependent aggregation properties of chlorhexidine salts. *Int J Pharm*. 2009;367(1–2):73–8.
 62. Lee D-Y, Spångberg LSW, Bok Y-B, Lee C-Y, Kum K-Y. The sustaining effect of three polymers on the release of chlorhexidine from a controlled release drug device for root canal disinfection. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2005;100(1):105–11.
 63. Lboutounne H, Chaulet JF, Ploton C, Falson F, Pirot F. Sustained ex vivo skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly(ϵ -caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a digluconate. *J Control Release*. 2002;82(2–3):319–34.
 64. Ankola A V., Hebbal M, Mocherla M. A review of efficacy of various modes of chlorhexidine delivery. *J Oral Biosci*. 2008;50(4):239–42.
 65. Jones CG. Chlorhexidine: Is it still the gold standard? *Periodontol* 2000. 1997;15:55–62.
 66. Viswanathan K, Monisha P, Srinivasan M, Swathi D, Raman M, Dhinakar R. Chlorhexidine-calcium phosphate nanoparticles - Polymer mixer based wound healing cream and their applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;67:516–21.
 67. Onnainty R, Onida B, Páez P, Longhi M, Barresi A, Granero G. Targeted chitosan-based bionanocomposites for controlled oral mucosal delivery of chlorhexidine. *Int J Pharm*. 2016;509(1–2):408–18.
 68. Withers NJ, Senthil A, Osinski M, Nguyen JQ, Alas G, Minetos C, et al. Effects of iron-oxide nanoparticles on compound biofilms of streptococcus gordonii and fusobacterium nucleatum. In: Liang X-J, Parak WJ, Osiński M, editors. *Colloidal Nanoparticles for Biomedical Applications XIII*. SPIE; 2018.

- p. 17.
69. Zupancic S, Kocbek P, Baumgartner S, Kristl J. Contribution of Nanotechnology to Improved Treatment of Periodontal Disease. *Curr Pharm Des.* 2015;21(22):3257–71.
 70. Heinämäki JT, Iraizoz Colarte A, Nordström AJ, Yliruusi JK. Comparative evaluation of ammoniated aqueous and organic-solvent-based cellulose ester enteric coating systems: a study on free films. *Int J Pharm.* 1994;109(1):9–16.
 71. Edgar K. Cellulose esters in drug delivery. *Cellulose.* 2007;14(1):49–64.
 72. Rowe R.C., Sheskey J Paul QEM. *Handbook of Pharmaceutical Excipients.* 6th ed. London: Pharmaceutical Press; 2009. 888 p.
 73. Shokri J, Adibkia K. Application of Cellulose and Cellulose Derivatives in Pharmaceutical Industries. In: Theo van de ven, Louis G, editors. *Cellulose - Medical, Pharmaceutical and Electronic Applications.* InTechOpen; 2013.
 74. Moon SE, Kim HY, Cha JD. Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. *Arch Oral Biol.* 2011;56(9):907–16.
 75. Hashieh IA, Pommel L, Camps J. Concentration of eugenol apically released from zinc oxide-eugenol-based sealers. *J Endod.* 1999;25(11):713–5.
 76. Irwin CR, Mccullough KC, Jones DS. Chlorhexidine-containing mucoadhesive polymeric compacts designed for use in the oral cavity: An examination of their physical properties, in vitro/in vivo drug release properties and clinical acceptability. *J Mater Sci Mater Med.* 2003;14(10):825–32.
 77. Alvarez Echazú MI, Olivetti CE, Anesini C, Perez CJ, Alvarez GS, Desimone MF. Development and evaluation of thymol-chitosan hydrogels with antimicrobial-antioxidant activity for oral local delivery. *Mater Sci Eng C.* 2017;81:588–96.
 78. Scholz OA, Wolff A, Schumacher A, Giannola LI, Campisi G, Ciach T, et al. Drug delivery from the oral cavity: focus on a novel mechatronic delivery device. *Drug Discov Today.* 2008;13(5–6):247–53.
 79. Piñón-Segundo E, Ganem-Quintanar A, Alonso-Pérez V, Quintanar-Guerrero D. Preparation and characterization of triclosan nanoparticles for periodontal treatment. *Int J Pharm.* 2005;294:217–32.
 80. Quintanar-Guerrero D, Fessi H, Allémann E, Doelker E. Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. *Int J Pharm.* 1996;143(2):133–41.
 81. Zambrano-Zaragoza ML, Mercado-Silva E, Gutiérrez-Cortez E, Castaño-Tostado E, Quintanar-Guerrero D. Optimization of nanocapsules preparation by the emulsion-diffusion method for food applications. *LWT - Food Sci Technol.* 2011;44(6):1362–8.
 82. Allémann E, Doelker R. Drug loaded poly(lactic acid)nanoparticles produced by a reversible salting-out process: Purification of an injectable dosage form. *Eur J Pharm Biopharm.* 1993;39:13–8.
 83. Gjoseva S, Geskovski N, Sazdovska SD, Popeski-Dimovski R, Petruševski G, Mladenovska K, et al. Design and biological response of doxycycline loaded chitosan microparticles for periodontal disease treatment. *Carbohydr Polym.* 2018;186:260–72.

84. Agullo MJA, Loscos FG. Periodoncia para el higienista dental: Importancia del uso de índices en la práctica periodontal diaria del higienista dental. *Periodoncia*. 2003;13(3):233–44.
85. Quiñonez-Zárate LA, Barajas-Michel AM. Plaque Control with O'Leary index, instructing the Bass brushing technique in pediatric patients postgraduate Pediatric Dentistry of the UAN. *EDUCATECONCIENCIA*. 2015;5(6):106–18.
86. Taleghani F, Rezvani G, Birjandi M, Valizadeh M. Impact of green tea intake on clinical improvement in chronic periodontitis : A randomized clinical trial. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg*. 2018;119(5):365–8.
87. H. Fong, I. Chun DHR. Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer (Guildf)*. 1999;40(16):4585–92.
88. Megelski S, Stephens JS, Chase DB, Rabolt JF. Micro-and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers. *Macromolecules*. 2002;35(22):8456–66.
89. Teo,W.-E. Addressing the Needs of Nanofiber Mass Production (Limitation of Nozzle System). Available online: <http://electrospintech.com/mpchallenge.html#.WK2nq28rLIX> (accessed on 07 October 2019).
90. Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability. *Pharm Res*. 1995;12(3):413–20.
91. Campos JC, Ferreira DC, Lima S, Reis S, Costa PJ. Swellable polymeric particles for the local delivery of budesonide in oral mucositis. *Int J Pharm*. 2019;566:126–40.
92. Russo E, Selmin F, Baldassari S, Gennari CGM, Caviglioli G, Cilurzo F, et al. A focus on mucoadhesive polymers and their application in buccal dosage forms. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2016;32(10):113–25.
93. Vieira Colombo AP, Bichara Magalhaes C, Rocha Resende Hartenbach FA, Martins do Souto R, da Silva-Boghossian CM. Periodontal-disease-associated biofilm: A reservoir for pathogens of medical importance. *Microb Pathog*. 2016;94:27–34.
94. Raygoza T. Estudio de liberación del clorhidrato de pseudoefedrina en matrices hidrofílicas de PVAL 522 y su relación con el hinchamiento. Tesis de licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, México. 1995.
95. Piñon-Segundo E. Desarrollo tecnológico y caracterización de partículas submicrónicas poliméricas como vectores terapéuticos para el tratamiento de enfermedades periodontales. Tesis de Maestría, Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas. Universidad Nacional Autónoma de México;
96. Cho EJ, Holback H, Liu KC, Abouelmagd SA, Park J, Yeo Y. Nanoparticle characterization: State of the art, challenges, and emerging technologies. *Mol Pharm*. 2013;10(6):2093–110.
97. Mohanraj VJ, Chen Y. Nanoparticles – A Review. *Trop J Pharm Res*. 2006;5(1):561–73.
98. de Araújo Lopes A, da Fonseca FN, Rocha TM, de Freitas LB, Araújo EVO, Wong DVT, et al. Eugenol as a Promising Molecule for the Treatment of Dermatitis: Antioxidant and Anti-inflammatory Activities and Its

- Nanoformulation. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:8194849.
99. Seneviratne CJ, Leung KC-F, Wong C-H, Lee S-F, Li X, Leung PC, et al. Nanoparticle-Encapsulated Chlorhexidine against Oral Bacterial Biofilms. Wen Z, editor. *PLoS One*. 2014;9(8):e103234.
 100. Liakos IL, Iordache F, Carzino R, Scarpellini A, Oneto M, Bianchini P, et al. Cellulose acetate - essential oil nanocapsules with antimicrobial activity for biomedical applications. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2018;172:471–9.
 101. Riddick TM. Control of Colloid Stability through Zeta Potential. Wynnewood, Wynnewood, Pa L, editor. Zeta-Meter Inc.; 1968.
 102. ASTM International. Standard test methods for zeta potential of colloids in water and waste water. In: *The Annual Book of ASTM Standards*. West Conshohocken, PA: ASTM International; 1985. p. 4182–7.
 103. Malkin AY, Zadymova NM, Skvortsova ZN, Traskine VY, Kulichikhin VG. Formation of concentrated emulsions in heavy oil. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2016;504:343–9.
 104. Noriega-Peláez EK, Mendoza-Muñoz N, Ganem-Quintanar A, Quintanar-Guerrero D. Optimization of the emulsification and solvent displacement method for the preparation of solid lipid nanoparticles. *Drug Dev Ind Pharm*. 2011;37(2):160–6.
 105. Rosen MM, Kunjappu JT. Dispersion and aggregation of solids in liquid media by surfactants. In: *Surfactants and interfacial phenomena*. 3rd ed. Wiley & Sons; 2004. p. 344–64.
 106. Quintanar-Guerrero D, Allémann E, Doelker E, Fessi H. A mechanistic study of the formation of polymer nanoparticles by the emulsification-diffusion technique. *Colloid Polym Sci*. 1997 Jul;275(7):640–7.
 107. Li M, Rouaud O, Poncelet D. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *Int J Pharm*. 2008;363:26–39.
 108. Shao Y, Wu C, Wu T, Li Y, Chen S, Yuan C, et al. Eugenol-chitosan nanoemulsions by ultrasound-mediated emulsification: Formulation, characterization and antimicrobial activity. *Carbohydr Polym*. 2018;193:144–52.
 109. Jesudasan JS, Wahab PUA, Sekhar MRM. Effectiveness of 0.2% chlorhexidine gel and a eugenol-based paste on postoperative alveolar osteitis in patients having third molars extracted: A randomised controlled clinical trial. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2015;53(9):826–30.
 110. Albano M, Alves FCB, Andrade BFMT, Barbosa LN, Pereira AFM, Cunha M de LR de S da, et al. Antibacterial and anti-staphylococcal enterotoxin activities of phenolic compounds. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2016;38:83–90.
 111. Miladi H, Zmantar T, Kouidhi B, Al Qurashi YMA, Bakhrouf A, Chaabouni Y, et al. Synergistic effect of eugenol, carvacrol, thymol, p-cymene and γ -terpinene on inhibition of drug resistance and biofilm formation of oral bacteria. *Microb Pathog*. 2017;112:156–63.
 112. Costa P, Sousa Lobo JM. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci*. 2001;13(2):123–33.
 113. Ritger PL, Peppas NA. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *J Control Release*. 1987;5(1):37–42.

114. Rodrigues, I. F., Machion, L., Casati, M. Z., Nociti, F. H., Toledo, S., Sallum, A. W. and Sallum EA. Clinical evaluation of the use of locally delivered chlorhexidine in periodontal maintenance therapy. *J Periodontol.* 2007;78:624–8.
115. Kida D, Junka A, Sender-Janeczek A, Dus I, Dominik M. Metronidazole-Loaded Porous Matrices for Local Periodontitis Treatment : In Vitro Evaluation and In Vivo Pilot Study. *Appl Sci.* 2019;9:4545.
116. Beatriz N, Hernández B, Gabriela M, García N, Eric M, Rivera G, et al. Eficacia de la clorhexidina en el tratamiento de gingivitis : tabletas o colutorio. *Rev Medi UV.* 2012;2:6–12.

ANEXOS

Anexo I. Resultados de determinaciones de solubilidad de CHX en diferentes medios y diámetro promedio de NFs obtenidas a partir de diferentes soluciones poliméricas a diferente concentración de polímero y cantidad de principio activo.

Tabla 1. Solubilidad de CHX en diferentes medios de disolución.

Medio empleado	Solubilidad \pm SD (mg/ml)
SBF pH 7	0.0519 \pm 0.0081
SBF pH 7 Tween 20 1%	0.0819 \pm 0.0022
SBF pH 7 Tween 20 2.5%	0.1357 \pm 0.0006
SBF pH 7 Brij [®] 58 2.5%	2.3729 \pm 0.3568

Tabla 2. Diámetro promedio de NFs, sistemas que emplean como disolvente Acetona:Etanol (1:1)(v/v).

Solución polimérica Acetona:Etanol	Diámetro promedio \pm SD (nm)	
	Velocidad 10 μ l/min	Velocidad 20 μ l/min
9 %	237.87 \pm 64.58	369.32 \pm 100.45
10 %	413.52 \pm 120.26	
11 %	1067.21 \pm 324.46	
12 %	955.18 \pm 188.28	

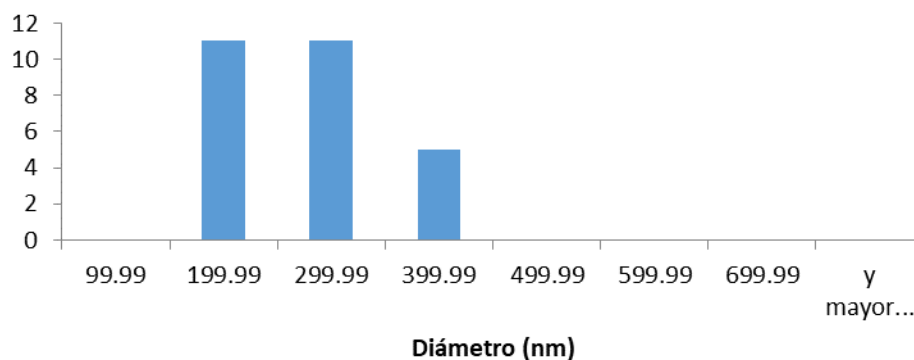


Figura 1. Distribución del diámetro promedio de NFs para el sistema Acetona:Etanol (1:1)(v/v) al 9 %.

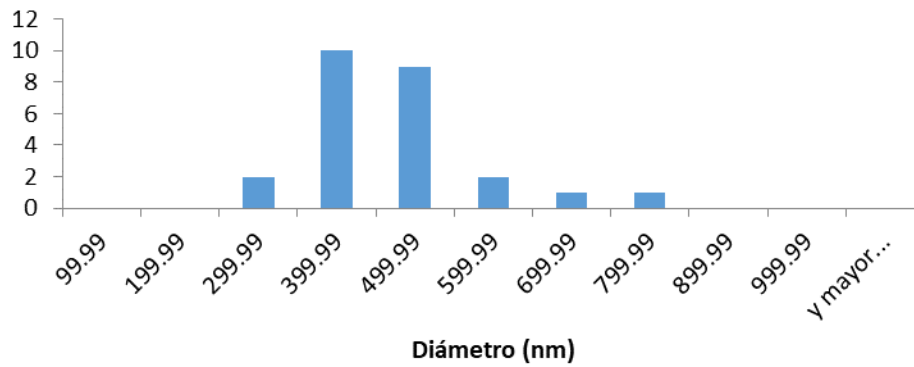


Figura 2. Distribución del diámetro promedio de NFs para el sistema Acetona:Etanol (1:1)(v/v) al 10 %.

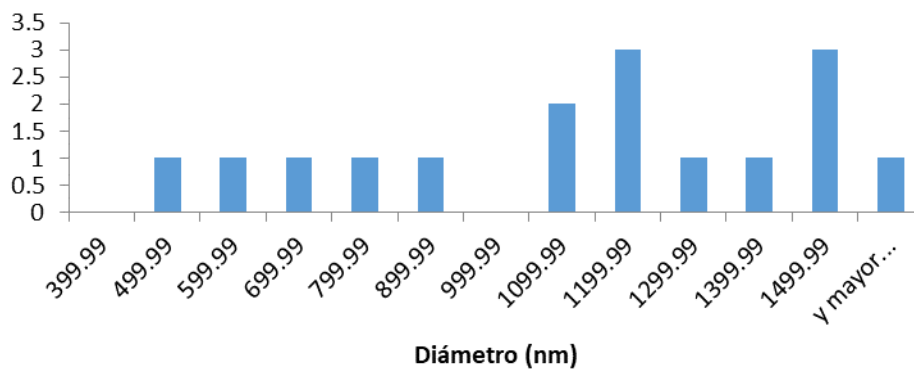


Figura 3. Distribución del diámetro promedio de NFs para el sistema Acetona:Etanol (1:1)(v/v) al 11 %.

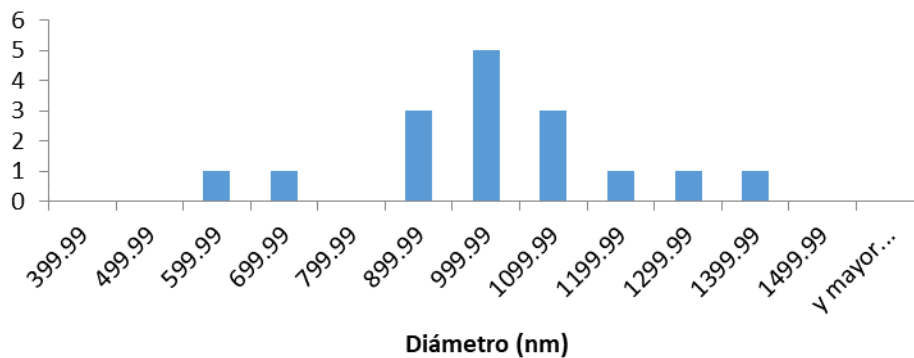


Figura 4. Distribución del diámetro promedio de NFs para el sistema Acetona:Etanol (1:1)(v/v) al 12 %.

Tabla 3. Diámetro promedio de NFs, sistemas que emplean como disolvente Acetona:Metanol (1:1)(v/v).

Solución polimérica Acetona:Metanol	Diámetro promedio \pm SD	
	Velocidad 10 μ /min	Velocidad 20 μ /min
9 %	200.14 \pm 60.04	226.39 \pm 54.95
10 %	249.01 \pm 64.56	
11 %	466.14 \pm 181.06	
12 %	443.95 \pm 136.56	

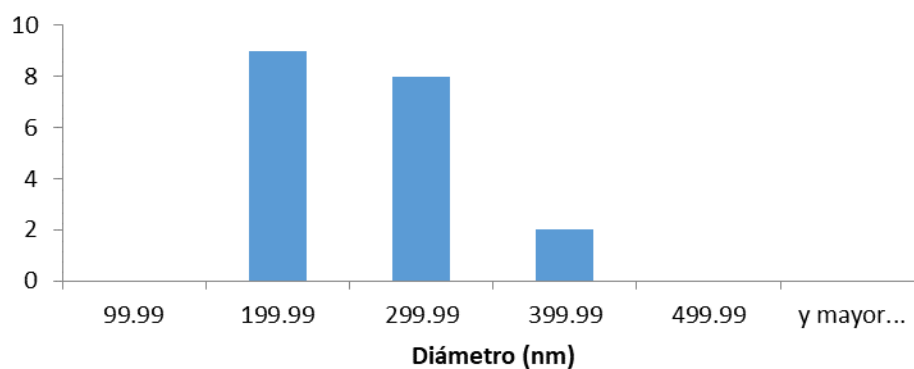


Figura 5. Distribución del diámetro promedio de NFs para el sistema Acetona:Metanol (1:1)(v/v) al 9 %.

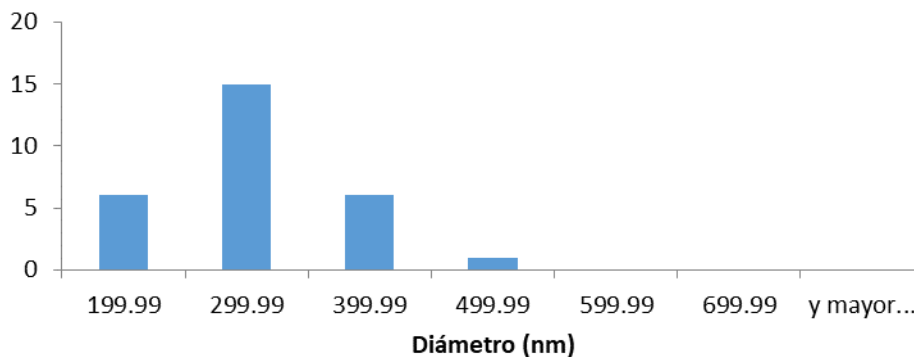


Figura 6. Distribución del diámetro promedio de NFs para el sistema Acetona:Metanol (1:1)(v/v) al 10 %.

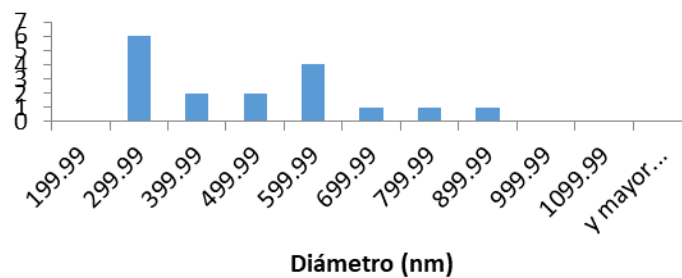


Figura 7. Distribución del diámetro promedio de NFs para el sistema Acetona:Metanol (1:1)(v/v) al 11 %.

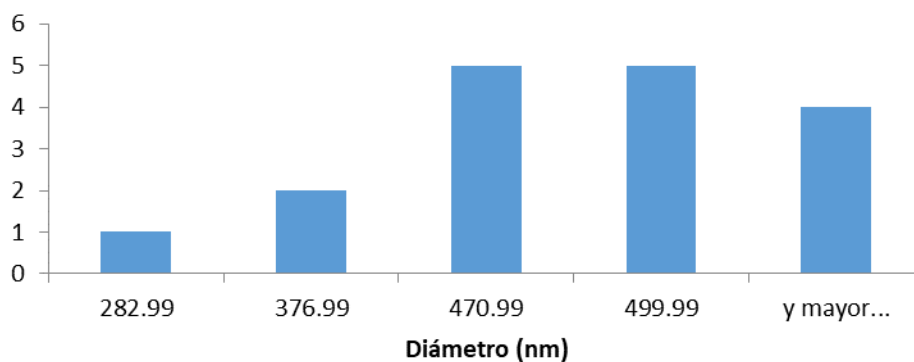


Figura 8. Distribución del diámetro promedio de NFs para el sistema Acetona:Metanol (1:1)(v/v) al 12 %.

Sistemas cargados con CHX

Tabla 4. Diámetro promedio de NFs, sistemas que emplean como disolvente Acetona:Etanol (1:1)(v/v).

Solución polimérica Acetona:Etanol	Diámetro promedio \pm SD (nm)	
	10 mg CHX	25 mg CHX
11 %	934.39 \pm 188.67	1049.52 \pm 349.39
12%	1050.31 \pm 201.28	990.56 \pm 98.94

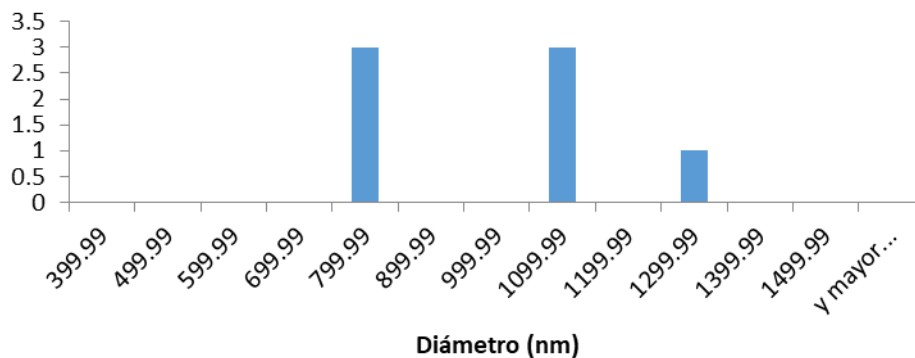


Figura 9. Distribución del diámetro promedio de NFs para sistemas que emplean como disolvente Acetona:Etanol (1:1)(v/v) al 11% y 10 mg de CHX.

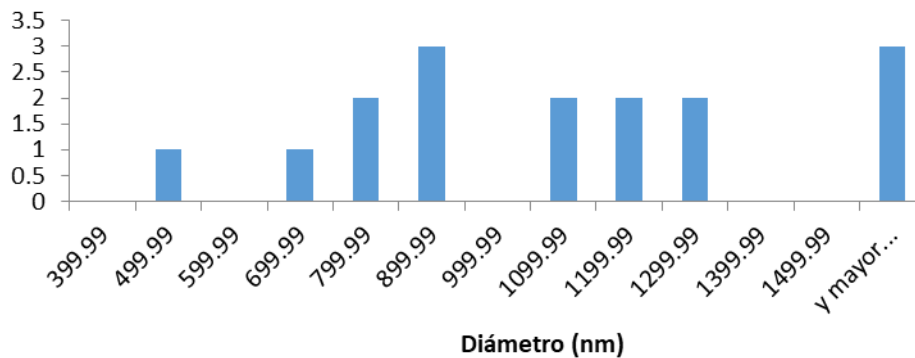


Figura 10. Distribución del diámetro promedio de NFs para sistemas que emplean como disolvente Acetona:Etanol (1:1)(v/v) al 11% y 25 mg de CHX.

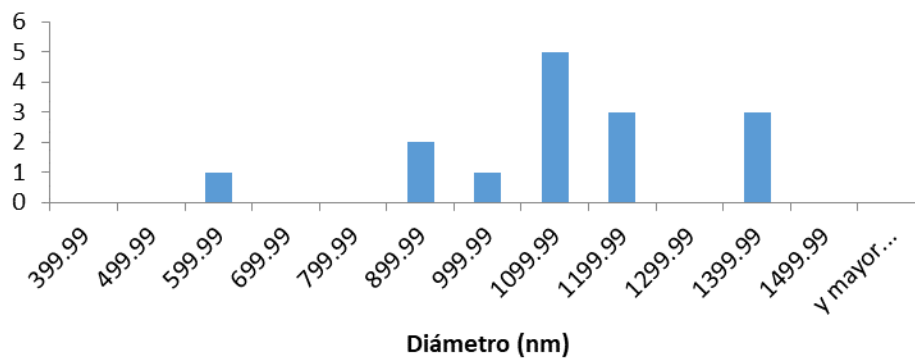


Figura 11. Distribución del diámetro promedio de NFs para sistemas que emplean como disolvente Acetona:Etanol (1:1)(v/v) al 12% y 10 mg de CHX.

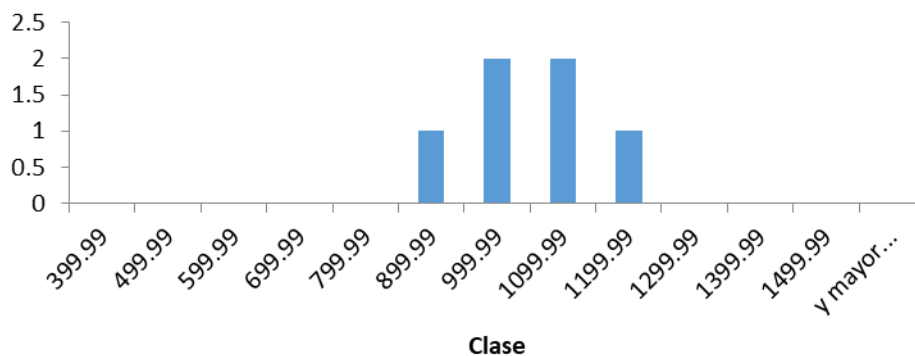


Figura 12. Distribución del diámetro promedio de NFs para sistemas que emplean como disolvente Acetona:Etanol (1:1)(v/v) al 12% y 25 mg de CHX.

Tabla 5. Diámetro promedio de NFs, sistemas que emplean como disolvente Acetona:Metanol (1:1)(v/v).

Solución polimérica Acetona:Metanol	Diámetro promedio \pm SD (nm)	
	10 mg CHX	25 mg CHX
11 %	257.86 \pm 153.57	306.60 \pm 73.07
12%	324.29 \pm 84.15	377.35 \pm 84.37

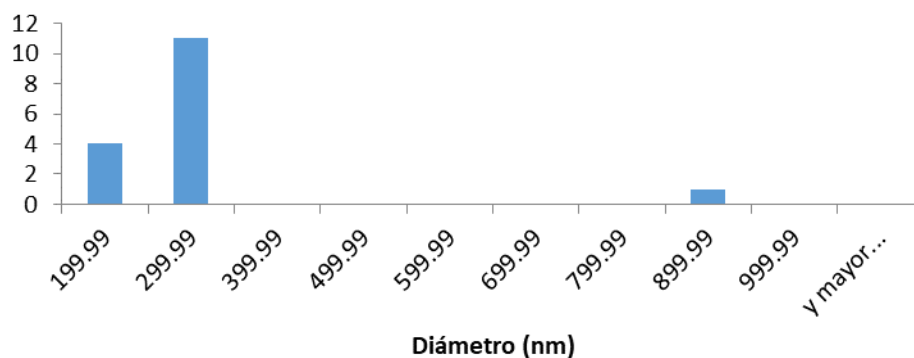


Figura 13. Distribución del diámetro promedio de NFs para sistemas que emplean como disolvente Acetona:Metanol (1:1)(v/v) al 11% y 10 mg de CHX.

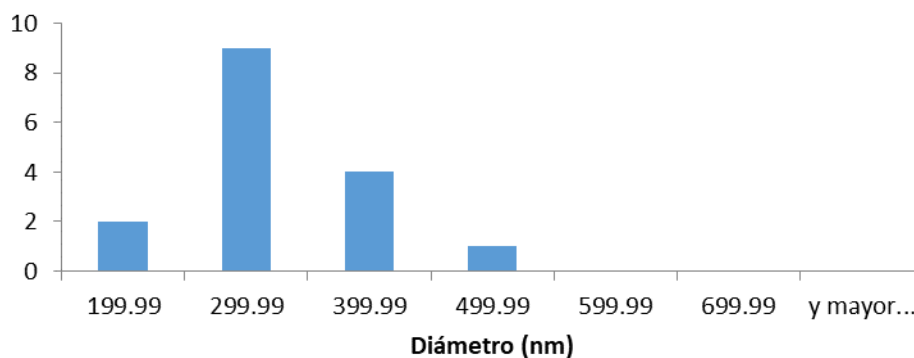


Figura 14. Distribución del diámetro promedio de NFs para sistemas que emplean como disolvente Acetona:Metanol (1:1)(v/v) al 11% y 25 mg de CHX.

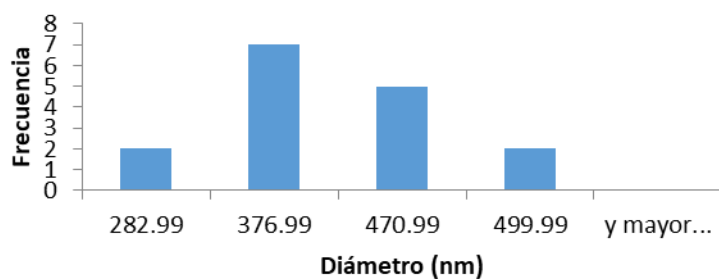


Figura 15. Distribución del diámetro promedio de NFs para sistemas que emplean como disolvente Acetona:Metanol (1:1)(v/v) al 12% y 10 mg de CHX.

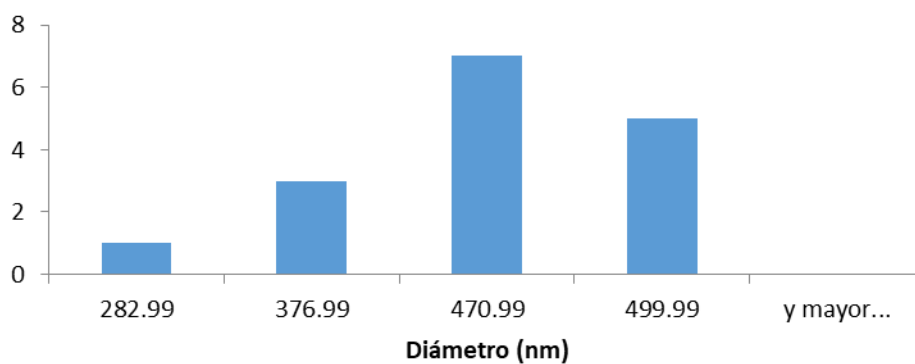


Figura 16. Distribución del diámetro promedio de NFs para sistemas que emplean como disolvente Acetona:Metanol (1:1)(v/v) al 12% y 25 mg de CHX.

Anexo 2. Influencia de la concentración de polímero y tipo de disolvente sobre las propiedades de la solución polimérica.

ANOVA para conductividad de soluciones poliméricas empleadas en la formación de NFs.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
MAIN EFFECTS					
A:concentración de polímero	1470.43	7	210.062	14.17	0.0000
B:disolvente	5113.08	2	2556.54	172.41	0.0000
RESIDUAL	919.361	62	14.8284		
TOTAL (CORRECTED)	7502.87	71			

El Valor- P nos indica que si existe diferencia estadísticamente significativa en la conductividad de la solución polimérica cuando cambia la concentración y el tipo de disolvente, con un nivel de confianza del 95.0%.

ANOVA para tensión superficial de soluciones poliméricas empleadas en la formación de NFs.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón- F</i>	<i>Valor-P</i>
MAIN EFFECTS					
A:concentración de polímero	14.4133	7	2.05905	66.00	0.0000
B:disolvente	11.1836	2	5.59181	179.25	0.0000
RESIDUAL	1.93417	62	0.0311962		
TOTAL (CORRECTED)	27.5311	71			

El Valor- P nos indica que si existe diferencia estadísticamente significativa en la tensión superficial de la solución polimérica cuando cambia la concentración y el tipo de disolvente, con un nivel de confianza del 95.0%.

ANOVA para Viscosidad de soluciones poliméricas empleadas en la formación de NFs.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón- F</i>	<i>Valor-P</i>
MAIN EFFECTS					
A:concentración de polímero	92568.7	7	13224.1	32.79	0.0000
B:disolvente	14320.8	2	7160.42	17.75	0.0000
RESIDUAL	25006.9	62	403.337		
TOTAL (CORRECTED)	131896.	71			

El Valor- P nos indica que si existe diferencia estadísticamente significativa en la viscosidad de la solución polimérica cuando cambia la concentración y el tipo de disolvente, con un nivel de confianza del 95.0%.

Análisis estadístico ANOVA, para el diámetro de NFs obtenidas a partir de soluciones poliméricas Acetona:Etanol (1:1)(v/v) y Acetona: Metanol (1:1)(v/v), diferente concentración de polímero y cantidad de principio activo.

ANOVA para tamaño de NFs obtenidas a partir de soluciones poliméricas Acetona:Etanol (1:1)(v/v).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A: Concentración de polímero	575.04	1	574.04	0.08	0.8208
B: Cantidad de P.A	537.776	1	537.776	0.08	0.8264
Total error	6879.04	1	6879.04		
Total (corr.)	7991.86	3			

El Valor-P nos indica que no existe diferencia estadísticamente significativa en el tamaño de las NFs cuando varía la concentración de polímero y la cantidad de CHX en soluciones poliméricas que emplean como disolvente Acetona:Etanol (1:1)(v/v), con un nivel de confianza del 95%.

ANOVA para tamaño de NFs obtenidas a partir de soluciones poliméricas Acetona:Metanol (1:1)(v/v).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A: Concentración de polímero	4704.59	1	4704.59	1008.36	0.0200
B: Cantidad de P.A	2590.81	1	2590.81	555.30	0.0270
Total error	4.6656	1	4.6656		
Total (corr.)	7300.06	3			

El Valor-P nos indica que si existe diferencia estadísticamente significativa en el tamaño de las NFs cuando varía la concentración de polímero y la cantidad de CHX en soluciones poliméricas que emplean como disolvente Acetona:Metanol (1:1)(v/v), con un nivel de confianza del 95%.

Anexo 3. Análisis estadístico ANOVA, para el tamaño de partícula, potencial Z, Eficiencia de entrampamiento, Eficiencia de proceso con respecto a la cantidad de principio activo en NCs.

ANOVA para tamaño de partícula de NCs con diferente cantidad de CHX.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1965.78	2	982.889	0.83	0.4797
Intra grupos	7085.9	6	1180.98		
Total (corr.)	9051.68	8			

El Valor- P nos indica que no existe diferencia estadísticamente significativa para el tamaño de partícula con respecto a la cantidad de principio activo con un nivel de confianza del 95.0%.

ANOVA para potencial Z de NCs con diferente cantidad de CHX

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	116.487	2	58.2435	7.20	0.0254
Intra grupos	48.5364	6	8.0894		
Total (corr.)	165.023	8			

El Valor- P nos indica que si existe diferencia estadísticamente significativa para el potencial Z con respecto a la cantidad de principio activo con un nivel de confianza del 95.0%.

ANOVA para eficiencia de entrampamiento de NCs con diferente cantidad de CHX.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	33.845	2	16.9225	1.90	0.2296
Intra grupos	53.4659	6	8.91098		
Total (corr.)	87.3108	8			

El Valor- P nos indica que no existe diferencia estadísticamente significativa para la eficiencia de entrampamiento con respecto a la cantidad de principio activo con un nivel de confianza del 95.0%.

ANOVA para eficiencia de proceso de NCs con diferente cantidad de CHX.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	386.719	2	193.359	167.37	0.0000
Intra grupos	6.9316	6	1.15527		
Total (corr.)	393.65	8			

El Valor- P nos indica que si existe diferencia estadísticamente significativa para la eficiencia de proceso con respecto a la cantidad de principio activo con un nivel de confianza del 95.0%.

Anexo IV . Publicaciones

Gustavo Vidal-Romero, María L. Zambrano-Zaragoza, Lizbeth Martínez-Acevedo, Gerardo Leyva-Gómez, Susana E. Mendoza-Elvira, David Quintanar-Guerrero. **“Design and Evaluation of pH-Dependent Nanosystems Based on Cellulose Acetate Phthalate, Nanoparticles Loaded with Chlorhexidine for Periodontal Treatment”**. *Pharmaceutics*. 2019; 11(11):604.





En proceso de publicación:

Solicitud de Patente ante el CID (Coordinación de Innovación y Desarrollo), UNAM de proyecto titulado **“Hilos dentales para el tratamiento de la gingivitis y la periodontitis: Métodos de elaboración e incorporación de sistemas nanoparticulados”**. Agosto 2017.

Vidal-Romero G., Quintanar-Guerrero D. **“Development and characterization of pH-dependent nanofibers of cellulose acetate phthalate by electrospinning technique, areas of dental application”**.

Article

Design and Evaluation of pH-Dependent Nanosystems Based on Cellulose Acetate Phthalate, Nanoparticles Loaded with Chlorhexidine for Periodontal Treatment

Gustavo Vidal-Romero ¹, María L. Zambrano-Zaragoza ², Lizbeth Martínez-Acevedo ¹, Gerardo Leyva-Gómez ³, Susana E. Mendoza-Elvira ⁴ and David Quintanar-Guerrero ^{1,*}

- ¹ Laboratorio de Posgrado en Tecnología Farmacéutica, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México C.P. 54745, Mexico; g.vidal23@hotmail.com (G.V.-R.); liz_martinez@comunidad.unam.mx (L.M.-A.)
 - ² Laboratorio de Procesos de Transformación y Tecnologías Emergentes de Alimentos, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de Mexico CP 54714, Mexico; luz.zambrano@unam.mx
 - ³ Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico; gerardoleyva@hotmail.com
 - ⁴ Laboratorio de Virología, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México C.P. 54745, Mexico; seme@unam.mx
- * Correspondence: quintana@unam.mx; Tel.: +52-55-29224153

Received: 18 September 2019; Accepted: 6 November 2019; Published: 13 November 2019



Abstract: This work aimed to develop and evaluate pH-dependent systems based on nanospheres (NSphs) and nanocapsules (NCs) loaded with chlorhexidine (CHX) base as a novel formulation for the treatment of periodontal disease. Cellulose acetate phthalate (CAP) was employed as a pH-dependent polymeric material. The NSphs and NCs were prepared using the emulsion-diffusion technique and then characterized according to encapsulation efficiency (EE), size, zeta-potential, morphology, thermal properties, release profiles and a preliminary clinical panel test. The formulations showed 77% and 61% EE and 57% and 84% process efficiency (PE), respectively. Both systems were spherical with an average size of 250–300 nm. Differential scanning calorimetry (DSC) studies showed that the drug has the potential to be dispersed molecularly in the NSph matrix or dissolved in the oily center of the NCs. The CHX release test revealed that the release of NSphs-CHX follows Fickian diffusion involving diffusion-erosion processes. The NCs showed a slower release than the NSphs, following non-Fickian diffusion, which is indicative of anomalous transport. These nanosystems may, therefore, be employed as novel formulations for treating periodontal disease, due to (1) their coverage of a large surface area, (2) the controlled release of active substances at different pH, and (3) potential gingival tissue infiltration.

Keywords: nanocapsules; nanospheres; periodontitis; eugenol; buccal drug delivery; chlorhexidine base; cellulose acetate phthalate; pH-dependent polymeric

1. Introduction

Periodontal disease (PD) is one of the most important oral afflictions and is one that contributes to the global burden of chronic disease. Because PD is highly prevalent worldwide it represents a major public health problem in numerous countries. Like severe dental caries, PD is a major cause of tooth loss, which directly affects people's quality of life by lowering their functional capacity and self-esteem and deteriorating social relationships [1]. Clinically speaking, PD is defined as an inflammatory

condition of the gingiva and supporting tooth structures. Gingivitis and periodontitis are the most common forms [2].

The most common commercial products used to treat PD are oral rinses. However, not even extensive oral rinsing with antibacterial solutions reaches deep into subgingival tissues, while the high dosages of antibiotics required to achieve therapeutic levels in the periodontal pocket can result in unpleasant or even toxic adverse effects [3,4].

Various drug delivery systems for periodontal applications have been developed, including acrylic strips, fibres, films, injectable system gels, intra-pocket strips, vesicular systems, and microparticle and nanoparticle systems [5–8].

The drug candidate chosen for this study was chlorhexidine (CHX) base, which is widely used in clinical dental practice as an antiseptic oral rinse due to its activity against a wide range of microbial species. The CHX base (1,1'-hexamethylene-bis-5-(4-chlorophenyl) biguanide) is a symmetric molecule with two ionisable guanidine moieties in the form of a solid white crystal (m.p. 132 °C, M_w 505.5). The water solubility of the CHX base at 20 °C is 0.008% (*w/v*). The chemical structure of the CHX base is depicted in Figure 1. Its pKa values are 2.2 and 10.3, which render it dicationic over the entire range of physiological pH values [9–11]. This base is an antimicrobial agent often used in dentistry as an antiplaque agent but it has also demonstrated good activity against a wide range of oral bacteria. The CHX base is a drug of choice for treating periodontal disease because it prevents the development of an oral environment conducive to periodontal diseases [12,13].

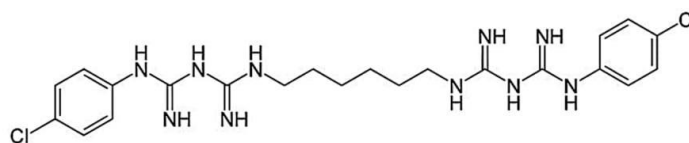


Figure 1. Chemical structure of the chlorhexidine (CHX) base.

Currently, 0.2% CHX aqueous solutions have been shown to be moderately effective in treating PD. Thus, there is growing interest in developing novel delivery systems that maintain the concentration of CHX for long periods to help reduce the incidence of these diseases [14]. Several nanocarriers or nanomaterials, such as liposomes, lipid, metal and polymeric nanoparticles, nanocrystals, dendrimers, and nanofibers, have been proposed as treatment options for PD [15]. They all use nanocarriers (e.g., organic nanoparticles) as drug delivery devices and have often been recommended as a means of meeting the specific requirements of the oral mucosa and enhancing conventional therapies by avoiding dilution effects while increasing the infiltration and adherence of the nanoformulations [11,16].

Cellulose derivatives (cellulose ethers and esters) have played a strong supporting role during the development of sustained, controlled-release oral dosages as (1) coatings capable of responding to changes in the physiological environment, (2) semi-permeable membranes, and (3) hydrophobic matrices that lower the dissolution rate of the active drug embedded in the matrix. Cellulose acetate phthalate (CAP) was one of the earliest and most effective polymers used for pH-controlled release. Its use continues today [17,18] because it resists prolonged contact with strongly acidic gastric fluid but dissolves in a mildly acidic or neutral intestinal environment [19]. This polymer does not form a gel in the presence of water but forms pH-sensitive and semi-permeable microporous systems. These properties make CAP a suitable excipient for developing new drug delivery systems that are now recognized as promising strategies for prolonging residence time and improving the specific localization of systems. Hence, they can reduce dosage frequency in controlled release formulations [20].

An alternative antibacterial approach involves antibiotic synergists. In antimicrobial therapy, synergism is used to describe the supra-additive activity of antibiotics when used in combination with other compounds. Eugenol (4-allyl-2-methoxyphenol) was selected as the model substance to form the oily core of the nanocapsule (NC) formulations prepared by the emulsification-diffusion

method in order to potentiate the drug's antimicrobial action and realize the synergistic, analgesic, and anti-inflammatory effect of the eugenol. This substance is the principle chemical component of clove oil derived from *E. aromatic* and has long been known for its analgesic, local anaesthetic, anti-inflammatory, and antibacterial effects [21–26]. Used in the form of a paste or mixture as a dental cement, filler, and restorative material, it belongs to the class of essential oils that are Generally Recognized as Safe (GRAS) by the U.S. Food and Drug Administration (FDA). Eugenol acts primarily by disrupting the cytoplasmic membrane [27,28] but its biological effects vary greatly depending on concentration. Eugenol may have a beneficial effect at concentrations ranging from 10^{-8} M to 10^{-5} M (prostaglandin synthesis, nerve activity, and white blood cell chemotaxis inhibition) but can be cytotoxic at concentrations $>10^{-3}$ M (cell death, cell growth, and respiratory inhibition) [29]. Today, the development of innovative drug delivery systems focuses on designing multiple options, blocking the adverse effects of drugs, and reducing dosage intervals.

Oral fluid can be considered the protective medium for all tissues of the oral cavity. It acts as a buffer by maintaining a pH between 5.75 and 7.05. This fluid is composed mainly of water (99.5%), organic compounds (0.3%), and inorganic and trace elements (0.2%) [30]. By contrast, the periodontal microenvironment is more anaerobic and perfused by a plasma filtrate called gingival crevice fluid. The growth of microorganisms in this microenvironment has been shown to cause periodontal disease. Because the site of bacterial infection is usually inaccessible to agents present in the oral cavity, antimicrobial agents administered there tend to be ineffective. Therefore, a local antibiotic agent loaded in an intra-pocket delivery system promotes a high drug concentration in the gingival crevice fluid that reduces adverse effects and provides such advantages as improving drug efficacy and patient compliance [31].

Nanometer-sized systems have the potential to infiltrate easily into the periodontal pocket and remain in the damaged tissue where they release the drug in a controlled manner [32]. PDs usually involve diverse, complex mechanisms that require various molecules to achieve effective treatments. Because the bacteria that cause periodontal tissue inflammation and destruction are present in every stage of PD, treatment requires antimicrobials, antioxidants, antiresorptives, and anti-inflammatory drugs. At present, some commercial products for treating PD include mouthwashes that are applied daily, systemic antibiotics, and systems for the local delivery of bioactive agents [33].

The aim of the present study was to develop two nanoparticle systems—nanospheres and nanocapsules—loaded with CHX base as novel formulations to improve treatment of PD by (1) enabling the maintenance of therapeutic drug levels over long periods, (2) preventing relapses, (3) decreasing the amount of drug needed to achieve the therapeutic effect, and (4) reducing treatment time. These factors should also result in greater patient acceptance.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Cellulose acetate phthalate (MW 2534.1) was purchased from Vita Drug, Mexico. Eugenol oil ($\geq 98\%$) was supplied by Dentalflux, Mexico. Poly(vinyl alcohol, PVA: Mowiol 4-88, molecular weight $\sim 31,000$) and chlorhexidine base were obtained from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). HPLC-grade methyl ethyl ketone, methanol, ethanol, and acetonitrile were purchased from Productos Quimicos Monterrey, S.A. de C.V. (Nuevo León, Mexico). Distilled water was obtained from a RiOs™ distiller (EMD, Millipore®, Billerica, MA, USA). All other reagents were of at least analytical grade and used without further purification.

2.2. Preparation of Nanospheres and Nanocapsules by the Emulsification Diffusion Technique

The CAP nanospheres and nanocapsules loaded or unloaded with CHX (CHX-CAP-NSphs/CHX-CAP-NCs) were prepared using an emulsification-diffusion technique adapted from one described previously [11,34]. Briefly, the organic solvent (methyl ethyl ketone) and water were mutually saturated

for at least 20 min before use to ensure the initial mass equilibrium of both liquids. For the NC formulations, 200 mg of the pH-dependent polymer (CAP), 365 mg of eugenol oil, and the amount of CHX indicated for each formulation were dissolved in 20 mL of water-saturated organic solvent. This organic solution was emulsified with 40 mL of organic solvent-saturated aqueous solution at 5% (*w/v*) of PVA using a stirrer (Caframo RZR-1, Staufen, Germany) at 1,700 rpm for 10 min. The resulting mixed phase immediately turned milky with a bluish opalescence (i.e., the Tyndall effect) due to the instantaneous formation of nanocapsules, according to the formulation (Table 1). The excess of organic solvent was eliminated from the raw nanocapsule suspensions by vacuum steam distillation at 30 °C and 30 rpm using a Laborata 4000 efficient (Heidolph® Instruments GMBH & Co., Schwabach, Germany). Next, the nanocapsules were isolated by centrifugation (Optima® LE-80, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) at 12,000 rpm and 15 °C for 40 min, followed by three washes with distilled water under the same conditions to remove the excess PVA adsorbed on the nanosystems' surface. Finally, the systems were resuspended in a minimal volume of distilled water. This optimized procedure and formulation were also used to obtain the nanospheres (NSphs), though this operation does not require including eugenol in the formulation.

Table 1. Proposed formulations for preparing chlorhexidine cellulose acetate phthalate nanocapsules (CHX-CAP-NCs) and CHX CAP nanospheres (CHX-CAP-NSphs). Legend: PVA, polyvinyl alcohol.

Material	NCs			NSphs
	Formulation A	Formulation B	Formulation C	Formulation
Polymer (CAP) (mg)	200	200	200	200
Oil (eugenol) (mg)	365	365	365	– *
Drug (CHX) (mg)	10	20	30	10
External phase solvent (PVA 5%) (mL)	40	40	40	40
Inners phase solvent (MEC **) (mL)	20	20	20	20

* For this formulation eugenol oil is not necessary. ** MEC (Methyl Ethyl Ketone).

2.3. Physicochemical Characterization of the Cellulose Acetate Phthalate (CAP)-Nanospheres (NSphs)/CAP-Nanocapsules (NCs)

2.3.1. Particle Size Measurement and Surface Charge

The particle size of each prepared sample was analysed with a Dynamic Light-Scattering System (Zetasizer® Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). Samples of the nanosystems were suspended, diluted appropriately with Milli-Q® quality ultrapure water (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) to achieve the appropriate particle concentration for measurement ($n = 3$). Analysis was performed at a scattering angle of 90° for 180 s at 25 °C. Z-potential was also determined with the aforementioned Zetasizer® Nano ZS but by utilising a capillary bending cell with 150 V of electric current and after diluting the samples with deionized water. Measurements were made in triplicate at 25 °C.

2.3.2. Scanning Electron Microscopy

SEM was used to examine the surface morphology of the CAP NSphs and NCs loaded with CHX (CHX-CAP-NSphs/CHX-CAP-NCs). A droplet of each sample was spread on a glass surface, left to dry, and then mounted on stubs and shadowed in a cathodic evaporator with a gold layer (~20 nm) using a JFG-1100 Sputter Coater (JEOL, Tokyo, Japan). The samples were observed under a scanning electron microscope (LV-SEM JSM-5600, JEOL, Tokyo, Japan) at 15–25 kV electron acceleration voltage and a pressure of 12–20 Pa in the specimen chamber. To evaluate the potential infiltration of the nanoparticles into the gingival pocket, unwaxed nylon-dental floss (Superfloss™ Oral-B® Belmont, CA, USA) was immersed in a 5% (*w/v*) suspension of CHX-CAP-NSphs/CHX-CAP-NCs, dried at room temperature, and characterized by SEM.

2.3.3. Stabilizer Quantification

The residual amount of PVA on the nanoparticles was determined in triplicate by a colorimetric method. Considering that PVA in solution forms stable complexes with iodine in the presence of boric acid, the method employed was as follows: approximately 5–10 mg of the nanosystems (CHX-CAP-NSphs/CHX-CAP-NCs) were digested in 5 mL of methyl ethyl ketone for 48 h. The solvent was then evaporated, the suspension was filtered in a 0.22 μm Millipore[®] mesh, and the volume was adjusted to 10 mL with water (Solution A). Next, 2 mL of a 0.65-M boric acid solution and 1 mL of an iodine solution (0.05 M iodine and 0.15 M potassium iodine in water) were added to 5 mL of Solution A. The absorbance of the resulting samples was measured at 640 nm in a Varian Cary[®] 50 UV-vis spectrophotometer (Walnut Creek, CA, USA) using as the target a solution of 5 mL of water with 2 mL of boric acid solution (0.65 M) and 1 mL of iodine solution (0.05 M iodine and 0.15 M potassium iodine) [35]. The calibration curve for PVA quantification was linear over the 5–50 $\mu\text{g/mL}$ range ($r^2 = 0.9999$).

2.3.4. Determination of Encapsulation Efficiency and Chlorhexidine Loading Capacity

The entrapment efficiency (EE) refers to the amount of drug that can be entrapped or encapsulated with respect to the initial amount of drug in the formulation (Equation (1)). The loading capacity refers to the amount of drug that is contained in the nanosystems with respect to the total amount of nanosystems obtained (Equation (2)). Process efficiency (PE) refers to the amount of nanosystems (NCs or NSphs) that can be obtained with respect to the initial amount of materials present in the formulation (Equation (3)). Equations (1)–(3) were used to evaluate the EE, drug-loading capacity, and PE.

$$\text{Entrapment or encapsulation efficiency} = \frac{\text{Amount of drug loaded}}{\text{Initial amount of drug}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Loading capacity} = \frac{\text{Amount of drug in nanosystems}}{\text{Total amount of nanosystems obtained}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Process efficiency} = \frac{\text{Total amount of nanosystems obtained}}{\text{Initial amount of materials in formulation}} \times 100 \quad (3)$$

The NCs were prepared with different amounts of the active ingredient (10, 20, and 30 mg) but the same amount of eugenol oil: 365 mg (Table 1). The CHX content in the CHX-CAP-NCs was then determined. Briefly, 10 mg of CHX-CAP-NC powder was dissolved in 5 mL of methyl ethyl ketone and 4 mL of NaOH [0.1M] was added to achieve the total dissolution of the CAP and release the encapsulated CHX. The organic and aqueous phases were separated and dried at room temperature and the solid residue was re-suspended in 10 mL of methanol. A sample of this solution was filtered in a 0.22- μm Millipore[®] mesh and analysed by HPLC to determine the amount of encapsulated drug. The same procedure was employed for the CHX-CAP-NSphs according to the best formulation.

2.3.5. Quantitative Determination of the Chlorhexidine Base

The CHX base was quantified by reversed phase adsorption chromatography using a LiChropher[®] 100 RP-18, 5 μm (125 mm \times 4 mm) HPLC cartridge (Merck, Darmstadt, Germany) on a Varian ProStar HPLC system (Chromatography Systems, San, CA, USA). This device was equipped with a pump (model PS 210), autosampler (model PS 400), and multi-wavelength UV-visible detector (model PS 320) connected to a PC interface. Elution was carried out under isocratic conditions using a mixture of acetonitrile and 30 mM of sodium acetate buffer as the mobile phase (35:65) adjusted to pH 3.3 with acetic acid (96%) at 0.5% of triethylamine. The sample volume injected was 20 μL . Detection was performed at 260 nm and a flow rate of 1 mL/min. The linear calibration curve for CHX was established in a range of 10–80 $\mu\text{g/mL}$. The retention time for the CHX was approximately 3.5 min.

Chromatograms were analysed with a Galaxy Software package following a method adapted from H. Lboutounne et al. [11].

2.3.6. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

DSC was used to characterize the thermal properties of the components in the optimized formulations, i.e., unloaded CAP-NCs and CHX-CAP-NCs. The samples were weighed (3–5 mg) directly in hermetic aluminium pans and scanned in a temperature range of 0–400 °C at a heating rate of 10 °C/min under a nitrogen flux of 50 mL/min utilizing a previously calibrated and adjusted calorimeter (DSC Q10, TA Instruments, New Castle, DE, USA).

2.4. *In Vitro* Drug Release Study

The method used was adapted from the one described by Silvana Gjoseva et al. [36]. Briefly, drug release studies were performed under sink conditions using an amount equivalent to 1 mg of CHX for each dry nanosystem (NSph or NCs). This was suspended in 20 mL of phosphate buffer solution at pH 7 and 2.5% Brij®58 (SBF pH 7) and then placed in closed thermostatic test tubes at 37 °C using an agitated water bath at 50 rpm. The dissolution conditions simulated the pH and ionic strength of saliva/gingival fluid (pH 7 and 75 mmol/L, respectively). At various predetermined time intervals (NSphs, 0–20 min; NCs, 0–100 min), a 2 mL aliquot of the release medium was removed and replaced with fresh SBF at pH 7. The amount of CHX released was determined using the HPLC method described above. The data obtained were fitted using Higuchi and Korsmeyer-Peppas models to ascertain the transport mechanism, release type, and drug release kinetics.

2.5. Statistical Analyses

An analysis of variance (ANOVA) with between-means comparisons using a t-students test at a significance level of 0.05 was used to evaluate the influence of the amount of drug on particle size, Z-potential, encapsulation efficiency, and process efficiency. Another analysis of variance was performed using STATGRAPHICS® Centurion XVI software 16th (Statpoint Technologies, INC).

2.6. Panel Test

Healthy volunteers with periodontal disease were diagnosed and invited to participate in the study. Research was conducted following the principles on experimentation involving human subjects outlined in the Helsinki Declaration. This project was registered with the Postgraduate and Investigation Division of the Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM (approval number FESZ-RP/17-118-005) and accepted by Investigation, Ethics, and Biosafety Committees of health center TII Manuel Gutiérrez Zavala of Mexico City (ID MGZ-2017-085, 16 September 2017) A panel test ($n = 6$) was evaluated using CHX-CAP-NCs versus a group treated with an approach that included a mouthwash ($n = 6$). The procedure was explained to the participants prior to performance. After receiving their authorization in the form of a signed informed consent report in which they agreed to follow the treatment indications, an odontoxesis process was carried out that involved periodontal probing and removal of the supragingival calculus before the O'Leary index was applied to determine the presence of dentobacterial plaque (PDB). To evaluate the index, the patient received a revealing pill which dissolved in the mouth and stained surfaces containing PDB, as a result of which areas were visually pigmented and recorded on a registration form, where each tooth was divided into four sectors (mesial, vestibular, distal, and lingual faces). To determine the final score (average), the total number of faces with plaque was added and this number divided by the number of faces present in the mouth and multiplied by 100; this score can be compared [37–39]. This procedure was finalized with a prophylaxis treatment, after which a dispersion of CHX-CAP-NCs in amounts equivalent to 9 mg of CHX was applied every third day for 15 days in the form of soft acetate protectors placed on the patients' gums. System effectiveness was monitored by the control of microbial plaques using

the O'Leary index as an indicator of the reduction of microbial plaque and for comparison with the untreated group.

3. Results and Discussion

3.1. Physicochemical Characterization of the CAP-NSphs/CAP-NCs

Table 2 shows the particle size of the nanosystems. All batches had sizes below 500 nm. It is important to emphasize that the CAP nanocapsules functionalized with eugenol and CHX had sizes 60% and 79% greater than the control nanospheres, while the nanospheres loaded with CHX-CAP showed an increase of only 37% with respect to the controls. This indicates that 33–42% of the increase in particle size is attributable to the presence of eugenol oil, which was incorporated into the nanocapsule formation by the emulsification diffusion method due to its synergetic effect with CHX [40,41]. Piñon Segundo et al. (2005) found that nanoencapsulation of triclosan using CAP generated sizes of 192–235 nm, which increased with higher amounts of triclosan [32]. We hypothesize that the increase in particle size can also be attributed to the presence of eugenol oil in the nanocapsule entities and the molecule size of CHX. In addition, the presence of OH- groups allows the system to stabilize by forming bound hemiacetals [42]. In the NCs, the change in the CHX concentration from 10 to 20 mg increased particle size and slightly increased the polydispersity index at 30 mg. The differences between the NSphs and NCs may be attributable to the effect of the oil on the interfacial behaviour during the formation process (diffusion-stranding mechanism), since this increased the aggregation of the proto-nanoparticles due to a larger diffusion layer. When the amount of CHX in the formulation increased, the particle size also increased slightly, as did the polydispersity index, indicating that the amount of drug (10–30mg) did not have a significant effect on nanocapsule size (p value 0.4797).

Table 2. Results of the physicochemical characterization of the control, CHX-CAP-NC, and CHX-CAP-NSph batches.

Formulation	Amount of CHX (mg)	Size \pm SD (nm)	PI * \pm SD	Z-Potential \pm SD (mV)	Process Efficiency \pm SD (%)	Entrapment Efficiency \pm SD (%)
Control	–	180.6 \pm 0.70	–	–10.83 \pm 0.77	–	–
NCs	10	290.65 \pm 15.70	0.14 \pm 0.02	–20.16 \pm 2.64	84.30 \pm 0.74	61.93 \pm 4.28
	20	324.46 \pm 55.46	0.238 \pm 0.02	–18.77 \pm 3.46	72.00 \pm 1.66	64.49 \pm 0.80
	30	296.35 \pm 39.00	0.291 \pm 0.05	–18.71 \pm 5.21	69.25 \pm 0.43	59.88 \pm 2.77
NSphs	10	247.60 \pm 9.61	0.242 \pm 0.01	–20.35 \pm 1.91	57.17 \pm 1.23	77.36 \pm 0.62

* PI (Polydispersity Index).

The Z-potential measures the degree of repulsion between adjacent, similarly charged particles in a dispersion. In general, when this potential is relatively low, attraction exceeds repulsion and the dispersion will flocculate [43]. The –20 mV (Table 2) Z-potential of all our CHX-loaded batches suggests that the nanosystems are stable in dispersion due to their negatively charged surfaces. The residual amount of PVA was less than 5% in all batches. This amount suffices to give the nanocapsule dispersion good stability. It is well-known that this PVA concentration adsorbed on the surface of nanoparticles prevents aggregation by steric repulsion as it forms a stable, strongly-attached thick layer [31,34]. The CHX load, by contrast, has an electric charge that contributes to increasing the Z-potential by approximately 10 mV. This behaviour may indicate that the drug is entrapped inside the nanoparticles.

The spherical shape of the drug-loaded NCs and NSphs was confirmed by SEM (Figure 2a,b). SEM micrographs confirm the sub-micronic size and show that both nanosystems have smooth homogeneous surfaces with no evidence of CHX crystals.

To show the infiltration capability of these nanosystems, the NSphs and NCs were infiltrated in dental floss by immersion in a 5% (w/v) suspension of each nanosystem. After immersion for 24 h, the amount absorbed of nanosystems corresponded to 5.8 mg for NCs and 2.8 mg for NSphs. Figure 2c,d illustrate that both nanosystems were retained in the small spaces of the threads of the dental floss,

a finding indicative of their potential to infiltrate and be absorbed on surfaces. More specifically, the small size of these systems allowed them to infiltrate the periodontal pocket when applied in suspension, so flosses loaded with nanoparticles could be another means of administering CHX-CAP-NCs.

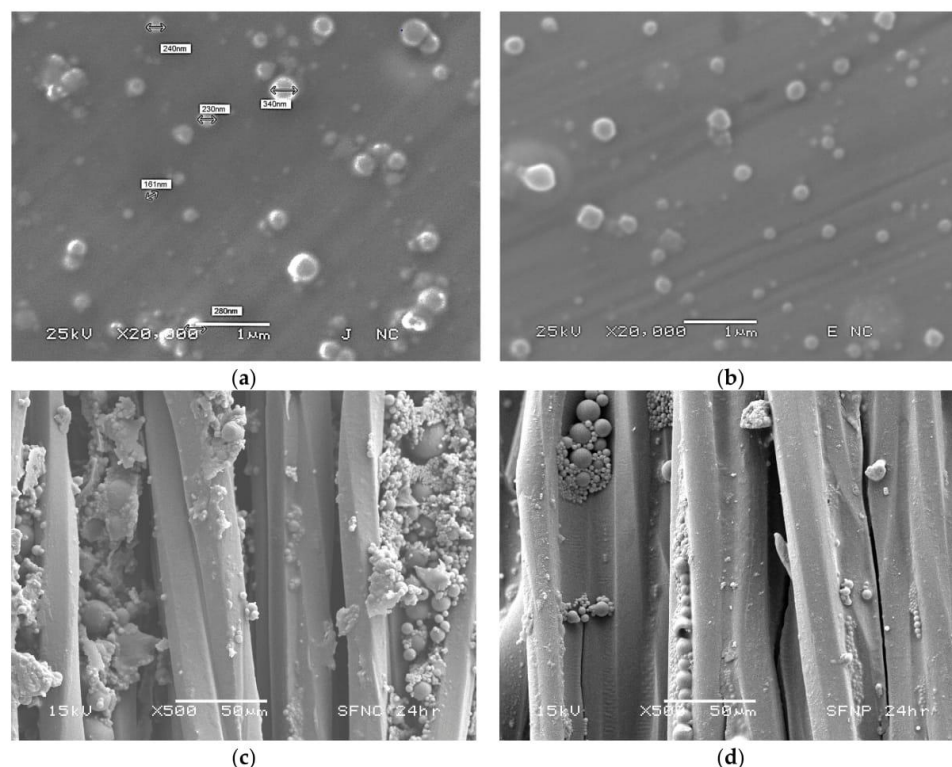


Figure 2. (a) Micrographs of CHX-CAP-NCs; (b) CHX-CAP-NSphs; and (c) CHX-CAP-NCs adsorbed on the surface of dental floss, and (d) CHX-CAP-NSphs adsorbed on the dental floss surface.

Table 2 shows that process efficiency varied with the amount of CHX in the range 69–84%. A high amount of the active ingredient decreased process efficiency because more CHX increased aggregation of the polymer chains. Also, it seems that CHX decreased stabilizer efficiency [44]. For all batches of NCs prepared with different amounts of drug, results show a statistically significant difference in process efficiency at a significance level of 95 (p value = 0.01). Possibly, the efficiency of process in batches of NCs loaded with 10 mg of CHX is greater than batches of NSphs with the same amount of CHX due to the presence of eugenol oil where the CHX was dissolved prior to addition in polymer solution, so the aggregation of the polymer chains is much smaller, giving greater efficiency in the process (84.30%). It has been proposed that the presence of eugenol promotes the formation of a defined interface of nanoil/medium (nanoemulsion) where the polymer coacervate forms a thin film around it. By contrast, NSph formation depends on the polymer aggregation and functionality of the stabilizer to prevent the protonanoparticles coalescence which is more influenced by the CHX presence (process efficiency 57.17%) [45]. The encapsulation efficiency of the CHX in the CAP-NCs was approximately 60%. This behavior can be explained because during its formation process it was not possible to encapsulate the total amount of oil present in the formulation, meaning that part of the drug dissolved in the non-encapsulated oil was lost. In these batches the loss of drug into the continuous phase is constant to the conditions of work. On the other hand, in the formation of NSphs it is possible to obtain high entrapment efficiencies (77%) because the drug is mixed directly with the polymer

matrix and only a small quantity of CHX is not entrapped into the polymer chains. Similar results have been reported by Lboutounne et al., who encapsulated a CHX base in polymeric nanocapsules with poly(ϵ -caprolactone) as the polymer and Labrafac hydrophile[®] WL 1219 as the oil [11].

It has been noted that it is difficult to achieve high encapsulation and process efficiency because the process involved requires several purification stages that could allow drug release and loss before nanocapsule formation. In this regard, and considering the volatility of eugenol, the final amount of this oil that remained in the CHX-CAP-NCs post-processing was determined by the HPLC method described above, which found a loss of approximately 90% with respect to the initial amount. Ying Shao et al. have reported an EE of eugenol in eugenol-chitosan nanoemulsions of around 11.61% when prepared by ultrasonic treatment employing a chitosan-acetic acid solution containing 1 wt/v% Tween 20 at ratios of chitosan-to-eugenol of 1:1 [23]. This quantity, however, is considered sufficient to contribute to the therapeutic effect, since concentrations of 10^{-8} to 10^{-5} M have been reported as effective in periodontal treatment [29,46]. It is important to point out that when combined with some antibiotics eugenol has a synergistic impact that increases the antibiotic's therapeutic effect [27,47]. On this topic, Hanene Miladi et al. have reported a synergistic effect of eugenol oil and tetracycline with a reduction rate ranging from two-to-eight-fold in the minimal inhibitory concentration [48].

The loading capacities for the batches of NCs were 2.72% for the lowest (10 mg), 5.44% for the medium (20 mg), and 7.65% for the highest concentration (30 mg). Thus, the CHX in CAP-NCs does not show a statistically significant influence on size, though it does determine loading capacity and process efficiency.

DSC studies were performed to understand the relations among the ingredients of the formulations. Thermograms of free CHX as well as the polymer, stabilizer, unloaded NCs, loaded NCs, and the physical mixture were obtained to define the physical state of the drug and the polymer in the NCs, and to detect drug-polymer interactions. NCs were used as a model system because their elaboration requires most of the components used in nanospheres. Figure 3 shows the melting endotherm of the pure CHX base at 135.65 °C, followed by its degradation. The physical mixture shows a broad peak between the melting temperatures of eugenol oil and CHX corresponding to the interaction of two substances. The decrease in the endothermic peak of CHX base in this physical mixture could be attributed to a dilution effect. In addition, Figure 3e shows slight endothermic changes that indicate the presence of PVA and CAP. In the case of the CHX incorporated into the CAP-NCs (Figure 3f), the endothermic peak characteristic of the melting point of CHX was not observed at all concentrations assayed. This behavior suggests that CHX dissolves into the eugenol encapsulated in a polymeric membrane composed of the polymer. One particularly important observation is the absence of the crystalline peak of the CAP in the CHX-CAP-NCs, which suggests that CHX and eugenol may act as plasticizers of the polymer.

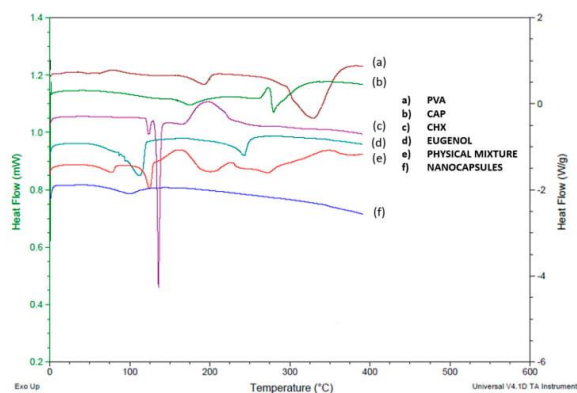


Figure 3. Thermograms of individual excipients, the physical mixture, and CHX-CAP-NCs.

3.2. In Vitro Drug Release Study

Figures 4 and 5 show the release profiles of CHX for the CHX-CAP-NSphs and CHX-CAP-NCs, respectively. A rapid release of CHX is evidenced for both systems. Complete release was obtained within 15 min for the CHX-CAP-NSphs and 80 min for the CHX-CAP-NCs at pH 7 in a phosphate buffer solution with Brij® 58 2.5% added. This difference can be attributed to the architecture of the nanosystems, as NSphs have a matrix structure while the structure of NCs is capsular. A matrix system usually releases through diffusion, whereas a capsular system can release by either diffusion through the membrane or breaking the capsule. It is to be expected that similar behavior may occur under in vivo conditions. This drug is in class II of the biopharmaceutics drug classification, which means that dissolution is the limiting factor, as we simulated in the in vitro test. Class II drugs have an expected in vitro–in vivo correlation that allows a good prediction of formulation performance in vivo based on in vitro drug release profile studies [49,50].

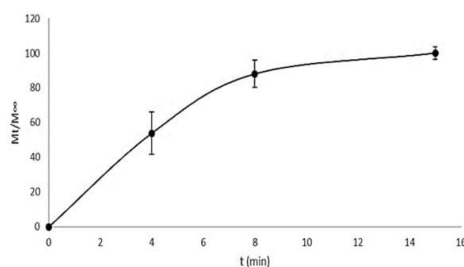


Figure 4. Release profile of CHX from NSphs.

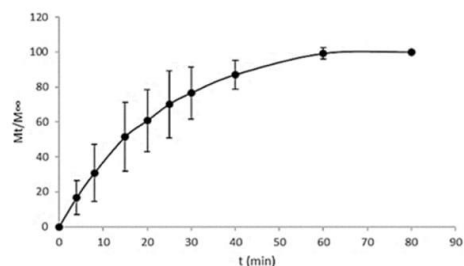


Figure 5. Release profile of CHX from NCs.

Conventional pharmaceutical forms used to treat periodontal disease generally require several applications throughout the day due to the rapid elimination of the drug from the site. Indeed, only shorter intervals between administrations can ensure a local pharmacological effect [51], but these additional applications come at the cost of the patient's comfort and can affect treatment compliance. The systems proposed herein can improve retention in the periodontal pocket, meaning fewer administrations and a high therapeutic effect can be projected. Because CHX-CAP-NSphs and CHX-CAP-NCs are pH-dependent systems, rapid drug release is expected in cases of chronic periodontal disease because the pH of the crevice fluid promotes the rapid dissolution of the CAP polymer. This occurs because the environment tends to become acidic during infection due to the combined actions of bacterial metabolism and the host's immune response [14,52].

The results of the mathematical modelling of the in vitro release results are shown in Table 3. To determine whether CHX transport is based on Fickian or non-Fickian diffusion, the Korsmeyer-Peppas and Higuchi models were used. In both cases—i.e., nanospheres and nanocapsules—the Korsmeyer-Peppas model presented a satisfactory fit. This semi-empirical model was developed explicitly for polymeric matrices and is used to elucidate the release mechanism

because of its ability to differentiate between, and then categorize, distinct geometrical systems by interpreting their exponents (n). In the present case, the geometrical systems had a spherical tendency, which theoretically means values for an $n = 0.5$ slab for Fickian diffusion and higher values of n , i.e., between 0.5 and 1, or $n = 1$, for mass transfer under non-Fickian diffusion [53,54].

Table 3. Correlation coefficients and constants of the kinetic models, Peppas equation, and Higuchi model used to determine the transport mechanism, release type, and kinetics of drug release from nanospheres and nanocapsules.

Nanosystem	Korsmeyer-Peppas Model		Higuchi Model	
	r^2	n	r^2	K_H (mg/min ^{1/2})
NSphs	0.913	0.471	0.890	0.2402
NCs	0.9464	0.6083	0.9343	0.1313

The CHX-CAP-NSphs showed a rapid release of the total amount of CHX at 15 min. This adjusted to the Korsmeyer-Peppas model by showing a determination coefficient of 0.913, a diffusion exponent (n) equal to 0.471 and $K_H = 0.2402$ mg/min^{1/2}. These results indicate that the release of CHX followed Fickian diffusion that involved diffusion-erosion processes due to CHX's molecular diffusion from the matrix of NSphs as a consequence of its chemical gradient and relaxation of CAP's polymer chains. The CHX-CAP-NCs had a slower release than the NSphs as they had liberated the total amount of drug at 80 min, with a diffusion exponent of $n = 0.6083$ and a delivery release of $K_H = 0.1313$ mg/min^{1/2}. Thus, the NCs had non-Fickian diffusion; that is, an anomalous transport. We hypothesize that this behavior may occur because the eugenol oil acts as a plasticizing agent of the CAP polymer that likely delays drug release in the pH = 7 Brig[®]58 2.5% buffer solution. This would also relax the CAP's polymer chains that form the nanocapsule membrane to allow drug diffusion towards the medium to a point where this becomes completely eroded and the total amount of the drug can be released.

Comparing the results obtained from both nanosystems allows us to affirm that Fickian diffusion would provide the most predominant release mechanism, though it is important to note that changes in the pH of the release medium can delay the release time of the total amount of drug. This property could permit prolonged release over long periods because the pH of the crevicular fluid in the periodontal pocket changes from around 5 in normal conditions to 7 as PD progresses due to inflammation and the accumulation of bacteria. The NCs that contained eugenol oil probably acted first to reduce tissue inflammation and the pH of the medium thanks to their anti-inflammatory and antimicrobial properties. As the pH of the medium (i.e., the crevicular fluid in the periodontal pocket) decreased, the nanocapsules are able to lower their release rate because the CAP polymer becomes less soluble at acid pH. The decrease in the pH of the medium results from an improvement in the stage of PD. In the case of severe and chronic periodontal disease, the pH of the periodontal pocket that contains the crevicular fluid is slightly basic, i.e., close to 7, but as the presence of bacteria decreases the stage of the disease improves until the inflammation and other characteristic discomforts disappear. It is at that point that the pH of the periodontal pocket changes from slightly basic to slightly acidic, so we would expect that this decrease in the pH of the periodontal pocket medium, where the NSphs and NCs infiltrated and are deposited, will retard drug release from nanosystems formulated with the CAP polymer. The nanoparticle infiltration has been documented by our group (Ganem-Quintanar, 1997) using confocal laser scanning microscopy. Thus, when NPs are gently applied to the porcine gingival sulcular space they are able to penetrate into the junctional epithelium. These results suggest that NPs can provide a potential intrapocket carrier system for delivery of active substances to the periodontal pocket [55].

3.3. Panel Test

Figure 6 presents the clinical evolution of patients with periodontitis, which is characterized by inflammation of the gums and accumulation of the supragingival calculus even with no movement of

the dental pieces. The patients were treated with the procedure outlined above, receiving instructions to administer the equivalent of 9 mg of the CHX contained in the NC dispersion every third day for 15 days. The treatment was applied to buccal protectors that were used only at night, when bacterial activity is highest. The O'Leary index of dentobacterial activity showed a decrease in plaque, as seen in in Figure 6, which ranged from 76–26% using CHX-CAP-NCs and 91–67.5% using a commercial product (mouthwash). This finding is corroborated by the patients that show a gradual decrease in gum inflammation. It was also possible to confirm that patient compliance was acceptable, since this treatment does not require several applications per day, but only one nocturnal application. Thus, patients can carry out their normal daily activities without the bother of a protector. Finally, these systems have a soft consistency that does not irritate the oral cavity. It is important to mention also that the dose administered is lower than the one usually applied in commercial formulations. Rodrigues et. al. have evaluated the clinical response of periodontal tissue to the application of PerioChip compared to scaling and root planning (SRP) and identified a greater reduction in pocket depth and clinical attachment gain when local drugs were used in deep pockets [56]. Dorota et. al. have demonstrated the decrease in periodontal pocket depth and bleeding after clinical application of hydroxyethyl cellulose matrices loaded with metronidazole [57]. A study carried out by Norma et. al. showed a 26% reduction in dentobacterial plaque after a 14 day treatment using a 0.12% CHX mouthwash [58].

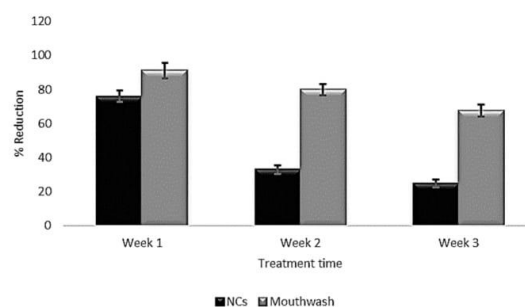


Figure 6. Change in dentobacterial plaque of CHX CAP-NCs versus a commercial mouthwash.

4. Conclusions

The emulsification-diffusion technique used in this work allowed the preparation of two systems—CHX-CAP-NSphs and CHX-CAP-NCs—that can be applied as local drug delivery systems in the oral cavity. More specifically, they can infiltrate, or be administered into, the periodontal pocket. The NCs showed the best entrapment efficiency at 84.30%. DSC showed that introducing CHX into CHX-CAP-NC systems decreases the glass transition temperature of the polymer. The CHX release test showed that the CHX-CAP-NSphs and CHX-CAP-NCs adjusted to the Higuchi and Korsmeyer-Peppas models and so correspond to Fickian diffusion that is dependent on time in the case of NSphs, and non-Fickian diffusion (anomalous transport) in that of the NCs, perhaps because eugenol oil acts as a polymer plasticizer. Both processes involve diffusion-erosion processes. These results indicate that CHX-CAP-NSphs and CHX-CAP-NCs could be of great help in treating periodontal disease because they affect a larger surface area and have both controlled release and potential tissue infiltration. In addition, eugenol could potentiate the antibacterial effect of CHX and exert a synergistic effect that takes advantage of its analgesic and anti-inflammatory properties.

Applying CHX-CAP-NCs reduced the dentobacterial plaque index by 65.78%, in contrast to a commercial mouthwash, which reduced this index by only 25.8%. Therefore, we can suggest that nanoparticulate systems allow much greater infiltration into the subgingival tissue (periodontal pocket) because they cover a greater surface area and so reduce both the therapeutic dosage and treatment time.

Author Contributions: Conceptualization, G.V.-R., L.M.-A., and D.Q.-G.; data curation, G.V.-R., L.M.-A., and M.L.Z.-Z.; investigation, G.V.-R. and D.Q.-G.; methodology, G.V.-R., M.L.Z.-Z., G.L.-G., and D.Q.-G.; writing—original draft preparation, G.V.-R., L.M.-A., S.E.M.-E., and D.Q.-G.; writing—review and editing, G.V.-R., M.L.Z.-Z., G.L.-G., S.E.M.-E., and D.Q.-G.; supervision, D.Q.-G.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: The authors acknowledge the financial support for this work provided by student grants 273353 from CONACYT, PAPIIT IT201717 and IT201617 from DGAPA-UNAM, and the Internal Research Projects PIAPI 1804. The authors would like to thank dental surgeon, M.D Virginia Rocha Pérez for the support granted in the dental part.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Petersen, P.E.; Ogawa, H. The global burden of periodontal disease: Towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontology 2000* **2012**, *60*, 15–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hatipoglu, H.; Yaylak, F.; Gungor, Y. A brief review on the periodontal health in metabolic syndrome patients. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* **2015**, *9*, 124–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ouderaa, F.J.G. Anti-plaque agents. Rationale and prospects for prevention of gingivitis and periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* **1991**, *18*, 447–454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Harvey, J.D. Periodontal Microbiology. *Dent. Clin. N. Am.* **2017**, *61*, 253–269. [[CrossRef](#)]
- Yue, I.C.; Poff, J.; Cortés, M.E.; Sinisterra, R.D.; Faris, C.B.; Hildgen, P.; Langer, R.; Shastri, V.P. A novel polymeric chlorhexidine delivery device for the treatment of periodontal disease. *Biomaterials* **2004**, *25*, 3743–3750. [[CrossRef](#)]
- Kopytynska-Kasperczyk, A.; Dobrzynski, P.; Pastusiak, M.; Jarzabek, B.; Prochwicz, W. Local delivery system of doxycycline hyclate based on ϵ -caprolactone copolymers for periodontitis treatment. *Int. J. Pharm.* **2015**, *491*, 335–344. [[CrossRef](#)]
- Jain, N.; Jain, G.K.; Javed, S.; Iqbal, Z.; Talegaonkar, S.; Ahmad, F.J.; Khar, R.K. Recent approaches for the treatment of periodontitis. *Drug Discov. Today* **2008**, *13*, 932–943. [[CrossRef](#)]
- Huynh, T.T.N.; Padois, K.; Sonvico, F.; Rossi, A.; Zani, F.; Pirot, F.; Doury, J.; Falson, F. Characterization of a polyurethane-based controlled release system for local delivery of chlorhexidine diacetate. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2010**, *74*, 255–264. [[CrossRef](#)]
- Zeng, P.; Zhang, G.; Rao, A.; Bowles, W.; Wiedmann, T.S. Concentration dependent aggregation properties of chlorhexidine salts. *Int. J. Pharm.* **2009**, *367*, 73–78. [[CrossRef](#)]
- Lee, D.Y.; Spångberg, L.S.W.; Bok, Y.B.; Lee, C.Y.; Kum, K.Y. The sustaining effect of three polymers on the release of chlorhexidine from a controlled release drug device for root canal disinfection. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontol.* **2005**, *100*, 105–111. [[CrossRef](#)]
- Lboutounne, H.; Chaulet, J.F.; Ploton, C.; Falson, F.; Pirot, F. Sustained ex vivo skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly(ϵ -caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a digluconate. *J. Control. Release* **2002**, *82*, 319–334. [[CrossRef](#)]
- Matthijs, S.; Adriaens, P.A. Chlorhexidine varnishes: A review. *J. Clin. Periodontol.* **2002**, *29*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cavallari, C.; Brigidi, P.; Fini, A. Ex-vivo and in-vitro assessment of mucoadhesive patches containing the gel-forming polysaccharide psyllium for buccal delivery of chlorhexidine base. *Int. J. Pharm.* **2015**, *496*, 593–600. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Onnainty, R.; Onida, B.; Pérez, P.; Longhi, M.; Barresi, A.; Granero, G. Targeted chitosan-based bionanocomposites for controlled oral mucosal delivery of chlorhexidine. *Int. J. Pharm.* **2016**, *509*, 408–418. [[CrossRef](#)]
- Withers, N.J.; Senthil, A.; Osinski, M.; Nguyen, J.Q.; Alas, G.; Minetos, C.; Jaiswal, N.; Ivanov, S.A.; Smolyakov, G.A.; Huber, D.L. Effects of Iron-Oxide Nanoparticles on Compound Biofilms of *Streptococcus Gordonii* and *Fusobacterium Nucleatum*. In Proceedings of the Colloidal Nanoparticles for Biomedical Applications XIII, San Francisco, CA, USA, 27–29 January 2018; Liang, X.J., Parak, W.J., Osiński, M., Eds.; SPIE: Bellingham, WA, USA, 2018; Volume 10507, p. 17.
- Zupancic, S.; Kocbek, P.; Baumgartner, S.; Kristl, J. Contribution of Nanotechnology to Improved Treatment of Periodontal Disease. *Curr. Pharm. Des.* **2015**, *21*, 3257–3271. [[CrossRef](#)]

17. Heinämäki, J.T.; Iraizoz Colarte, A.; Nordström, A.J.; Yliruusi, J.K. Comparative evaluation of ammoniated aqueous and organic-solvent-based cellulose ester enteric coating systems: A study on free films. *Int. J. Pharm.* **1994**, *109*, 9–16. [[CrossRef](#)]
18. Edgar, K.J. Cellulose esters in drug delivery. *Cellulose* **2006**, *14*, 49–64. [[CrossRef](#)]
19. Rowe, R.C.; Sheskey, P.J.; Owen, S.C.; American Pharmacists Association. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*; APhA/Pharmaceutical Press: London, UK, 2009; ISBN 9781582121352.
20. Shokri, J.; Adibki, K. Application of Cellulose and Cellulose Derivatives in Pharmaceutical Industries. In *Cellulose—Medical, Pharmaceutical and Electronic Applications*; van de Ven, T., Godbout, L., Eds.; InTechOpen: Rijeka, Croatia, 2013. [[CrossRef](#)]
21. Vázquez, G.; Castro, T.; Hernández, A.; Castro, J.; De Lara, R. Comparación del efecto anestésico del aceite de clavo, solución salina y solución coloidal en juveniles de *Chirostoma jordani* (Woolman, 1894). *Arch. Med. Vet.* **2013**, *45*, 59–66. [[CrossRef](#)]
22. Shahabadi, N.; Akbari, A.; Karampour, F.; Falsafi, M. Cytotoxicity and antibacterial activities of new chemically synthesized magnetic nanoparticles containing eugenol. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2019**, *49*, 113–122. [[CrossRef](#)]
23. Shao, Y.; Wu, C.; Wu, T.; Li, Y.; Chen, S.; Yuan, C.; Hu, Y. Eugenol-chitosan nanoemulsions by ultrasound-mediated emulsification: Formulation, characterization and antimicrobial activity. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *193*, 144–152. [[CrossRef](#)]
24. Park, C.K.; Kim, K.; Jung, S.J.; Kim, M.J.; Ahn, D.K.; Hong, S.D.; Kim, J.S.; Oh, S.B. Molecular mechanism for local anesthetic action of eugenol in the rat trigeminal system. *Pain* **2009**, *144*, 84–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Parodi, T.V.; Cunha, M.A.; Heldwein, C.G.; De Souza, D.M.; Martins, Á.C.; Garcia, L.D.O.; Junior, W.W.; Monserrat, J.M.; Schmidt, D.; Caron, B.O.; et al. The anesthetic efficacy of eugenol and the essential oils of *Lippia alba* and *Aloysia triphylla* in post-larvae and sub-adults of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **2012**, *155*, 462–468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. de Oliveira, C.P.B.; da Paixão Lemos, C.H.; Felix e Silva, A.; de Souza, S.A.; Albinati, A.C.L.; Lima, A.O.; Copatti, C.E. Use of eugenol for the anaesthesia and transportation of freshwater angelfish (*Pterophyllum scalare*). *Aquaculture* **2019**, *513*, 734409. [[CrossRef](#)]
27. Moon, S.E.; Kim, H.Y.; Cha, J.D. Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. *Arch. Oral Biol.* **2011**, *56*, 907–916. [[CrossRef](#)]
28. Hemaiswarya, S.; Doble, M. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. *Phytomedicine* **2009**, *16*, 997–1005. [[CrossRef](#)]
29. Hashieh, I.A.; Pommel, L.; Camps, J. Concentration of eugenol apically released from zinc oxide-eugenol-based sealers. *J. Endod.* **1999**, *25*, 713–715. [[CrossRef](#)]
30. Scholz, O.A.; Wolff, A.; Schumacher, A.; Giannola, L.I.; Campisi, G.; Ciach, T.; Velten, T. Drug delivery from the oral cavity: Focus on a novel mechatronic delivery device. *Drug Discov. Today* **2008**, *13*, 247–253. [[CrossRef](#)]
31. Phaechamud, T.; Sethajindalert, O. Cholesterol in situ forming gel loaded with doxycycline hyclate for intra-periodontal pocket delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, *99*, 258–265. [[CrossRef](#)]
32. Piñón-Segundo, E.; Ganem-Quintanar, A.; Alonso-Pérez, V.; Quintanar-Guerrero, D. Preparation and characterization of triclosan nanoparticles for periodontal treatment. *Int. J. Pharm.* **2005**, *294*, 217–232. [[CrossRef](#)]
33. Alvarez Echazú, M.I.; Olivetti, C.E.; Anesini, C.; Perez, C.J.; Alvarez, G.S.; Desimone, M.F. Development and evaluation of thymol-chitosan hydrogels with antimicrobial-antioxidant activity for oral local delivery. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *81*, 588–596. [[CrossRef](#)]
34. Quintanar-Guerrero, D.; Fessi, H.; Allémann, E.; Doelker, E. Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. *Int. J. Pharm.* **1996**, *143*, 133–141. [[CrossRef](#)]
35. Allémann, E.E.; Doelker, R.G. Drug loaded poly(lactic acid)nanoparticles produced by a reversible salting-out process: Purification of an injectable dosage form. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1993**, *39*, 13–18.
36. Gjoseva, S.; Geskovski, N.; Sazdovska, S.D.; Popeski-Dimovski, R.; Petruševski, G.; Mladenovska, K.; Goracinova, K. Design and biological response of doxycycline loaded chitosan microparticles for periodontal disease treatment. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *186*, 260–272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

37. Agullo, M.J.A.; Loscos, F.G. Periodoncia para el higienista dental Importancia del uso de índices en la práctica periodontal diaria del higienista dental. *Periodoncia Y Osteointegración* **2003**, *13*, 233–244.
38. Michel, B.; Maribel, A. Plaque Control with O'Leary index, instructing the Bass brushing technique in pediatric patients postgraduate Pediatric Dentistry of the UAN. *Educatconciencia* **2015**, *5*, 106–118.
39. Taleghani, F.; Rezvani, G.; Birjandi, M.; Valizadeh, M. Impact of green tea intake on clinical improvement in chronic periodontitis: A randomized clinical trial. *J. Stomatol. Oral Maxillofac. Surg.* **2018**, *119*, 365–368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. De Araújo Lopes, A.; Da Fonseca, F.N.; Rocha, T.M.; De Freitas, L.B.; Araújo, E.V.O.; Wong, D.V.T.; Lima Júnior, R.C.P.; Leal, L.K. Eugenol as a Promising Molecule for the Treatment of Dermatitis: Antioxidant and Anti-inflammatory Activities and Its Nanoformulation. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, *2018*, 8194849. [[CrossRef](#)]
41. Seneviratne, C.J.; Leung, K.C.F.; Wong, C.H.; Lee, S.F.; Li, X.; Leung, P.C.; Lau, C.B.S.; Wat, E.; Jin, L. Nanoparticle-Encapsulated Chlorhexidine against Oral Bacterial Biofilms. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e103234. [[CrossRef](#)]
42. Liakos, I.L.; Iordache, F.; Carzino, R.; Scarpellini, A.; Oneto, M.; Bianchini, P.; Grumezescu, A.M.; Holban, A.M. Cellulose acetate—Essential oil nanocapsules with antimicrobial activity for biomedical applications. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2018**, *172*, 471–479. [[CrossRef](#)]
43. ASTM International. Standard test methods for zeta potential of colloids in water and waste water. In *The Annual Book of ASTM Standards*; ASTM International: West Conshohocken, PA, USA, 1985; pp. 4182–4187.
44. Quintanar-Guerrero, D.; Allémann, E.; Doelker, E.; Fessi, H. A mechanistic study of the formation of polymer nanoparticles by the emulsification-diffusion technique. *Colloid Polym. Sci.* **1997**, *275*, 640–647. [[CrossRef](#)]
45. Li, M.; Rouaud, O.; Poncelet, D. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *Int. J. Pharm.* **2008**, *363*, 26–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Jesudasan, J.S.; Wahab, P.U.A.; Sekhar, M.R.M. Effectiveness of 0.2% chlorhexidine gel and a eugenol-based paste on postoperative alveolar osteitis in patients having third molars extracted: A randomised controlled clinical trial. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* **2015**, *53*, 826–830. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Albano, M.; Alves, F.C.B.; Andrade, B.F.M.; Barbosa, L.N.; Pereira, A.F.M.; de Souza, M.D.L.R.; Rall, V.L.M.; Júnior, A.F. Antibacterial and anti-staphylococcal enterotoxin activities of phenolic compounds. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2016**, *38*, 83–90. [[CrossRef](#)]
48. Miladi, H.; Zmantar, T.; Kouidhi, B.; Al Qurashi, Y.M.A.; Bakhrouf, A.; Chaabouni, Y.; Mahdouani, K.; Chaieb, K. Synergistic effect of eugenol, carvacrol, thymol, p-cymene and γ -terpinene on inhibition of drug resistance and biofilm formation of oral bacteria. *Microb. Pathog.* **2017**, *112*, 156–163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Amidon, G.L.; Lennernäs, H.; Shah, V.P.; Crison, J.R. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability. *Pharm. Res.* **1995**, *12*, 413–420. [[CrossRef](#)]
50. Campos, J.C.; Ferreira, D.C.; Lima, S.; Reis, S.; Costa, P.J. Swellable polymeric particles for the local delivery of budesonide in oral mucositis. *Int. J. Pharm.* **2019**, *566*, 126–140. [[CrossRef](#)]
51. Russo, E.; Selmin, F.; Baldassari, S.; Gennari, C.G.M.; Caviglioli, G.; Cilurzo, F.; Minghetti, P.; Parodi, B. A focus on mucoadhesive polymers and their application in buccal dosage forms. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2016**, *32*, 113–125. [[CrossRef](#)]
52. Vieira Colombo, A.P.; Magalhães, C.B.; Hartenbach, F.A.R.; Martins do Souto, R.; Maciel da Silva-Boghossian, C. Periodontal-disease-associated biofilm: A reservoir for pathogens of medical importance. *Microb. Pathog.* **2016**, *94*, 27–34. [[CrossRef](#)]
53. Costa, P.; Sousa Lobo, J.M. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, *13*, 123–133. [[CrossRef](#)]
54. Ritger, P.L.; Peppas, N.A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *J. Control. Release* **1987**, *5*, 37–42. [[CrossRef](#)]
55. Ganem-Quintanar, A. Étude de la Permeabilité de la Muqueuse Orale: Évaluation de Différentes Approches Pour Augmenter le Passage des Principes Actifs. Ph.D. Thesis, Université de Genève/Université Claude Bernard, Lyon, Genève, 1997.
56. Rodrigues, I.F.; Machion, L.; Casati, M.Z.; Nociti, F.H.; Toledo, S.; Sallum, A.W.; Sallum, E.A. Clinical evaluation of the use of locally delivered chlorhexidine in periodontal maintenance therapy. *J. Periodontol.* **2007**, *78*, 624–628. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

57. Kida, D.; Junka, A.; Sender-Janeczek, A.; Dus, I.; Dominik, M. Metronidazole-Loaded Porous Matrices for Local Periodontitis Treatment: In Vitro Evaluation and In Vivo Pilot Study. *Appl. Sci.* **2019**, *9*, 4545. [[CrossRef](#)]
58. Beatriz, N.; Hernández, B.; Gabriela, M.; García, N.; Eric, M.; Rivera, G.; Ancona, M.B.; Lira, G.H.; Castellanos, G.L.; Belinda, L.; et al. Eficacia de la clorhexidina en el tratamiento de gingivitis: Tabletas o colutorio. *Rev. Medi. UV* **2012**, *2*, 6–12.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).