



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"**



DESARROLLO DE UN NUEVO METODO PARA MEDIR
BIOADHESION DE POLIMEROS INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE
PARTICULA Y TIEMPO DE HUMECTACION SOBRE LA FUERZA

DE ADHESION

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A N :
JORGE LOPEZ ALBARRAN
RAFAEL VILLALOBOS GARCIA

DIRECTOR: PhD ROBERTO ARNULFO CERVANTES OLIVARES

ASESORES: OFB EDGAR AGUILERA CERON

OFB DAVID QUINTANAR GUERRERO

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO,

ENERO DE 1982



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 está 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.

INDICE

	PAG.
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
OBJETIVOS	2
I. INTRODUCCION	3
II. MATERIAL Y METODOS	18
II.1. Tensiómetro de Du Nolly.	18
II.2.- Adaptación del tensiómetro de Du Nolly.	18
II.3.-Calibración y Validación del Aparato.	21
II.4.-Soluciones.	22
II.5.- Elaboración de tabletas de Carbopol 934.	23
II.6.- Obtención de la mucosa gastrointestinal (GI).	23
II.7.- Medición de la fuerza de adhesión a la mucosa.	24
II.8.- Determinación de la influencia del tiempo de humectación.	24
II.9.- Determinación de la influencia del Área expuesta a diferentes porciones del tracto gastrointestinal.	25

II.10.- Elaboración de micronizados.	26
II.11.- Medición de la adhesión de micronizados a mucosa gastrointestinal.	26
III. RESULTADOS	29
III.1.-Calibración y validación del aparato.	29
III.2.-Resultados de la influencia del tiempo de humectación sobre la adhesión.	35
III.3.-Fuerza de adhesión a diferentes porciones del TGI.	37
III.4.- Resultados de la adhesión de micronizados a mucosa GI.	42
IV. DISCUSION	45
V. CONCLUSIONES	50
APENDICE	52
BIBLIOGRAFIA	58

Lista de tablas.

1.	Pesos obtenidos al combinar las diferentes pesas.	21
2.	Tabla del análisis de varianza para la curva de calibración.	29
3.	Tabla de ANDEVA para evaluar los resultados en diferentes días y por dos analistas.	30
4.	Resultados utilizados para evaluar el modelo lineal, la reproducibilidad y repetibilidad de las mediciones del aparato realizadas en dos días y por dos diferentes investigadores.	32
5.	Resultados utilizados para determinar la linealidad del método.	34
6.	Resultados de la fuerza de adhesión (en dinas) contra el tiempo de humectación en duodeno.	36
7.	Resultados de la fuerza de adhesión en diferentes porciones del TGI.	38
8.	Resultados del porcentaje adherido de carbopol 934 (micronizado) a el duodeno de cerdo.	43
9.	Análisis de varianza usado para una regresión.	54
10.	Tabla de valores de la muestra para el diseño factorial (2X2X8) completamente al azar.	56
11.	Tabla condensada del ANDEVA para evaluar la reproducibilidad y repetibilidad de las mediciones.	57

Lista de figuras.

1.	Tensiómetro de Du Noüy.	19
2.	Vista esquemática de la platina adaptada.	20
3.	Esquema que representa la manera de poner en contacto la membrana con el polímero.	25
4.	Diagrama del ensamble usado para probar la bioadhesión de las micropartículas.	27
5.	Curva de calibración de la balanza de torsión.	31
6.	Gráfica que presenta la fuerza de adhesión vs el tiempo de humectación	37
7.	Fuerza de adhesión vs Área expuesta (fondo gástrico).	39
8.	Fuerza de adhesión vs Área expuesta (duodeno).	40
9.	Fuerza de adhesión vs Área expuesta (yeyuno).	41
10.	Gráfica de porcentaje de carbopol adherido vs el tamaño de partícula.	44
11.	Representación de la interpenetración conforme aumenta la cantidad de polímero disuelto.	47

**DESARROLLO DE UN NUEVO METODO PARA MEDIR
BIOADHESION DE POLIMEROS. INFLUENCIA DEL
TAMARO DE PARTICULA Y TIEMPO DE
HUMECTACION SOBRE LA FUERZA DE ADHESION.**

OBJETIVOS

GENERAL:

Adaptar y validar un aparato que nos permita evaluar la bioadhesión de una manera precisa, rápida y sencilla.

ESPECIFICOS:

- Adaptar el tensiómetro de Du Noüy para evaluar la adhesión de polímeros a mucosa gastrointestinal, utilizando carbopol 934 como polímero prueba.
- Validar el aparato adaptado.
- Observar la influencia del área expuesta del polímero sobre la adhesión a mucosas, a nivel macro- (0.1 a 0.79 cm^2) y a nivel micropartículas (59.0 a $164.5 \mu\text{m}$)
- Determinar el tiempo de humectación en el cual la fuerza de adhesión es máxima entre el carbopol 934 y mucosa gastrointestinal
- Determinar la influencia que sobre la bioadhesión tiene la porción trabajada del tracto gastrointestinal.

I. INTRODUCCION

Podemos definir a la Bioadhesión, como la habilidad de un material (sintético o biológico) para adherirse a un tejido biológico por un periodo prolongado de tiempo (Longer y Robinson, 1986), esta definición incluye un gran número de fenómenos, como la adhesión de mariscos sobre las rocas, la adhesión de células sobre otras células y la adhesión de microorganismos sobre varios sustratos mucoides de los seres vivos (Longer y Robinson, 1986; Lyklema et al., 1989). Desde un punto de vista teórico, la bioadhesión puede conducir a la solución de problemas de biodisponibilidad en formas farmacéuticas como en los casos de corta estancia en los sitios de absorción, elevando así importantemente los niveles séricos del principio activo, teniendo algunos ejemplos: En la administración sublingual encontramos que además del efecto bioadhesivo, se contaría con una forma de evitar la destrucción por fluido gástrico de las moléculas y principios activos, evitando así la administración por vía oral con el necesario paso por el sistema digestivo, y la posible degradación del principio activo (Anders y Merkle, 1989; Deasy y O'Neal, 1989). El vaciado estomacal y el peristaltismo intestinal, pueden desalojar el ingrediente activo del sitio de absorción, esto puede ser disminuido al utilizar una forma bioadhesiva (Longer et al. 1985; Bridges et al., 1988; Harris et al., 1989). Para el caso de la administración rectal, es importante mantener la dosis

farmacéutica en la parte baja del recto en donde la sangre de las venas hemorroidales escapan al efecto del primer paso del hígado, aumentando la eficiencia del fármaco; caso similar al de la administración vaginal, en donde es altamente recomendable y deseable que la dosis no sea retirada tan rápidamente del sitio de actividad (Nagai y Machida, 1985). Existen otros casos similares a los aquí mencionados en los que la bioadhesión puede mantener la dosis y forma farmacéutica "espacialmente" por un claro y definido periodo de tiempo con un nivel de absorción y actividad razonablemente elevados del principio activo (Bechgaard y Ladefoged, 1978; Ilum, 1987; Pfister, 1989; Sættone et al. 1989). Para entender la bioadhesión y el mecanismo de difusión del ingrediente activo es necesario el conocimiento de las características de la mucosa y la forma en que ésta interactúa con los polímeros bioadhesivos.

Todos los órganos del cuerpo humano están cubiertos o recubiertos por las mucosas o serosas. Las mucosas son membranas húmedas que revisten órganos o cavidades que tienen contacto directo o indirecto con el exterior del organismo y se integran con la asociación de alguna membrana epitelial de cubierta y revestimiento con tejido conjuntivo colágeno laxo. En el caso particular del tracto digestivo, la mucosa funciona manteniéndolo húmedo por la producción de moco. La mucosa del intestino delgado contiene nodos linfáticos solitarios y especialmente en el íleon presenta las llamadas placas de Peyer a lo largo del borde antimesentérico; en el duodeno hay además glándulas duodenales pequeñas, conocidas como glándulas mucosas duodenales (De

Brunner), las cuales producen un moco alcalino viscoso que neutraliza el pH que tiene la ingesta al salir del estómago para de esta manera permitir la acción de las enzimas digestivas en el duodeno, además de que protege a la mucosa contra la acción del ácido del estómago (Ganong, 1986). La mucosa del intestino delgado entre otras estructuras está integrada por vellosidades en toda su longitud, existiendo de 20 a 40 por mm^2 de mucosa. Cada vellosidad intestinal es una proyección digitiforme, de 0.5 a 1.0 milímetro de longitud, cubierta por un epitelio columnar simple con microvellosidades, exocriocitos caliciformes y conteniendo una red de capilares y vasos linfáticos (quilíferos). La superficie se encuentra recubierta por el moco que es secretado por los exocriocitos caliciformes, el cual es un líquido altamente viscoso que se adhiere al epitelio y que tiene la función de proteger de los diferentes agresores: mecánicos, químicos, bacterianos y virales (Niibuchi et al., 1986). Está compuesto por: agua que representa el 95 % del moco formado, su mayor componente extra es la glicoproteína (0.5-5 %), además de lípidos en bajas proporciones, sales minerales (1 %) y de proteínas libres (0.5-1.0%) (Longer y Robinson 1986); la composición exacta del moco varía dependiendo del tejido, las glicoproteínas son el principal componente responsable de su viscosidad, sus propiedades bioadhesivas y cohesivas (Kearney y Marriot, 1986). Básicamente las glicoproteínas consisten de una proteína "core" a la que se unen diferentes oligosacáridos que contienen esencialmente galactosa, N-acetilgalactosamina y

N-acetilglucosamina, además de fucosa. Sus enlaces con la proteína core son del tipo O-glucosídico con aminoácidos como serina, treonina y prolina. Muchos de los residuos terminales en las cadenas del lado oligosacárido son de tipo ácido siálico cargado negativamente, y por efecto del pH, (que suele llegar a 2.8 en el duodeno), hacen de la proteína un polielectrolito aniónico; los residuos de fosfatos contribuyen igualmente a esta carga negativa. La estructura del gel mucoso es consecuencia de la asociación intermolecular de glicoproteína en una red polimérica (Marriot, 1983; Cheema et al., 1985). Anteriormente se pensaba que era un tetrámero, ahora se cree que forman uniones entre cadenas con alto grado de entrecruzamientos (Longer y Robinson, 1986). Esto ha sido propuesto como cadenas resultantes de enlaces disulfuro (intracadena) y asociaciones macromoleculares que son debidas a las uniones físicas estabilizadas por uniones electrostáticas (puentes de hidrógeno, fuerzas de Van Der Waals), o algunas otras interacciones no covalentes entre las cadenas de oligosacáridos y la proteína core de la molécula. Una importante porción de glicoproteínas no son incorporadas a la red, pero estas se presentan como la fracción soluble, aumentando la viscosidad del fluido intersticial, incluso confiriendo una consistencia de sólido-líquido; debido a estas características y a que la cubierta mucosa de la superficie epitelial es una capa de espesor heterogéneo, (variando entre 5 y 200 μm , con un promedio de 80 μm), el papel protector del moco es evidente ante el nivel de acidez estomacal.

Este efecto protector podría resultar en particular de su hidrofobicidad, protegiendo a la mucosa de la propia difusión inversa, manteniendo al ácido clorhídrico hacia el lumen de la superficie epitelial (Nagai y Machida, 1985). El moco gástrico puede actuar como una capa de agua en la cual iones H^+ difunden y son neutralizados por el bicarbonato secretado por la superficie epitelial (James y Marriot, 1982). Un equilibrio dinámico existe en la superficie de la mucosa entre una continua erosión proteolítica y la abrasión mecánica, con la igualmente continua nueva secreción de moco (Duchene et al., 1988). Además del papel de protección gástrica ante el ácido clorhídrico, el moco constituye también, hablando en general, una barrera para la difusión de moléculas, incluyendo la absorción de fármacos. La difusión a través de la capa de moco depende principalmente de las características fisicoquímicas del ingrediente activo: a) carga molecular, b) proporción de hidratación, c) habilidad para formar puentes de hidrógeno y d) peso molecular (Robert y Buri, 1986). Sin embargo, la composición del moco interfiere de manera importante a nivel de fenómenos de difusión, especialmente por la concentración de glicoproteínas y por la proporción de enlaces cruzados, o más adecuadamente, el promedio de peso molecular entre dos uniones dentro de la malla mucosa. Un gran número de ingredientes activos pueden interactuar con el moco difundiendo a través de él, particularmente los antibióticos (Aramaki et al., 1987; Niibuchi et al., 1986). Algunos otros compuestos pueden interactuar con la red mucoprotéica de manera diferente, provocando su adhesión a la misma, al parecer puede ocurrir la formación de complejos insolubles, impidiendo la absorción por el

tracto gastrointestinal, esto sólo es posible si consideramos a la bioadhesión como un fenómeno que se divide en etapas. Para que la bioadhesión ocurra, se requiere de una sucesión de eventos: primero, se dá un íntimo contacto entre el bioadhesivo y el tejido receptor, este contacto requiere de una buena humectación en cualquiera de las superficies que se adhieren; en el bioadhesivo, esta humectación es fundamental para permitir la relajación de sus cadenas poliméricas; segundo, cuando el contacto se ha establecido, se dá la penetración del bioadhesivo dentro de las grietas superficiales de la mucosa, dando lugar entonces a la interpenetración de cadenas del bioadhesivo con las de mucina; pudiendo situarse entonces enlaces químicos débiles y/o interacciones fisicoquímicas. El material bioadhesivo tiene una penetración a las grietas del tejido sobre el cual es aplicado, de aquí que la superficie del tejido rugoso es un importante factor para la bioadhesión. Una superficie rugosa puede ser definida por la relación de su profundidad máxima -d- y un ancho mínimo -h- (Duchene et al., 1988). Se consideran rugosidades insignificantes para la bioadhesión cuando el aspecto de la relación evaluada como d/h es menor a $1/20$. Para evaluaciones precisas de esta relación sólo materiales altamente fluidos pueden penetrar en las anomalías del tejido con, es por esto que la viscosidad y el peso son de gran importancia para una bioadhesión satisfactoria. Para el caso de un material bioadhesivo sólido, el hinchamiento por contacto con humedad es necesario que sea impartido uniformemente, generando la relajación de las cadenas en el constituyente. La humectación es entonces un factor de gran influencia para la difusión del

polímero en la mucosa, y así es considerado a continuación dentro de la teoría del humedecimiento (Duchene et al., 1988): El coeficiente de difusión S de un líquido (subscripto en b), con un sustrato tisular (t) y el área gástrica (g), en condiciones estáticas, por ejemplo, está dado por la siguiente ecuación:

$$S_{b/g} = \gamma_{gt} - \gamma_{bt} - \gamma_{bg}$$

Donde: γ_{gt} = Tensión interfacial entre el contenido gástrico y el tejido.

γ_{bt} = Tensión interfacial entre el bioadhesivo y el tejido.

γ_{bg} = Tensión interfacial entre bioadhesivo y contenido gástrico.

Para que material bioadhesivo desplace al contenido gástrico y se una espontáneamente sobre el tejido, el coeficiente de difusión debe ser positivo. Para que pueda darse la unión, requerimos de factores como el del hinchamiento, en el que el papel del agua en el mecanismo de bioadhesión de un sólido, es de primordial importancia. Se ha encontrado que existe una cantidad de agua óptima para un máximo de bioadhesión, y aunque en realidad la hidratación de un coloide resulta en la relajación de sus partes estrechas, es también necesario recordar que el pH influirá sobre su acción, por lo que un mismo grado de humectación a diferentes valores de pH provocará resultados diferentes en su fuerza de adhesión. Al parecer la hidratación de hidrocoloides causa disociación en zonas con puentes de hidrógeno en el polímero. Las

interacciones polímero-agua forzan las correspondientes interacciones polímero-polímero, favoreciendo la interdifusión. Moléculas de agua forman una doble capa estableciendo una posible interacción con grupos funcionales. La ruptura de alguna intercadena y asociación de intercadenas aumentan la movilidad de macromoléculas y facilita su penetración en la superficie cavernosa. La interpenetración de cadenas desde el polímero bioadhesivo y el moco con una profundidad suficiente, crean enlaces semipermanentes correspondientes a la teoría de difusión.

Durante la interpenetración de cadenas, las moléculas del bioadhesivo y las mallas mucoproteicas están íntimamente ligadas y, debido a los gradientes de concentración, las cadenas de polímero bioadhesivo, penetran proporcionalmente en dependencia con el coeficiente de difusión de las moléculas que atraviezan la malla y del gradiente de potencial químico. Con el entrecruzamiento del polímero, la interpenetración de cadenas largas se da con mayor dificultad; sin embargo, cadenas pequeñas y terminales pueden contribuir a la interdifusión. Esto hace posible determinar el tiempo característico para la bioadhesión t , dado por (Duchene et al., 1988):

$$t = \frac{\ell^2}{D_0}$$

donde: ℓ = fuerza de interpenetración.

D_0 = Coeficiente de difusión del material bioadhesivo a través de la mucosa.

Las interacciones de uniones químicas que encontramos en los polímeros, son de tipo primario o secundario (Longer y Robinson, 1986). La unión química primaria tiene una naturaleza covalente, su alta fuerza da como resultado uniones permanentes indeseables en bioadhesión; la unión química secundaria comprende un grupo de diferentes fuerzas de atracción, incluyendo fuerzas electrostáticas, fuerzas de Van Der Waals, puentes de hidrógeno y enlaces hidrofóbicos. Las atracciones electrostáticas son debidas a fuerzas de Coulomb entre moléculas de cargas contrarias; las fuerzas de Van Der Waals pueden ser atribuidas a tres tipos de efectos: fuerza polar resultado de la orientación de dipolos permanentes en dos moléculas, fuerzas de inducción, a partir de un dipolo permanente de una tercera molécula y, fuerzas de dispersión, resultado de cambios instantáneos en la distribución de carga alrededor de moléculas no polares. El puente de hidrógeno se da cuando un átomo de hidrógeno específico de una molécula es asociado con otro átomo de una segunda molécula (oxígeno, nitrógeno etc.); los enlaces hidrofóbicos se dan cuando grupos no polares se asocian a otros similares en solución acuosa eliminandose por separación de fases; los enlaces hidrofóbicos están lejos de ser los más importantes en la bioadhesión (Longer y Robinson, 1986). Existen pues, teorías aceptadas que explican cómo se dan las uniones en una bioadhesión, pero para tratar de explicar el mecanismo de separación entre ambas superficies tenemos las siguientes teorías:

Teoría de la Fractura. Esta teoría intenta explicar la

dificultad de separación de dos superficies después de la adhesión, debido a la fuerza de enlace adhesiva. La fuerza de fractura σ , equivalente a la fuerza de enlace de bioadhesión puede ser calculada por la siguiente ecuación (Horn et al., 1986):

$$\sigma = \sqrt{\frac{E\epsilon}{L}}$$

donde:

σ = fuerza de enlace de bioadhesión.

E = módulos de elasticidad de Young.

ϵ = energía de fractura.

L = longitud crítica de ruptura (sobre la separación de las superficies).

De este modo, la rigidez del material (por ejemplo el módulo elástico), puede ser usada como medida de bioadhesión. Esta teoría asume que en un experimento de separación, las fallas de un enlace bioadhesivo, ocurren exactamente en la interfase; sin embargo, esto casi nunca sucede (Duchene et al., 1988).

Teoría de fractura e interpenetración. Recientemente, Peppas y colaboradores (1986), mostraron que la bioadhesión resulta de la interacción entre la teoría de la unión química de grupos funcionales de polímeros (ácido poliacrílico) y el moco en su interfase; y la teoría de la interpenetración de cadenas de polímeros en el moco. Además, el tiempo de relajación de las

cadenas de polímeros, determinado por análisis dinámico, es un buen indicador del comportamiento bioadhesivo del polímero. La ruptura no ocurre en la interfase entre el polímero y el moco, por el contrario es dentro del moco.

Métodos para el estudio de la bioadhesión:

Para clasificar polímeros y evaluar preparaciones bioadhesivas, se describen a continuación diferentes métodos empleados para el estudio de la bioadhesión:

El primer método para el estudio de la bioadhesión, consiste en un análisis de las modificaciones de células epiteliales cultivadas in vitro durante la interpenetración de moléculas poliméricas, consiste en una prueba con un pireno fluorescente liposoluble, localizado en la zona lipídica de la membrana celular, que se adiciona a una suspensión de cultivo celular epitelial conjuntival. Al adicionar el polímero, este se enlaza con la membrana celular, resultando una compresión de la capa celular lipídica, causando un cambio en la fluorescencia, proporcional a la cantidad de polímero enlazado. La interpenetración de moléculas de polímero, provoca la disminución de fluorescencia, debido a la unión del polímero en la membrana celular. Este método tiene el problema de no ser selectivo, ya que existe adhesión en la superficie del recipiente, falseando los resultados.

Estudio de adhesión sobre un medio artificial: En 1984 se desarrolló un método similar al anterior, el cual es una modificación del método de Wilhelmy para la medida de la tensión superficial, este método consiste en sacar por medio de una microbalanza con hilo metálico, una varilla de vidrio inmersa en una solución del polímero en agua y midiendo la fuerza generada (Smart et al., 1984). Contando con problemas similares al anterior. Un método similar a este con variaciones en el sistema de tensión de la varilla inmersa propuesto por Nagai (Duchene et al. 1988), presenta problemas al no ser representativo por colocar el moco en solución introduciendo en el una varilla de vidrio que presenta al polímero en la superficie.

Un método interesante y diferente a los anteriormente realizados; consiste en un canal de 15 cm de largo y 4 cm de ancho en donde coloca una solución de mucina, gel o moco natural, haciendo circular una cantidad de polímero que por diferencia de peso se conoce el que permanece adherido (Peppas y Mykos, 1986), este método presenta el problema de medir indirectamente la cantidad de polímero adherido y no nos da un valor de la fuerza con la que se está llevando a cabo la adhesión; los mismos problemas presenta el aparato propuesto por Gurny, siguiendo el mismo principio con algunas variantes (Duchene et al., 1988).

Estudio de la bioadhesión in vitro.

Nagai fue probablemente el primero en describir un aparato con

el propósito de medir la bioadhesividad de una forma farmacéutica sólida sobre la mucosa oral (Duchene et al., 1988). El aparato requiere el uso de membrana peritoneal de ratón sobre la cual es fijada la tableta durante diez minutos y luego es separada utilizando una balanza de resorte. Sin embargo esta balanza no es muy sensible y no permite un control preciso sobre la fuerza aplicada.

Un método bastante similar que ya empezaba a dar lecturas de fuerza, coloca polvo de polímero prehumectado entre dos tejidos, la balanza da lecturas de la fuerza con que ambos tejidos se unen al polímero, teniendo problemas de estiramiento (Ch'ng et al., 1985). Otro sistema similar al de Nagai (Duchene et al., 1988), mide la fuerza de unión entre dos tejidos sostenidos por abrazaderas a un sistema de tensión, presentando el mismo tipo de problemas. Un método diferente utilizado por Salole (Al-Dujaili y Salole, 1986), empleó un segmento de esófago de cerdo el cual se colocó en un medio salino oxigenado a 37°C, y sobre dicho tejido se hizo deslizar una forma farmacéutica sólida midiendo el esfuerzo que esto implicaba. Este aparato aunque se pudiera acercar a lo que sucede biológicamente, no nos da una lectura de fuerza de adhesión sino de trabajo de adhesión con el que un polímero se une a la mucosa intestinal.

Un nuevo método conocido como "coloración de la membrana con oro" utilizado para la comparación de propiedades mucoadhesivas de varios hidrogeles utiliza partículas coloidales rojas de oro las

cuales son estabilizadas por las moléculas de mucina; y que al interactuar con el hidrogel se libera el coloide de oro dando una coloración roja que es proporcional al número de partículas que interactúan (Park, 1989). Sin embargo, este método tiene el inconveniente de que no da lecturas de fuerza de adhesión, además de que las mucinas utilizadas pueden no representar exactamente a las moléculas de mucina de la capa de mucina in vivo.

Métodos de medición in vivo. El método más importante desarrollado in vivo, se hizo en rata, a la que después de anestesiada y de hacerle una incisión abdominal, se le abrió el estómago a lo largo unos milímetros, se le colocó dentro de éste una tableta de polímero, marcada con ^{51}Cr , y después de cerrar el estómago y volverlo a colocar en la cavidad abdominal se llenó de solución salina; (Ch'ng y col., 1985); todo esto implica condiciones muy distintas a las fisiológicas naturales y no nos proporciona buenos indicios de la fuerza de unión.

La interpretación de los resultados en pruebas de bioadhesión no siempre es fácil; Robinson ha concluido que los polímeros polianiónicos son mejores que los policatiónicos y las razones o criterios de selección están en base a su fuerza de adhesión y a su toxicidad (Longer y Robinson, 1986). De forma ideal, un bioadhesivo debe cumplir con las siguientes propiedades (Duchene et al., 1988):

- a.- No debe ser tóxico.
- b.- No debe absorberse en el tracto gastrointestinal (TGI).

- c.- Debe formar preferentemente enlaces no covalentes con las superficies epiteliales de las mucosas.
- d.- Tener una rápida adhesión a los tejidos.
- e.- Permitir la fácil incorporación de principios activos (para uso farmacéutico).
- f.- Ser accesible y económico.

Entre los más importantes bioadhesivos que exhiben estas características, encontramos al carbopol (carboxipolimetileno), policarbofil, carboximetilcelulosa, goma de tragacanto y alginato de sodio; siendo el carbopol 934 uno de los materiales con mayor capacidad bioadhesiva y baja toxicidad (Smart et al., 1984) además de ser fácil de conseguir en México.

El trabajo de investigación fue encaminado a proponer un nuevo método para medir bioadhesión de polímeros a mucosas (utilizando como materiales de prueba a el carbopol 934 y mucosa del tracto gastrointestinal respectivamente), por medio de una balanza de torsión modificada para hacer las mediciones, la balanza es un Tensiómetro de DuNouy que fue diseñado originalmente para medir la tensión superficial de líquidos por medio de un anillo sostenido al brazo de tensión, dicho anillo fue sustituido por una placa metálica a la cual se unieron fragmentos de pared gastrointestinal con la capa mucosa hacia el exterior y que sirvieron también como presión en contra de una tableta de polímero. El tensiómetro así adaptado resultó ser de fácil manejo, además de que se pueden obtener diferentes sensibilidades al variar el calibre del alambre utilizado.

II. MATERIAL Y METODOS

II.1. Tensiómetro de Du Noüy.

El tensiómetro de Du Noüy es un instrumento muy preciso para la determinación de la tensión superficial de líquidos (Crockford et al., 1975). El método es de fácil manejo, sencillo en su forma y se obtienen lecturas rápidas y directas; las diversas partes del aparato se muestran en la figura 1.

II.2.- Adaptación del tensiómetro de Du Noüy.

Como se señaló con anterioridad el tensiómetro de Du Noüy sirve para medir la tensión superficial de líquidos, y se pensó que podría servir para medir la fuerza de adhesión de polímeros a mucosa, por lo que se modificó para este fin. Debido a que el anillo original del tensiómetro no tiene una superficie plana sobre la cual sujetar la membrana gastrointestinal se tuvo que adaptar una platina de plata en lugar del anillo original, y un soporte plástico (con un orificio central de un cm de diámetro). Ambos tenían una base cuadrada de 2.2 cm y dos perforaciones en cada una de las esquinas, (figura 2). En medio de la platina y el soporte se introducía el fragmento de pared intestinal con la mucosa expuesta, la cual se aseguraba con unas grapas. A fin de colocar las diferentes pesas utilizadas para la calibración y validar el tensiómetro para nuestros fines, se suspendió una canastilla de tela de Nylon sujeta con las grapas antes mencionadas.

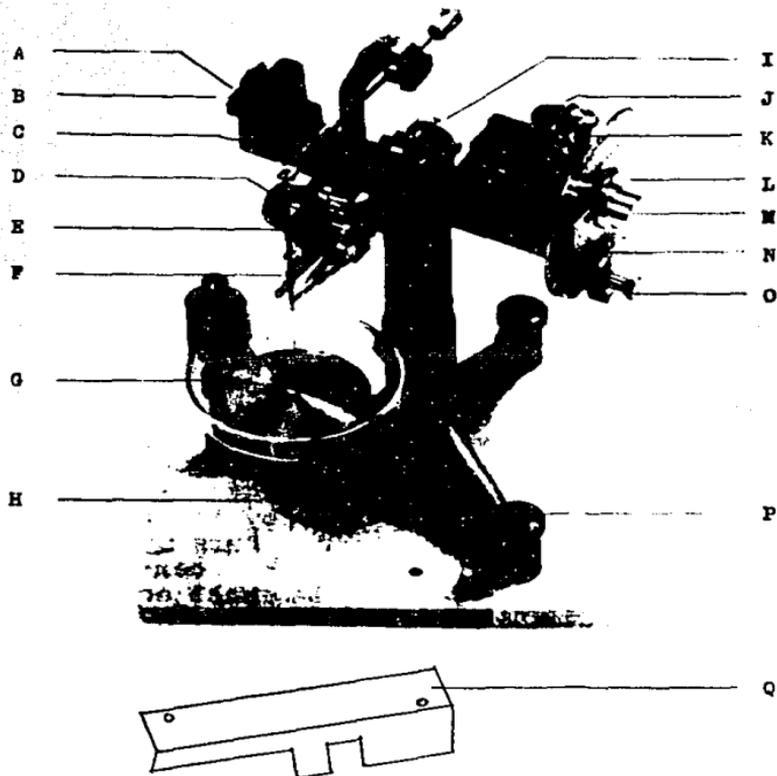


Figura 1. Tensiómetro de Du Noüy. A Tornillo que mantiene sujeto el alambre de torsión. B Soporte posterior unido por una abrazadera. C Brazo de torsión. D Índice (o línea negra que cruza diametralmente el espejo). E Topes ajustables al movimiento del brazo de torsión. F Gancho del brazo de torsión. G Plataforma metálica, sostén de la muestra. H Tornillo que controla la altura de la plataforma. I Tuerca de ajuste para precisión. J Perilla reguladora de la tensión sobre el alambre. K Tornillo de ajuste fino del cuadrante. L Cuadrante. M Tapa de la abrazadera que sujeta el alambre de torsión. N Vernier. O Tornillo que sujeta el cuadrante. P Tornillo para ajuste de nivel. Q Tapa de protección al alambre de torsión.

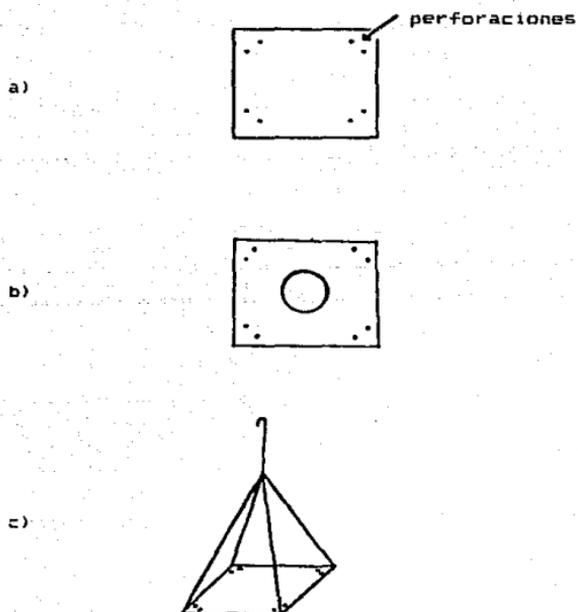


Figura 2. Vista esquemática de la platina adaptada. a) vista frontal de la base de la platina; b) vista frontal del soporte plástico; c) vista lateral del artefacto.

II.3.-Calibración y Validación del Aparato.

Con las pesas de referencia (cuyos pesos eran 0.9850, 1.9945, 2.0293, 4.9953, 5.0048 gramos; marcadas como pesas 1, 2, 3, 4, 5, respectivamente; calibradas por la Dirección General de Normas) se ensayaron combinaciones para acercarse lo más posible a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8 gramos y éstas masas fueron convertidas en dinas al multiplicarlas por la constante gravitacional (981 cm/s^2), (ver tabla 1). Una vez colocada la canastilla en la platina, el tornillo de precisión se movió hasta que el índice del aparato coincidió con la línea negra horizontal que cruza diametralmente el espejo. Después, el dial se hizo coincidir con el cero fijado. Posteriormente, se suspendió el peso elegido, se giró el dial hasta que el indicador coincidió con el índice y se tomó la lectura con respecto a la escala Vernier.

Tabla 1. Pesos obtenidos al combinar las diferentes pesas.

Combinación	Pesa No	masa(gramos)	dinas
a	1	0.9850	966.29
b	2	1.9945	1956.60
c	1 y 3	3.0143	2957.03
d	2 y 3	4.0238	3947.35
e	4	4.9953	4900.39
f	1 y 5	5.9898	5875.99
g	2 y 5	6.9993	6866.31
h	1, 2 y 5	7.9843	7832.60

Para obtener la curva de calibración y evaluar la reproducibilidad, cada combinación fue realizada por sextuplicado en una forma totalmente aleatoria, se trabajó en diferentes días y por dos analistas, en un diseño factorial totalmente al azar (2X2X8). Para profundizar en el análisis estadístico de la validación ver el apéndice I.

Linearidad.

Para la evaluación de la linealidad del aparato se analizaron por triplicado cinco diferentes pesos (966.29, 1990.74, 3947.35, 4909.71 y 6891.13 dn.).

Precisión y exactitud.

Para determinar estos parámetros se realizaron diez mediciones a un peso de 1990.74 dn. Se obtuvo el coeficiente de variación para evaluar la precisión y se les aplicó una prueba t de Student para estimar la exactitud.

II.4.-Soluciones.

a) Amortiguador de fosfatos Sorensen pH 6.- Se disolvieron 27.22 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) en agua destilada y se aforo a 1000 ml. El pH se ajustó hasta 6.0 ± 0.1

b) Fluido gástrico simulado sin enzimas (USP XXII - NF XVII) Se disolvieron 2 g de cloruro de sodio en 7 ml de ácido clorhídrico

y se aforó a 1000 ml. El pH se ajustó a 1.2.

c) Fluido intestinal simulado sin enzimas (USP XXII - NF XVII) Se disolvió 6.8 g de fosfato de potasio monobásico en 250 ml de agua. El pH se ajustó a 7.5 ± 0.1 y se aforó a 1000 ml.

II.5.- Elaboración de tabletas de Carbopol 934.

Se elaboró un lote de tabletas de carbopol 934 por medio de compresión directa (en una tableteadora multipunzónica YU LEE modelo CY-RT-11). Las tabletas obtenidas tuvieron las siguientes características.

peso medio = 0.25 g

Dureza = 9.2 unidades Stock

Diámetro = 1 cm

II.6.- Obtención de la mucosa gastrointestinal (GI)

Ratas albinas adultas, de ambos sexos, con régimen alimenticio normal, con un peso entre 200 y 300 g; fueron anestesiadas con cloroformo y sacrificadas por desnucación. Se disectó el estómago y el intestino y se colocaron en amortiguador de fosfatos Sørensen (pH 6.0). Se obtuvieron fracciones de estómago, duodeno y yeyuno de 3 cm de longitud cada una, y se cortaron longitudinalmente. Las fracciones de estómago se enjuagaron en fluido gástrico simulado (FGS), y las de intestino se enjuagaron en fluido intestinal simulado según la USP XXII; NF XVII; sin enzimas.

II.7.- Medición de la fuerza de adhesión a la mucosa.

El fragmento de pared intestinal previamente lavado se colocó en la base de la platina con la mucosa hacia la cara libre y se sujetó por medio del soporte plástico y de grapas por los cuatro lados. La tableta se humectó por inmersión de una de sus caras en FIS para prueba de adhesión a intestino y a FGS para prueba de adhesión a estómago, durante diez minutos y luego fué puesta sobre la plataforma metálica del tensiómetro donde se sujetó por medio de pinzas, como se ve en la figura 3. Una vez fijos ambos materiales se hizo subir la plataforma metálica hasta poner en contacto la tableta con la mucosa, y el nivelador sobrepasó la raya del espejo, dejándose así 30 segundos. Después de esto, se bajó la base metálica hasta que el nivelador coincidió con la raya del espejo, se comenzó a dar vuelta al dial a una velocidad de 0.5 unidades/seg. Al momento que se desprendió la membrana de la tableta se dejó de girar el dial y se tomó la lectura como se describió anteriormente.

II.8.- Determinación de la influencia del tiempo de humectación.

Las tabletas de Carbopol 934 fueron humectadas por diferentes tiempos en una de sus caras en agua destilada (pH 5.5), y luego se midió su adhesión a membrana duodenal. Los tiempos probados fueron; 0, 3, 5, 7.5, 10, 12.5 y 15 minutos.

II.9.-Determinación de la influencia del área expuesta a diferentes porciones del tracto gastrointestinal.

La relación entre el área superficial expuesta y la fuerza de adhesión del polímero a la mucosa gastrointestinal de rata se determinó a partir de secciones planas de comprimidos del polímero de diferente área (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, y 0.79 cm^2), obtenidas rebajando cada comprimido. Para determinar si existían diferencias significativas en la fuerza de adhesión en las diferentes porciones del tracto gastrointestinal, dichas

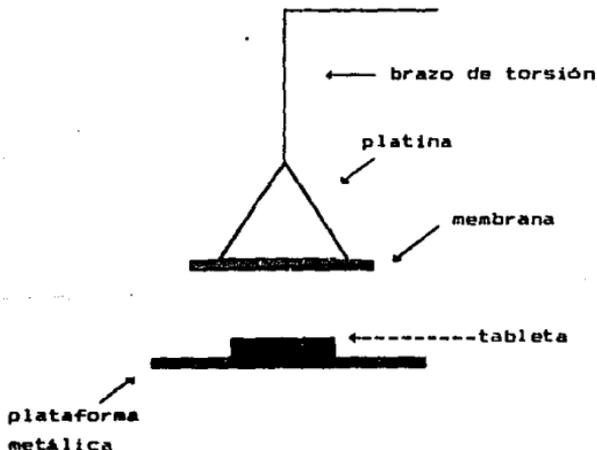


Figura 3. Esquema que representa la manera de poner en contacto la membrana con el polímero.

mediciones fueron evaluadas con la región fúndica , duodeno y yeyuno de ratas. Las tabletas fueron prehumectadas durante 10 minutos con fluido gástrico o intestinal simulado (sin enzimas) dependiendo de la porción trabajada.

II.10.- Elaboración de micronizados.

a) Elaboración de la placa de polímero.

Se preparó una solución al 10% de carbopol 934 en agua. La solución se pasó a cajas de Petri, formando una capa uniforme con un grosor de 0.5 cm. Las cajas con la solución fueron secadas en estufa a 60°C durante 48 horas. La placa obtenida fué desprendida de la caja por medio de pinzas de disección.

b) Micronizado

La placa de polímero se granuló en seco (en un granulador ERWEKA Tipo TG25), posteriormente el granulado se sometió a molienda (molino ARTHUR H. THOMAS). El polvo se tamizó utilizando las mallas 60, 100, 200 y 325. Después de tamizar se separó el polvo por corte de malla de 60/100, 100/200 y 200/325. Dando un diámetro promedio de 164.5, 111.5, y de 59.0 μm respectivamente.

II.11.-Medición de la adhesión de micronizados a mucosa gastrointestinal.

Para el estudio de la adhesión de micronizados se utilizaron

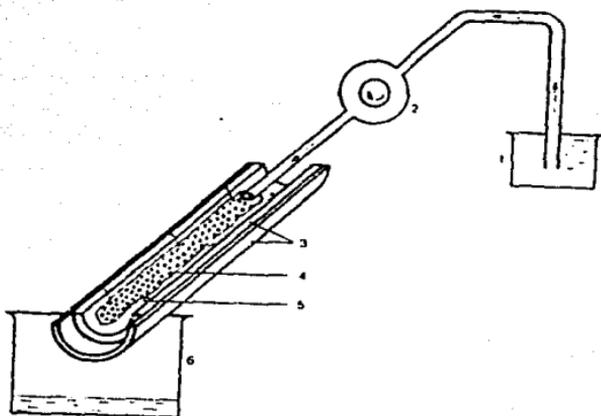


Figura 4 Diagrama del ensamble usado para probar la bioadhesión de las micropartículas. (1): matraz alimentador; (2): bomba peristáltica; (3): soporte; (4): mucosa; (5): seguro; (6): matraz colector.

duodenos de cerdos, tipo rastro, de raza Yorkshire, entre 90 y 120 kg de peso. El duodeno se cortó longitudinalmente en secciones de 20 X 3 cm y fué puesto en un soporte de PVC, extendido y sujetado con la ayuda de un seguro como se observa en la figura 4. Este soporte se utilizó como una modificación de un

aparato propuesto recientemente (Ranga y Buri, 1989). Después de esto el fragmento de duodeno se lavó con amortiguador Sørensen (pH=6.0) a una velocidad de flujo de 25 ml/min (utilizando una bomba peristáltica (Masterflex®) durante 30 minutos. Luego se enjuagó con FIS durante un minuto. Después de lavar la mucosa 100 mg de micronizado se distribuyeron uniformemente sobre la mucosa del intestino. El polvo se dejó interactuar con la mucosa durante diez minutos, posteriormente se hizo fluir FIS a una velocidad de 25 ml/min. durante diez minutos. El soporte fue puesto de tal manera que el flujo del diluyente cubriera uniformemente la membrana de 2 a 3 mm por sobre el tejido. El líquido eluido fue colectado en matraces Erlenmeyer, y después de homogeneizado se tomó una alícuota de 5 ml que se colocó en un pesafiltro y se secó a 60°C durante 72 horas. El porcentaje de polvo arrastrado fue determinado por gravimetría.

III. RESULTADOS

III.1.-Calibración y validación del aparato.

Los datos obtenidos de la validación del aparato se muestran en la tabla 6. A estos datos se les aplicó el tratamiento estadístico señalado en el apéndice I, obteniéndose los siguientes resultados:

Número de mediciones realizadas = 192
Error estándar de regresión = 0.08277
Coeficiente de determinación = 0.99995
Coeficiente de correlación = 0.99998
Suma de cuadrados de regresión = 26861.04
Suma de cuadrados del error de regresión = 1.30
Suma de cuadrados del error puro = 0.77
Suma de cuadrados de la falta de ajuste 0.54

Los cuales son resumidos en la siguiente tabla:

Tabla 2. Tabla del análisis de varianza para la curva de calibración.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F
Regresión	1	26861.04	26861.04	3920518.00
Error de regresión	190	1.30	0.0069	
Falta de ajuste	145	0.54	0.0037	0.54
Error puro	45	0.77	0.017	

Como el valor de F experimental para la regresión (1577586.42) es mayor al valor F de tablas con un grado de libertad para el numerador, y de 190 para el denominador y con un 99% de confianza ($F_{1,190,0.99} = 6.63$) y, como además el F experimental para la falta de ajuste es menor al F de tablas con 145/45 grados de libertad al 95% de confianza ($F_{145,45,0.95} = 1.51$) el modelo lineal es correcto para describir la relación entre la cantidad pesada y la lectura, tal relación la vemos en la figura 5.

Reproducibilidad y repetibilidad (del sistema de medición).

Posteriormente con los datos de la tabla 4 se realizó el análisis de varianza (diseño factorial 2X2XB completamente al azar) para evaluar la reproducibilidad y la repetibilidad, los datos obtenidos se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 3. Tabla de ANDEVA para evaluar los resultados en diferentes días y por dos analistas

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F _{exp}
Analista	1	0.0026	0.0026	0.64
Día	1	0.0151	0.0151	3.76
Error	160	0.6000	0.0040	

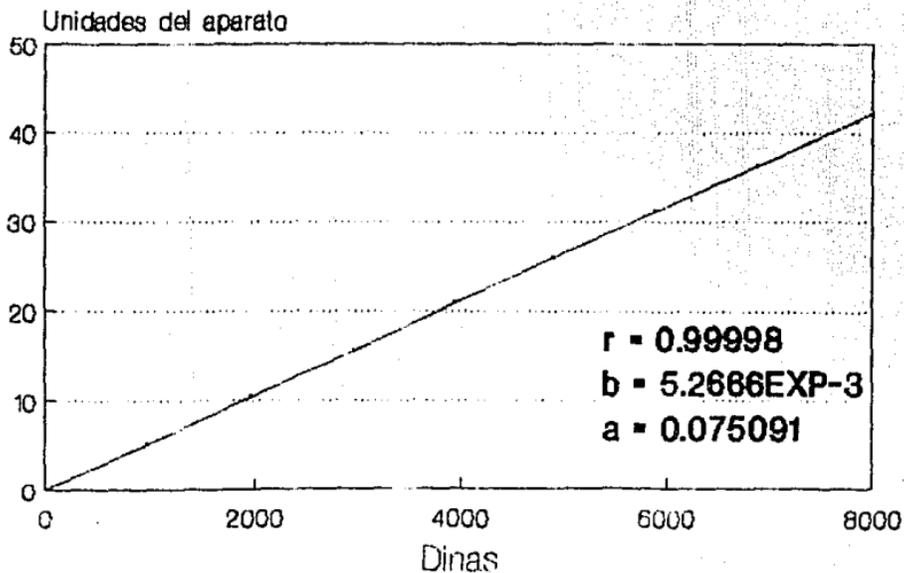


Fig. 5. Curva de calibracion de la balanza de torsion.

Tabla 4. Resultados utilizados para evaluar el modelo lineal y la reproducibilidad y repetibilidad de las mediciones del aparato realizadas en dos días y por dos diferentes investigadores.

Peso ^a	ANALISTA 1								
	a	b	c	d	e	f	g	h	
DIA 1		5.2	10.4	15.7	20.9	25.8	31.1	36.3	41.3
		5.2	10.3	15.7	20.7	25.9	31.2	36.2	41.2
		5.1	10.4	15.6	20.9	25.9	31.1	36.1	41.4
		5.1	10.4	15.8	20.8	25.9	30.9	36.3	41.3
		5.1	10.4	15.8	20.9	25.8	31.0	36.3	41.2
		5.0	10.4	15.7	20.9	25.8	31.0	36.3	41.4
	promedio	5.1	10.4	15.7	20.9	25.9	31.1	36.3	41.3
CV (%)	1.5	0.39	0.48	0.40	0.21	0.34	0.56	0.22	
Peso ^a	ANALISTA 1								
	a	b	c	d	e	f	g	h	
DIA 2		5.0	10.4	15.7	20.8	25.9	31.1	36.2	41.2
		5.1	10.4	15.8	20.7	25.9	31.2	36.2	41.3
		5.1	10.3	15.7	20.8	25.9	31.2	36.2	41.2
		5.1	10.4	15.7	20.9	25.8	31.1	36.2	41.1
		5.2	10.3	15.7	20.9	25.9	31.2	36.2	41.3
		5.1	10.3	15.8	20.9	25.9	31.1	36.3	41.2
	promedio	5.1	10.4	15.7	20.8	25.9	31.2	36.2	41.2
CV (%)	1.2	0.53	0.33	0.40	0.16	0.18	0.11	0.18	
Peso ^a	ANALISTA 2								
	a	b	c	d	e	f	g	h	
DIA 1		5.2	10.4	15.7	20.9	25.8	31.1	36.3	41.3
		5.2	10.4	15.6	20.7	25.8	31.1	36.2	41.2
		5.1	10.4	15.7	20.8	25.9	31.1	36.2	41.3
		5.2	10.4	15.7	20.9	25.9	31.1	36.3	41.2
		5.1	10.4	15.7	20.9	25.8	31.1	36.2	41.3
		5.2	10.4	15.6	20.9	25.8	31.2	36.3	41.3
	promedio	5.2	10.4	15.7	20.9	25.8	31.1	36.3	41.3
CV (%)	1.2	0.61	0.33	0.36	0.20	0.18	0.14	0.13	
Peso ^a	ANALISTA 2								
	a	b	c	d	e	f	g	h	
DIA 2		5.1	10.3	15.7	20.7	25.8	31.1	36.2	41.2
		5.1	10.3	15.6	20.8	25.8	31.2	36.2	41.2
		5.1	10.4	15.7	20.9	25.8	31.2	36.2	41.3
		5.0	10.3	15.7	20.7	25.8	31.2	36.3	41.2
		5.1	10.2	15.6	20.8	25.9	31.1	36.2	41.3
		5.2	10.3	15.7	20.8	25.9	31.1	36.3	41.2
	promedios	5.1	10.3	15.7	20.8	25.8	31.2	36.2	41.2
CV (%)	1.2	0.61	0.33	0.36	0.20	0.18	0.14	0.13	

^aLos pesos son los descritos por el método.

El F de tablas tanto para el factor analista como para el factor día tiene un grado de libertad para el numerador, y 160 grados de libertad para el denominador, con un nivel de confianza de 95%; y tiene un valor de 3.90. Como el F anterior es mayor a los valores de F experimentales tanto para el factor día como para el factor analista se dice que hay reproducibilidad entre analistas y entre días.

Finalmente se encontró un límite de detección de 0.1011 unidades del aparato, una cantidad mínima cuantificable de 11.9 Días y una sensibilidad de 0.0636 Días. (Las fórmulas usadas se encuentran en el apéndice).

Linealidad (Barron y Garzón, 1991).

A partir de los datos de la tabla 5 se determinaron los parámetros estadísticos para la curva recta a partir del método de mínimos cuadrados, los cuales se muestran a continuación:

Número total de datos = 15

Coefficiente de correlación = 0.99998

Coefficiente de determinación = 0.99996

Pendiente = 1.0027

Intercepto = -10.4937

Valor experimental t de Student para la pendiente = 1.6018

Valor experimental t de Student para el intercepto = 1.4682

Valor teórico de t de Student con 13 grados de libertad y un nivel de significancia de 0.05 = 2.1604

Ya que el valor del coeficiente de correlación es muy cercano a la unidad y como los valores de F experimentales son menores al valor de F de tablas estadísticamente se puede decir que el método es lineal.

Tabla 5. Resultados utilizados para determinar la linealidad del método.

Peso Adicionado	Peso Determinado ^a	DE	CV(%)
966.29	968.68	10.96	0.01
1990.74	1981.23	0	0
3947.35	3943.03	10.96	0.01
4909.71	4898.62	10.96	0.01
6891.13	6911.06	10.96	0.01

^a Promedio de tres determinaciones.

Precisión y exactitud.

Para evaluar la precisión y la exactitud del procedimiento se realizaron diez mediciones a un peso de 1990.74 dinas; los valores de las mediciones son los siguientes:

- | | |
|-------------|--------------|
| 1.- 1981.23 | 6.- 1981.23 |
| 2.- 1981.23 | 7.- 1998.47 |
| 3.- 1981.23 | 8.- 1981.23 |
| 4.- 1998.47 | 9.- 1981.23 |
| 5.- 1998.47 | 10.- 1998.47 |

Y sus respectivos parámetros estadísticos fueron:

Promedio = 1988.13

Desviación estándar = 8.90

Coefficiente de variación = 0.4478

Valor experimental t de Student = -0.9285

Valor teórico de t de Student = 2.2622

Con lo cual como el valor absoluto del t experimental es menor al valor t de tablas se dice que estadísticamente el método es exacto para esa determinación. Además el coeficiente de variación es mucho menor a uno por lo que se puede decir que el método es preciso.

III.2.-Resultados de la influencia del tiempo de humectación sobre la adhesión.

En la tabla 6 se presentan los resultados obtenidos. El comportamiento de adhesión se puede observar en la figura 6, en la cual se observa que aún sin humectar la tableta presentó una fuerza de adhesión, la cual fué aumentando hasta llegar a una meseta entre 2 y 7 minutos, posteriormente aumentó hasta llegar a un máximo en aproximadamente 10 minutos, para después empezar a descender.

Tabla 6. Resultados de la fuerza de adhesión (en dinas) contra el tiempo de humectación en duodeno.

Tableta	Tiempo de humectación (minutos)							
	0	1	3	5	7.5	10	12.5	15
A	3593.3	6631.3	5681.9	5871.8	5928.8	8340.2	5264.2	2871.8
B	3783.2	6916.1	5871.8	5321.1	5435.1	8188.3	6099.7	2663.0
C	4618.7	5681.9	6821.2	5302.2	7181.9	8738.9	5549.0	2435.1
Promedio	3992.1	6403.5	6118.7	5492.1	6175.5	8606.0	5644.0	2663.0
C. V. (%)	13.6	10.1	9.9	5.9	14.5	2.7	7.5	8.2

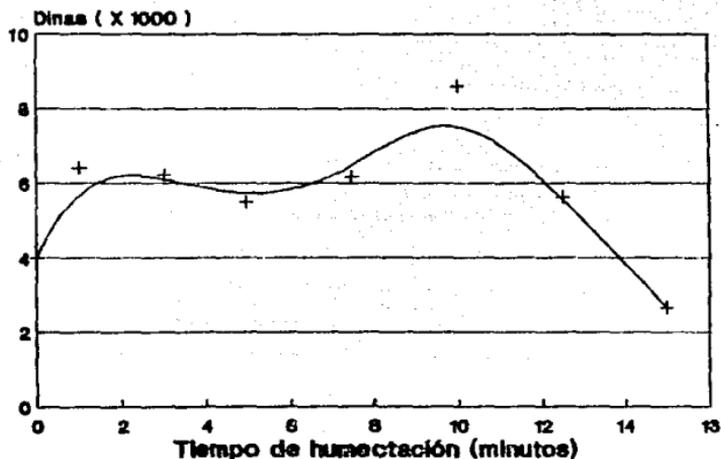


Figura 6.-Gráfica que presenta la fuerza de adhesión vs el tiempo de humectación.

III.3.-Fuerza de adhesión a diferentes porciones del TGI.

Los resultados obtenidos al exponer las diferentes áreas de los comprimidos a las diferentes porciones del tracto gastrointestinal se muestran en la tabla 7, y podemos verlos en las figuras 7, 8, y 9. El comportamiento de adhesión respecto al área expuesta es lineal como puede constatarse por los

Tabla 7. Resultados de la fuerza de adhesión (en dinas) en diferentes porciones del TGI.

Porción del TGI	Área expuesta (cm ²)							
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.79
Fondo gástrico	992.10	1219.96	1485.69	2093.42	2682.05	3080.80	3631.45	4732.77
-	840.20	1219.96	1409.84	2625.08	3403.60	3403.60	3498.54	5112.53
x	916.15	1409.84	935.14	2340.26	3004.85	2947.88	3365.62	6061.94
CV (%)	8.29	8.54	23.37	11.30	11.93	7.54	3.80	12.91
Duodeno	992.10	1219.96	1523.77	1403.53	3042.82	3593.48	4390.98	5777.11
-	916.15	1371.87	1599.72	2264.31	2644.07	3422.58	3579.49	4561.87
x	1106.03	1144.01	1599.72	2207.34	2508.1	3688.42	3270.68	5169.91
CV (%)	1004.76	1245.28	1574.40	1958.39	2731.67	3144.09	3499.54	5302.41
Yeyuno	840.20	1125.02	1675.68	2340.26	2928.89	4068.18	4163.12	5682.17
-	1030.08	1219.96	1922.52	2549.13	3080.80	3593.48	4542.88	6631.58
x	1125.02	1466.81	1599.72	2188.36	2814.96	3023.83	3460.56	4466.93
CV (%)	998.43	1270.60	1732.64	2359.25	2941.55	3561.83	4055.52	5593.56
	14.53	13.89	9.74	7.68	4.53	14.68	13.54	19.40

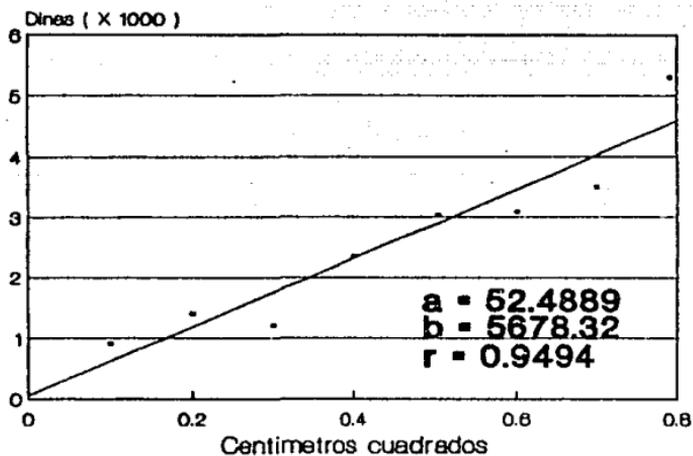


Fig. 7. Fuerza de adhesión vs. área expuesta (fondo gástrico).

Cada punto representan el promedio de 5 determinaciones

realizadas con mucosa gastrointestinal de rata).

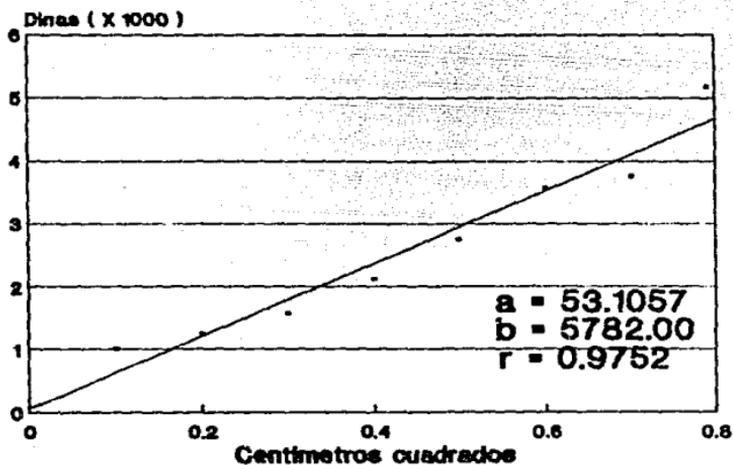


Fig. B. Fuerza de adhesión vs. área expuesta (duodeno).

*Los puntos representan el promedio de 6 determinaciones
realizadas con mucosa gastrointestinal de rata.*

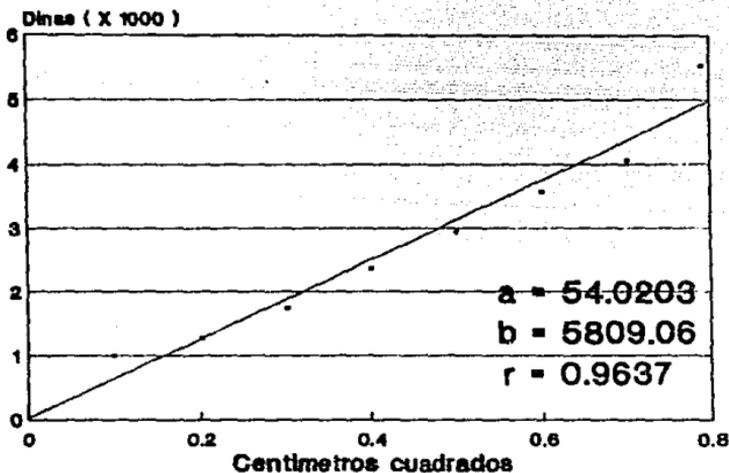


Fig. 9. Fuerza de adhesión vs. área expuesta (yeyuno).

(Los puntos representan el promedio de 6 determinaciones

realizadas con mucosa gastrointestinal de rata).

coeficientes de correlación obtenidos , los cuales fueron (respectivamente para el fondo gástrico, duodeno y yeyuno):

$$Y = 52.4889 + 5678.32 X \quad r = 0.9494$$

$$Y = 53.1057 + 5782.00 X \quad r = 0.9752$$

$$Y = 54.0203 + 5809.06 X \quad r = 0.9637$$

Donde Y es la fuerza de adhesión en dinas y X es el Área expuesta en cm^2 .

III.4.- Resultados de la adhesión de micronizados a mucosa GI.

Los resultados obtenidos por los tres diferentes tamaños de partícula sobre el duodeno de cerdo los podemos observar en la tabla 8. A estos datos se les aplicó un análisis de varianza (diseño de bloques completos aleatorizados), encontrándose que no existía diferencia entre las diversas unidades experimentales (duodenos de cerdo) usadas pero si hubo una diferencia significativa entre los diversos tamaños de partícula, siendo mayor la cantidad adherida para el menor tamaño de partícula usado, en segundo término el tamaño de partícula intermedio y el por ciento menor para el tamaño de partícula mayor. Esto se ve en la figura 10.

Tabla B. Resultados del porcentaje adherido de carbopol 934 (micronizado) a el duodeno de cerdo.

Tamaño de partícula (μm)	Cerdo			Promedio
	1	2	3	
59.0	65	65	65	65
	60	65	75	
	65	65	65	
	(4.56)	(10.00)	(8.45)	
111.5	55	60	65	56
	60	60	55	
	50	55	45	
	(9.09)	(4.95)	(18.18)	
164.5	35	45	50	45
	50	40	45	
	45	50	45	
	(17.63)	(11.11)	(6.19)	

Los datos entre paréntesis son el coeficiente de variación.

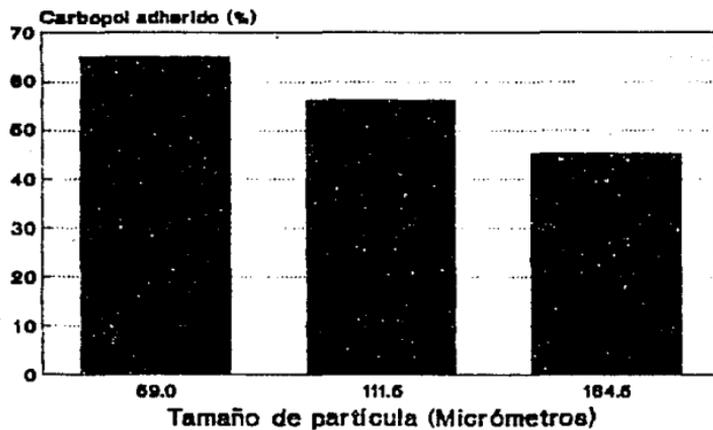


Figura 10. Gráfica de porcentaje de carbopol adherido vs el tamaño de partícula.

IV. DISCUSION

A los datos de la tabla 4 se les aplicó un análisis de regresión y correlación (por el método de mínimos cuadrados) para el modelo lineal, logarítmico y exponencial. Sin embargo el modelo lineal fué el que mejor se ajustó. A partir del coeficiente de correlación (0.9999) puede deducirse que el modelo lineal es confiable y que la balanza de torsión utilizada permite obtener datos directamente proporcionales en el rango de 176 a 8000 dinas (tomando en cuenta que una unidad del aparato corresponde aproximadamente a 175.86 dinas). Lo anterior es apoyado además por el análisis de varianza realizado a los mismos datos (ver tabla 2). En la figura 6 podemos apreciar a partir de la relación tiempo de humectación contra dinas, que al mantener el área de exposición constante y variar el tiempo de humectación, se tiene un comportamiento que puede ser explicado de la siguiente forma:

- A un tiempo de humectación cero observamos lectura, sin embargo, en realidad tiempo cero es un tiempo de contacto de 30 segundos, tiempo en el cual el polímero se pudo humectar -sin llegar a relajarse- y de esta manera la fuerza de adhesión en este punto se pudo deber a : 1) la presión con que se pusieron en contacto la tableta y la mucosa; y a 2) lo que técnicamente se le ha denominado punto de fatiga y depende de la penetración de la mucosa y/o probablemente de las fuerzas electrostáticas entre los grupos carboxilo del carbopol y oligosacáridos de la mucosa en la interfase (Longer, y Robinson, 1986).

La disminución en la fuerza de adhesión presentada entre los 1 a 5 minutos puede deberse a la eliminación de las interacciones electrostáticas interfaciales, producto del agua presente, aunque esta última no haya sido la suficiente hasta ahora como para elevar por sí sola la fuerza de adhesión.

A partir de los 5 minutos, la cantidad de polímero relajado permite una máxima interpenetración con un probable cambio de la viscosidad de las regiones en contacto, lo cual dificulta la separación (Longer y Robinson 1986; Pimienta et al., 1990)

A los 10 minutos de humectación se encuentra la máxima fuerza de adhesión; en esta fase las cadenas del polímero están relajadas y pueden penetrar el moco por lo que la fuerza de adhesión se va a deber a la sumatoria de las fuerzas que actúan aquí, así como las tensiones interfaciales, interpenetración polímero-moco y muy posiblemente interacciones de tipo fisicoquímico.

Finalmente, después de los diez minutos se vio un marcado descenso en la fuerza de adhesión. Esto puede ser explicado por el hecho de que después de que las cadenas se relajan presentan el paso siguiente - disolución-, y conforme aumenta el tiempo el número de cadenas disueltas aumenta (Kratochvil, 1986) y consecuentemente la fuerza de adhesión cae aún más, hasta el punto límite que queda demarcado como aquel en el que la adhesión polímero mucosa únicamente es debida a la tensión interfacial entre el polímero y la solución del polímero-liquido GI (ver fig. 11).

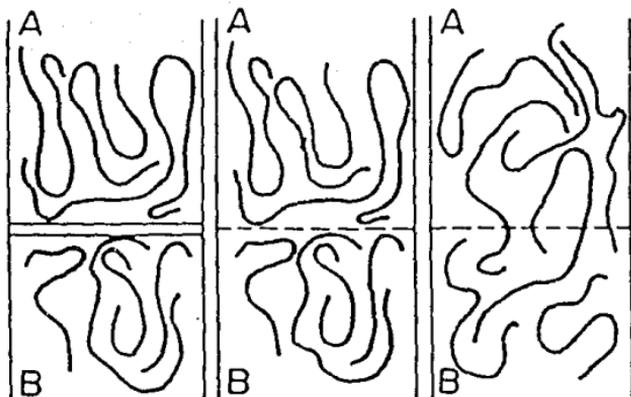


Figura 11. Representación de la interpenetración conforme aumenta la cantidad de polímero disuelto. De izquierda a derecha observe como se van relajando las cadenas del polímero (A) y empiezan a interpenetrarse mutuamente con las cadenas de glicoproteínas del moco (B).

Tras haber hecho la comparación estadística acerca de la bioadhesión del carbopol en diferentes porciones del tracto gastrointestinal de la rata, se obtuvo que no existía diferencia significativa, aun cuando en reportes anteriores se menciona que en el fondo gástrico se obtiene la mejor adhesión del carbopol a la mucosa (Smaert et al., 1984).

Por otra parte se ha demostrado, que la adhesión del carbopol a la mucosa gastrointestinal se ve influida por el pH del medio. Por un lado el hinchamiento del polímero al ser humectado en diferente pH muestra un comportamiento sigmoidico en donde un mínimo de hinchamiento se presenta en valores de pH de 1 a 3, y el máximo hacia pH 7. Un comportamiento sigmoidico similar se encuentra en el caso de la fuerza requerida para desprender el carbopol a una sección de mucosa cuando se varía el pH del medio, solo que en este caso la adhesión es máxima en valores de 1 a 3 y mínima hacia pH de 7 (Lejoyeux et al., 1989).

Tomando en cuenta que en nuestra experiencia las tabletas de carbopol fueron pre-humectadas en fluido gástrico simulado y fluido intestinal simulado (pH de 1.5 y 7.5), y que el tiempo óptimo de humectación del polímero fué calculado en agua destilada, la cual presentaba un pH de 5.5 (punto en donde el comportamiento de adhesión e hinchamiento del polímero se encuentran cercanos al centro de las curvas sigmoideas), puede suponerse que en el caso de la humectación a pH de 1.5 el tiempo requerido para la relajación de las cadenas del polímero no fué el suficiente y esto ocasionó una menor adhesión de las tabletas

a la mucosa estomacal, provocando que no se encontrara diferencia significativa entre las diferentes porciones del tracto gastrointestinal. Debe tomarse en cuenta también la variación biológica en los animales, y el tratamiento previo de lavado de mucosa con soluciones salinas, el cual puede afectar la cantidad de moco presente en la superficie de la sección de tejido utilizada y por lo tanto causar variación de los resultados.

Con lo que respecta a el comportamiento de adhesión con relación al área expuesta se ve que sigue una tendencia lineal (figs.7, 8 y 9), en las tres porciones probadas del TGI. Los coeficientes de correlación obtenidos, considerando que se trabajó con material biológico, son bastante aceptables. Por otra parte esta tendencia lineal demuestra que la fuerza de adhesión es directamente proporcional al área expuesta.

De acuerdo a la figura 10, se observa una cantidad mayor de polímero adherida con el tamaño de partícula más pequeña (59 μm), lo cual está totalmente de acuerdo con los resultados obtenidos con anterioridad (Otsuka et al., 1988), ya que al variar el área efectiva aumenta la fuerza de adhesión.

V. CONCLUSIONES

- El método propuesto para la determinación de la fuerza de adhesión de tabletas de polímeros bioadhesivos a secciones de mucosa gastrointestinal, demostró ser sensible, versátil y de sencilla utilización y puede ser aplicado para la investigación de bioadhesión en polímeros de nueva síntesis.

- El aparato resultó ser preciso, exacto, lineal y además tuvo reproducibilidad entre días y entre analistas.

-En cuanto a la fuerza de adhesión no se encontró, diferencia en la bioadhesividad del carbopol entre 0.1 y 0.79 cm² en las diferentes porciones del TGI (fondo gástrico, duodeno y yeyuno), de rata.

- La bioadhesividad cambia con respecto al tiempo humectación. Esto tiene importancia para formulaciones orales, ya que puede ser necesaria una humectación previa a la deglución.

-El tiempo de humectación óptimo para el Carbopol 934 en agua destilada resultó ser de 10 minutos.

-La bioadhesión máxima de Carbopol a una sección de intestino de cerdo se encontró con el tamaño de partícula más pequeño (59 μm).

Apéndice I.

Análisis estadístico de la validación (Ostle, 1988; Daniel, 1990).

Calibración.

Se registraron y tabularon las lecturas correspondientes a cada peso, considerando como valor "x" a los pesos y como valor "y" a las lecturas obtenidas, con estas lecturas se realizó una regresión por mínimos cuadrados, donde:

-Pendiente.

$$m = (n\sum xy - \sum x \sum y) / (n\sum x^2 - (\sum x)^2)$$

donde n es el número total de datos.

-Ordenada al origen.

$$b = (\sum y + m\sum x) / n$$

-Coeficiente de determinación.

$$r = (n\sum xy - \sum x \sum y)^2 / (n\sum x^2 - (\sum x)^2)(n\sum y^2 - (\sum y)^2)$$

-Error estandar de regresión.

$$S_{y/x} = ((\sum y^2 - b\sum y - m\sum xy) / (n-2))^{1/2}$$

-Error estándar para la pendiente.

$$SM = (S_{y/x}) / (\sum x^2 - (\sum x)^2/n)^{1/2}$$

-Error estándar para la ordenada al origen.

$$SB = (S_{y/x}) \left((1/n) + \frac{\bar{x}^2}{(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n})} \right)^{1/2}$$

-Suma de cuadrados de regresión.

$$SCr = m\sum xy + b\sum y - \frac{(\sum y)^2}{r \cdot c}$$

donde

r = réplicas por peso

c = número de pesos ensayados

-Suma de cuadrados del error de regresión.

$$SCer = \sum y^2 - m\sum xy - b\sum y$$

-Suma de cuadrados del error puro

$$SCep = \sum_{\text{toda } x} (y^2 - (\sum y)^2/r)$$

-Suma de cuadrados de la falta de ajuste.

$$SCra = SCer - SCep$$

-Realizar la tabla 9.

Tabla 9. Análisis de varianza usado para una regresión.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F
Regresión	1	SC _r	SC _r	SC _r /MC _r
Error de regresión	n-2	SC _{er}	SC _{er} /gl _{er}	
Falta de Ajuste	(n-2) - t(r-1)	SC _{ra}	SC _{ra} /gl _{ra}	MC _{ra} /MC _{er}
Error puro	t(r-1)	SC _{ep}	SC _{ep} /gl _{ep}	

Análisis de varianza para evaluar la reproducibilidad y repetibilidad de las mediciones realizadas.

El ANDEVA utilizado fue un factorial 2X2X8 completamente al azar, para lo cual los datos se ordenaron de acuerdo a la tabla 10. Los símbolos utilizados en esa tabla se definen como sigue:

x_{ijk} es la i-ésima observación que recibe el i-ésimo analista, j-ésimo día y el k-ésimo peso.

-Total del j-ésimo día.

$$T_{.j..} = \sum_{l=1}^a \sum_{k=1}^p \sum_{i=1}^r x_{ijkl}$$

-Total del i-ésimo analista.

$$T_{.j..} = \sum_{j=1}^d \sum_{k=1}^p \sum_{l=1}^r x_{ijkl}$$

-Media del j-ésimo día.

$$\bar{x}_{.j..} = \frac{T_{.j..}}{n_j}$$

-Media del i-ésimo analista.

$$\bar{x}_{i....} = \frac{T_{i....}}{n_i}$$

-Suma de cuadrados total.

$$SCT = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^d \sum_{k=1}^p \sum_{l=1}^r (x_{ijkl} - \bar{x}_{i....})^2$$

-Suma de cuadrados debido al factor analista.

$$SCa = dpr \sum_{i=1}^a (\bar{x}_{i....} - \bar{x}_{.....})^2$$

-Suma de cuadrados debido al factor día.

$$SCd = apr \sum_{j=1}^d (\bar{x}_{.j..} - \bar{x}_{.....})^2$$

Tabla 10. Tabla de valores de la muestra para el diseño factorial (2X2XB) completamente al azar.

	j=1 d			
	k=1 p	k=1 p		
t = 1	X ₁₁₁₁ X _{11P1}	X ₁₂₁₁ X _{12P1}	$\bar{T}_1 \dots$	$\bar{X}_1 \dots$
.
.
.
.	X _{111r} X _{11Pr}	X _{121r} X _{12Pr}	.	.
.
.	X ₂₁₁₁ X _{21P1}	X ₂₂₁₁ X _{22P1}	.	.
.	.	.	T _a	$\bar{X}_a \dots$
a
.
.	X _{211r} X _{21Pr}	X _{221r} X _{22Pr}	.	.
Total	T ₁	T _d	T _{....}	
Media	\bar{X}_1	\bar{X}_d	$\bar{X}_{....}$	

-Suma de cuadrados debido a los factores.

$$SCT = r \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^d \sum_{k=1}^p (\bar{x}_{ijk} - \bar{x} \dots)^2$$

-Suma de cuadrados del error experimental.

$$SCE = SCT - SCT$$

-Con los datos anteriores se forma la tabla 11.

Tabla 11. Tabla condensada del ANDEVA para evaluar la reproducibilidad y repetibilidad de las mediciones del aparato.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Fcal.
Analista	a-1	SCa	SCa/gla	MCa/MCe
Día	d-1	SCd	SCd/gld	MCd/MCe
Error	adp(r-1)	SCE	SCE/gle	

donde:

a = número de analistas.

d = número de días.

p = número de pesos.

r = número de repeticiones.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Al-Dujaili, H.; Florence, A. T.; Salole, E. G. (1986). "The adhesiveness of proprietary tablets and capsules to porcine oesophageal tissue". *Int. J. Pharm.*, 34:75-79.
- 2.- Anders, R.; Merkle, H. P. (1989) "Evaluation of laminated muco-adhesive patches for buccal drug delivery". *Int. J. Pharm.*, 49:231-240.
- 3.- Aramaki, Y.; Niibuchi, J. J.; Tsuchiya, S.; Hosoda, J. I. (1987) "Interaction of 3',4'-dideoxykanamycin B and submaxillary mucin". *Chem. Pharm. Bull.* 35:320-325.
- 4.- Barrón, A.; Garzón, A. (1991). "Desarrollo y validación de un método indicativo de estabilidad, por CLAR para la determinación de clorhidrato de trihexifenidilo en tabletas y comparación con un método rutinario de control de calidad". *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.* 22:31-36.
- 5.- Bechgaard, H.; Ladefoged, K. (1978). "Distribution of pellets in the gastrointestinal tract. The influence on transit time exerted by the density of diameter of pellets". *J. Pharm. Pharmacol.* 30:690-692.
- 6.- Bridges, J. F.; Woodley, J. F.; Duncan, R.; Kopecek, J.

- (1988). "Soluble N-(2-hydroxypropyl)metacrilamide copolymers as a potential oral controlled-release drug delivery system. I. Bioadhesion to the rat intestine in vitro". *Int. J. Pharm.* 44:213-223.
- 7.- Cheema, M. S.; Rassing, J.; Marriott, C. (1985). "Determination of the gelling point of mucus glycoproteins using an ultrasonic technique". *J. Pharm. Pharmacol* (suplemento). 37:9P-12P.
- 8.- Ch'ng, H. S.; Park, H.; Kelly, P.; Robinson, J. R. (1985). "Bioadhesive polymers as platforms for oral controlled drug delivery II: Synthesis and evaluation of some swelling water-insoluble bioadhesive polymers". *J. Pharm. Sci.* 74:399-405.
- 9.- Crockford, H.; Nowell, J.; Baird, H.; Getzen, F. (1975). Laboratory manual of physical chemistry. 2a. ed. John Wiley and Sons. New York, USA, pp. 69-71.
- 10.- Daniel, W. (1990). Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud. (Traducción de Manuel Guzman Ortiz), 3a. ed., Editorial Limusa. México.
- 11.- Deasy, B. B.; O'Neal, C. T. (1989). "Bioadhesive dosage forms for peroral administration of timolol base". *Pharm. Acta Helv.* 64:231-235.

- 12.-Duchene, D.; Touchard, F.; Peppas, N. (1988). "Pharmaceutical and medical aspects of bioadhesive systems for drug administration". *Drug Dev. Ind. Pharm.* 14:283-318.
- 13.-Ganong, W. (1986). Fisiología médica. (Traducción Orlando Morales Matamoros). 10a. ed., Editorial El Manual Moderno. México. pp. 396-415.
- 14.-Harris, D.; Fell, J. T.; Taylor, D. C.; Lynch, J.; Sharma, H. L. (1989). "Oral availability of a poorly absorbed drug, hydrochlorothiazide, from a bioadhesive formulation in the rat". *Int. J. Pharm.* 56:97-102.
- 15.-Horn, R. G.; Israelachvili, J. N.; Privac, F. (1987). "Measurement of the deformation and adhesion of solids in contact". *J. of Colloid and Interface Science.* 115:480-491.
- 16.-Illum, L. (1987). "Bioadhesive microspheres as a potential nasal drug delivery system". *Int. J. Pharm.* 39:189-199.
- 17.-James, S. L.; Marriott, C. (1982). "An investigation of the effect of an antacid mucosal protective on gastric mucus". *Pharm. Acta Helv.* 57:265-267.
- 18.-Kearney, P.; Marriott, C. (1986). "The effects of mucus glycoprotein on the bioavailability of tetracycline. I. Dissolution rate. *Int. J. Pharm.* 28:33-40.

- 19.-Kratochvil, P. (1986). "Interactions in polymer solutions".
Acta Pharm. Suec. 23:31-46.
- 20.-Lejoyeux, F.; Panchel, G; Wouessidjewe, D.; Peppas, N. A.;
Duchene, D. (1989). "Bioadhesive tablets influence of the
testing medium composition on bioadhesion". *Drug Dev. Ind.*
Pharm. 15:2037-2048,
- 21.-Longer, M. A.; Ch'ng, H. S.; Robinson, J. R. (1985).
"Bioadhesive polymers as platforms for oral controlled drug
delivery III: Oral delivery of chlorothiazide using a
bioadhesive polymer". *J. Pharm. Sci.* 74:406-411.
- 22.-Longer, M. A.; Robinson, J. R. (1986). "Fundamental aspects
of bioadhesion". *Pharmacy International*, 7:114-117.
- 23.-Lyklema, J.; Norde, W.; Loosdrecht, V.; Zehnder, A. J.
(1989). "Adhesion of bacteria to polystyrene surfaces".
Colloids and Surfaces. 39:175-187.
- 24.-Marriot, C. (1983). "The effect of drugs on the structure and
secretion of mucus". *Pharm. Int.* 4:320-323.
- 25.-Nagai, T.; Machida, Y. (1985). "mucosal adhesive dosage
forms". *Pharm. Int.* 6:196-200.
- 26.-Niibuchi, J. J.; Aramaki, Y.; Tsuchiya, S. (1986). "Binding

of antibiotics to rat intestinal mucin". *Int. J. Pharm.* 30:181-187.

- 27.-Ostle, Bernard. (1988). Estadística aplicada. (Traducción de Dagoberto de la Serna Valdivia). Edit. Limusa. México.
- 28.-Otsuka, A.; Iida, K.; Danjo, K.; Sunada, H. (1988). "Measurement of the adhesive force between particles of powdered materials and a glass substrate by means of the impact separation method. III. Effect of particle shape and surface asperity". *Chem. Pharm. Bull.* 36:741-749.
- 29.-Park, K. (1989). "A new approach to study mucoadhesion: colloidal gold staining". *Int. J. Pharm.* 53:209-217.
- 30.-Peppas, N. A.; Mikos, A. G. (1986). in "Interrelationships between gastro-intestinal physiology and dosage form design". Eds. J. R. Cardinal y E. G. Rippiee, Academy of Pharmaceutical Sciences, Washington, DC.
- 31.-Pfister, W. (1989). "Customizing silicone adhesives for transdermal drug delivery systems". *Pharm. Tech.* 13:126-137.
- 32.-Pimienta, C.; Lenaerts, B.; Cadienx, C.; Raymond, P.; Juhasz, J.; Simard, M.; Jolicoeur, C. (1990). "Mucoadhesion of Hydroxypropylmethacrylate nanoparticles to rat intestinal ileal segments in vitro". *Pharm. Research.* 7:49-53.

- 33.-Ranga, R. K. V.; Buri, P. (1989). "A novel in situ method to test polymers and coated microparticles for bioadhesion". *Int. J. Pharm.* 52:265-270.
- 34.-Robert, C.; Buri, P. (1986). "Le mucus et son rôle dans l'absorption des médicaments". *Pharm. Acta Helv.* 61:210-214.
- 35.-Saettone, M. F.; Chetoni, P.; Torracca, M. T.; Burgalassi, S.; Giannaccini, B. (1989). "Evaluation of muco-adhesive properties and in vivo activity of ophthalmic vehicles based on hyaluronic acid". *Int. J. Pharm.* 51:203-212.
- 36.-Smart, J. D.; Kellaway, I. W.; Worthington, R. (1984). "An in vitro investigation of mucosa-adhesive materials for use in controlled drug delivery". *J. Pharm. Pharmacol.*, 36:295-299.
- 37.-United States Pharmacopeia XXII; National Formulary XVII. United States Pharmacopeial Convention, Inc. Official from January 1, 1990. USA. pp. 1788-1789.