



00550  
26

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

DESARROLLO TECNOLÓGICO Y CARACTERIZACIÓN DE PARTÍCULAS SUBMICRÓNICAS POLIMÉRICAS COMO VECTORES TERAPÉUTICOS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES PERIODONTALES

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. ELIZABETH PIÑÓN SEGUNDO

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM  
Enviar en formato electrónico a [eliza@bibliotecas.unam.mx](mailto:eliza@bibliotecas.unam.mx) o imprimir en formato impreso y enviarlo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM.

Elizabth Piñon

Segundo

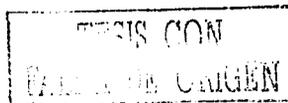
20 May 2003

D. Quintanar



Ciencias Químicas

TUTOR: Dr. DAVID QUINTANAR GUERRERO



2003

A



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.

**PAGINACION**

**DISCONTINUA**

## AGRADECIMIENTOS

A mi tutor de tesis, **Dr. David Quintanar Guerrero**, por impulsar la culminación de este proyecto.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, por el apoyo económico brindado a través de la Beca-Crédito registro 145133 y el Proyecto CONACYT clave J-27741-M.

A la **M. en C. María de los Ángeles Vidal Millán** de la FES Zaragoza, por su colaboración en las pruebas preliminares de Calorimetría Diferencial de Barrido.

A el **Técnico Rodolfo Robles** de la FES Cuautitlán, por su asistencia en los estudios de Microscopía Electrónica de Barrido.

A el **Técnico Draucín Jiménez** del Taller de Soplado de Vidrio de la FES Cuautitlán, por el diseño de algunas piezas utilizadas en este proyecto.

A el **Ing. Juan Rafael Garibay Bermúdez**, por su asesoría en el tratamiento estadístico de los resultados.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

B

**NO VUELVAS LA ESPALADA A LOS FUTUROS POSIBLES, ANTES DE ESTAR SEGURO  
QUE NO TIENES NADA QUE APRENDER DE ELLOS. (RICHARD BACH)**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

C



Ciencias  
Químicas

## **JURADO ASIGNADO**

Presidente: **Dr. Andrés Navarrete Castro**

Vocal: **Dra. Luz María Melgoza Contreras**

Secretario: **Dra. Adriana Ganem Rondero**

Primer suplente: **Dra. María Josefa Bernard Bernard**

Segundo Suplente: **Dra. Helgi Jung Cook**

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Posgrado en Farmacia de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM; bajo la dirección del **Dr. David Quintanar Guerrero**.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

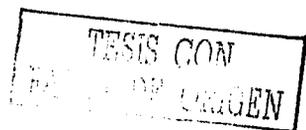
D

# ÍNDICE

		Página
I.	Lista de Abreviaturas.	iii
II.	Lista de Figuras.	iv
III.	Lista de Cuadros.	vi
IV.	Lista de Tablas.	vii
V.	Lista de Gráficos	viii
1.	INTRODUCCIÓN.	1
2.	MARCO TEÓRICO.	2
2.1.	El periodonto (Generalidades).	2
2.2.	Enfermedades periodontales.	3
2.3.	Plan de tratamiento periodontal.	5
2.4.	Tratamiento local de la gingivitis y la periodontitis.	5
2.4.1.	Sistemas de aplicación supragingival.	6
2.4.2.	Sistemas de aplicación subgingival.	7
2.4.3.	Sistemas de liberación "intrapocket".	8
2.4.4.	Sistemas de aplicación local disponibles comercialmente.	15
2.5.	Sistemas acarreadores de fármacos.	17
2.6.	Nanopartículas.	18
2.6.1.	Preparación de nanopartículas.	19
2.6.1.1.	Generalidades.	19
2.6.1.2.	Métodos de preparación.	23
2.6.2.	Liberación de fármacos a partir de nanopartículas.	31
2.6.2.1.	Mecanismos de liberación.	32
3.	OBJETIVOS.	37
4.	PARTE EXPERIMENTAL.	38
4.1.	Polímeros.	38

TESIS CON  
FOLIO DE ORIGEN

4.2.	Estabilizante.	38
4.3.	Principio activo.	38
4.4.	Reactivos en general.	38
4.5.	Material y equipo.	38
4.6.	Metodología.	40
4.6.1.	Determinaciones previas.	40
4.6.1.1.	Espectros de absorción.	40
4.6.1.2.	Curvas de calibración.	40
4.6.1.3.	Determinación de la solubilidad de triclosán en Brij® 58 al 2% p/v.	40
4.6.2.	Preparación de nanopartículas por el método de emulsificación-difusión.	41
4.6.3.	Evaluación de nanopartículas.	43
4.6.3.1.	Tamaño de partícula.	43
4.6.3.2.	Morfología.	43
4.6.3.3.	Determinación del PVAL residual en nanopartículas de PLGA y PLA.	43
4.6.3.4.	Determinación del PVAL residual en nanopartículas de CAP.	44
4.6.3.5.	Determinación del Triclosán en nanopartículas de PLGA y PLA.	44
4.6.3.6.	Determinación del Triclosán en nanopartículas de CAP.	44
4.6.3.7.	Calorimetría diferencial de barrido.	45
4.6.4.	Perfiles de liberación.	45
4.6.5.	Preparación de nanopartículas por el método de desplazamiento de solvente.	46
4.6.5.1.	Preparación por el método convencional.	46
4.6.5.2.	Preparación con un sistema de reflujo.	47
5.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b>	49
6.	<b>CONCLUSIONES.</b>	112
7.	<b>PERSPECTIVAS.</b>	113
8.	<b>REFERENCIAS.</b>	114
<b>Apexos.</b>		123



## I. LISTA DE ABREVIATURAS.

PLA	Ácido poliláctico
CAP	Acetato ftalato de celulosa
PLGA	Ácido poliláctico co-glicólico
PCL	Poli-ε-caprolactona
nm	nanómetros
ml	mililitros
μm	micrómetros
μg	microgramos
ng	nanogramos
min	minutos
mm	milímetros
I.P.	Índice de polidispersidad
C.V.	Coefficiente de variación
d.e.	Desviación estándar
Prom.	Promedio
% p/p	Concentración en porcentaje peso / peso
% p/v	Concentración en porcentaje peso / volumen
t	Tiempo
T	Temperatura
°C	Grados centígrados
PVAL	Alcohol polivinílico
rpm	Revoluciones por minuto
T <sub>g</sub>	Temperatura de transición vítrea
T <sub>m</sub>	Temperatura de fusión
UV/Vis	Ultravioleta/Visible
λ	Longitud de onda
o / w	Aceite en agua
w / o / w	Agua en aceite en agua
SCAF	Sistemas coloidales acarreadores de fármacos
Mt	Cantidad de fármaco liberada al tiempo t
Mα	Cantidad de fármaco liberada al equilibrio
K <sub>H</sub>	Constante de Higuchi
K <sub>1</sub>	Constante de primer orden
r <sup>2</sup>	Coefficiente de determinación

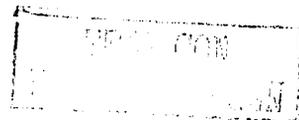
## II. LISTA DE FIGURAS .

Figura 1.	Estructuras Periodontales.	2
Figura 2.	Formación de la bolsa periodontal.	4
Figura 3.	Representación esquemática de las Nanoesferas y las Nanocápsulas.	19
Figura 4.	Apertura del anillo de lactonas cíclicas para obtener los monómeros de: a) Poli-ε-caprolactona (PCL); b) Ácido poliglicólico (PGA) y c) Ácido poliláctico (PLA).	21
Figura 5.	Representación esquemática del método de emulsificación-evaporación para preparar nanoesferas.	25
Figura 6.	Representación esquemática del método de desplazamiento de solvente para preparar nanoesferas y nanocápsulas.	26
Figura 7.	Representación esquemática del método de "salting out" para preparar nanoesferas.	28
Figura 8.	Representación esquemática del método de emulsificación-difusión para preparar nanoesferas y nanocápsulas.	30
Figura 9.	Preparación de nanopartículas por el método de emulsificación-difusión.	42
Figura 10.	Aparato empleado para las pruebas de disolución.	46
Figura 11.	Preparación de nanopartículas por desplazamiento de solvente (Método Convencional)	47
Figura 12.	Preparación de nanopartículas por desplazamiento de solvente (Sistema de Reflujo).	47
Figura 13.	Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de PLGA (Lote 1).	52
Figura 14.	Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de PLGA con triclosán (Lote 2)	52
Figura 15.	Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de PLGA con triclosán (Lote 3).	53
Figura 16.	Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de PLGA con triclosán (Lote 4)	53
Figura 17.	Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de PLGA con triclosán (Lote 5).	54
Figura 18.	Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de PLGA con triclosán (Lote 6).	54

<b>Figura 19.</b>	Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de PLGA con triclosán (Lote 7).	55
<b>Figura 20.</b>	Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de PLA (Lote 8).	56
<b>Figura 21.</b>	Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de PLA con triclosán (Lote 9).	56
<b>Figura 22.</b>	Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de PLA con triclosán (Lote 10).	57
<b>Figura 23.</b>	Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de PLA con triclosán (Lote 11).	57
<b>Figura 24.</b>	Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de CAP (Lote 12).	58
<b>Figura 25.</b>	Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de CAP con triclosán (Lote 13).	59
<b>Figura 26.</b>	Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de CAP con triclosán (Lote 14).	59
<b>Figura 27.</b>	Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de CAP con triclosán (Lote 15).	60
<b>Figura 28.</b>	Fotografías de nanoesferas de PLGA con triclosán, Microscopía electrónica de barrido.	62
<b>Figura 29.</b>	Esquema del mecanismo propuesto para la formación de nanopartículas por el método de emulsificación difusión.	63
<b>Figura 30.</b>	Termogramas para Triclosán y nanoesferas de PLGA con triclosán.	67
<b>Figura 31.</b>	Termogramas para Triclosán y nanoesferas de PLA con triclosán.	68
<b>Figura 32.</b>	Termogramas para nanoesferas de CAP con triclosán y Termograma para Triclosán.	69
<b>Figura 33.</b>	Fotografía de las lesiones periodontales provocadas entre el 2° y 3° premolares en perro criollo macho.	95
<b>Figura 34.</b>	Fotografía tomada después de 8 días de aplicación de las nanopartículas de PLGA con triclosán y sudán III.	96
<b>Figura 35.</b>	Fotografía tomada después de 15 días de aplicación de las nanopartículas de PLGA con triclosán y sudán III.	97
<b>Figura 36.</b>	Representación esquemática de la formación de nanopartículas por un mecanismo de turbulencia interfacial.	100

### III. LISTA DE CUADROS.

Cuadro 1.	Comparación de sistemas de liberación de fármacos para el tratamiento de la periodontitis.	6
Cuadro 2.	Sistemas de aplicación subgingival.	8
Cuadro 3.	Sistemas de liberación "intrapocket" tipo matriz (no degradables).	10
Cuadro 4.	Sistemas de liberación "intrapocket" tipo matriz (degradables).	11
Cuadro 5.	Temperaturas de transición vítrea y puntos de fusión de algunos poliésteres.	22
Cuadro 6.	Mecanismo de transporte y tipo de liberación de acuerdo al valor de "n" en el modelo semi-empírico de Peppas.	82



#### IV. LISTA DE TABLAS.

Tabla 1.	Materiales y cantidades empleadas para la preparación de los lotes de nanopartículas por el método de emulsificación-difusión.	42
Tabla 2.	Talla de partícula promedio para nanopartículas de PLGA y de PLGA con triclosán.	51
Tabla 3.	Talla de partícula promedio para nanopartículas de PLA y de PLA con triclosán.	55
Tabla 4.	Talla de partícula promedio para nanopartículas de CAP y de CAP con triclosán.	58
Tabla 5.	Caracterización de nanoesferas de PLGA, PLA y CAP.	65
Tabla 6.	Coefficientes de determinación y valor de "n" de acuerdo al modelo de Peppas.	85
Tabla 7.	Coefficientes de determinación y valor de " $K_H$ " de acuerdo al modelo de Higuchi.	89
Tabla 8.	Coefficientes de determinación y valor de " $K_1$ " de acuerdo a cinética de primer orden.	93
Tabla 9.	Talla de partícula (nm) para nanopartículas obtenidas por el método de desplazamiento de solvente por la forma convencional y con sistema de reflujo.	101
Tabla 10.	Rendimiento del proceso (%) de preparación de nanopartículas obtenidas por el método de desplazamiento de solvente por la forma convencional y con sistema de reflujo.	102
Tabla 11.	Resumen del análisis de varianza para la variable de respuesta rendimiento del proceso.	109
Tabla 12.	Resumen del análisis de varianza para la variable de respuesta talla de partícula.	110
Tabla 13.	Resumen del análisis de varianza para la variable de respuesta rendimiento, comparación de los dos métodos.	111

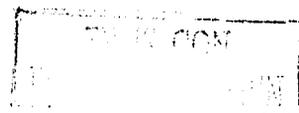


## V. LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Comportamiento del tamaño de partícula.	60
Gráfico 2.	Perfil de liberación para las nanoesferas de PLGA con triclosán, considerando como 100% el triclosán cargado en las nanoesferas.	74
Gráfico 3.	Perfil de liberación para las nanoesferas de PLA con triclosán, considerando como 100% el triclosán cargado en las nanoesferas.	75
Gráfico 4.	Perfil de liberación para las nanoesferas de CAP con triclosán, considerando como 100% el triclosán cargado en las nanoesferas.	76
Gráfico 5.	Perfil de liberación para las nanoesferas de PLGA con triclosán, considerando como 100% la cantidad máxima liberada.	77
Gráfico 6.	Perfil de liberación para las nanoesferas de PLA con triclosán, considerando como 100% la cantidad máxima liberada.	78
Gráfico 7.	Perfil de liberación para las nanoesferas de CAP con triclosán, considerando como 100% la cantidad máxima liberada.	79
Gráfico 8.	Modelo de Peppas aplicado a la liberación de triclosán a partir de nanoesferas de PLGA.	83
Gráfico 9.	Modelo de Peppas aplicado a la liberación de triclosán a partir de nanoesferas de PLA.	84
Gráfico 10.	Modelo de Peppas aplicado a la liberación de triclosán a partir de nanoesferas de CAP.	85
Gráfico 11.	Modelo de Higuchi aplicado a la liberación de triclosán a partir de nanoesferas de PLGA.	87
Gráfico 12.	Modelo de Higuchi aplicado a la liberación de triclosán a partir de nanoesferas de PLA.	88
Gráfico 13.	Modelo de Higuchi aplicado a la liberación de triclosán a partir de nanoesferas de CAP.	89
Gráfico 14.	Cinética de Primer Orden aplicada a la liberación de triclosán a partir de nanoesferas de PLGA.	91
Gráfico 15.	Cinética de Primer Orden aplicada a la liberación de triclosán a partir de nanoesferas de PLA.	92
Gráfico 16.	Cinética de Primer Orden aplicada a la liberación de triclosán a partir de nanoesferas de CAP.	93
Gráfico 17.	Efecto de la concentración y la velocidad de inyección sobre la talla de partícula de nanoesferas obtenidas por el método convencional de desplazamiento de solvente.	103



<b>Gráfico 18.</b>	Efecto de la concentración y la velocidad de inyección sobre el rendimiento del proceso de obtención de nanoesferas por el método convencional de desplazamiento de solvente.	103
<b>Gráfico 19.</b>	Efecto de la velocidad de inyección y velocidad de recirculación sobre el rendimiento del proceso de obtención de nanoesferas por el método de desplazamiento de solvente con el sistema de reflujo para la concentración de 2.5 % p/v.	104
<b>Gráfico 20.</b>	Efecto de la velocidad de inyección y velocidad de recirculación sobre el rendimiento del proceso de obtención de nanoesferas por el método de desplazamiento de solvente con el sistema de reflujo para la concentración de 5.0 % p/v.	104
<b>Gráfico 21.</b>	Efecto de la velocidad de inyección y velocidad de recirculación sobre el rendimiento del proceso de obtención de nanoesferas por el método de desplazamiento de solvente con el sistema de reflujo para la concentración de 7.5 % p/v.	105
<b>Gráfico 22.</b>	Efecto de la velocidad de inyección y velocidad de recirculación sobre el rendimiento del proceso de obtención de nanoesferas por el método de desplazamiento de solvente con el sistema de reflujo para las concentraciones de 2.5, 5.0 y 7.5 % p/v.	105
<b>Gráfico 23.</b>	Efecto de la velocidad de inyección y velocidad de recirculación sobre la talla de partícula de nanoesferas obtenidas por el método de desplazamiento de solvente con el sistema de reflujo para la concentración de 2.5 % p/v.	106
<b>Gráfico 24.</b>	Efecto de la velocidad de inyección y velocidad de recirculación sobre la talla de partícula de nanoesferas obtenidas por el método de desplazamiento de solvente con el sistema de reflujo para la concentración de 5.0 % p/v.	106
<b>Gráfico 25.</b>	Efecto de la velocidad de inyección y velocidad de recirculación sobre la talla de partícula de nanoesferas obtenidas por el método de desplazamiento de solvente con el sistema de reflujo para la concentración de 7.5 % p/v.	107
<b>Gráfico 26.</b>	Efecto de la velocidad de inyección y velocidad de recirculación sobre la talla de partícula de nanoesferas obtenidas por el método de desplazamiento de solvente con el sistema de reflujo para las concentraciones de 2.5, 5.0 y 7.5 % p/v.	107



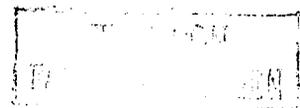
## 1. INTRODUCCIÓN.

En la actualidad uno de los principales objetivos del farmacéutico es el diseño de nuevos sistemas o dispositivos de liberación de fármacos que controlen la liberación del agente farmacológico en el sitio de acción a una velocidad terapéuticamente óptima. La liberación dirigida al sitio específico (ubicación espacial) combinada con una velocidad de liberación adecuada (distribución temporal) no sólo puede aumentar la eficacia del fármaco sino reducir notablemente la presencia de efectos secundarios adversos, mejorando así el índice terapéutico. Dentro de estos nuevos sistemas encontramos a las nanopartículas que, comparadas con otros acarreadores coloidales, presentan una mayor estabilidad cuando están en contacto con fluidos biológicos y su naturaleza polimérica las hace susceptibles de convertirse en sistemas de liberación prolongada y controlada. Además son estables durante el almacenamiento y ofrecen posibilidad de escalamiento.

Se considera que la periodontitis es la responsable del 70% de la pérdida de dientes en adultos y es la principal causa de que personas mayores de 60 años carezcan de piezas dentales. Aunque en México no existen cifras exactas de individuos con este tipo de enfermedades, es bien sabido que se encuentran ampliamente diseminadas, no solo en la población adulta y de edad avanzada sino también en el sector joven; además este problema se acentúa notablemente en la población de bajos ingresos. La efectividad de los tratamientos convencionales para estos padecimientos es limitada por el difícil acceso a la bolsa periodontal.

En el presente trabajo se propone la utilización de nanopartículas para el tratamiento local de la gingivitis y la periodontitis. Se prepararon y caracterizaron nanopartículas de tres polímeros biodegradables cargadas con diferentes proporciones de un agente antibacteriano (triclosán) utilizando el método de emulsificación difusión para formación de nanopartículas a partir de polímeros preformados. Se propuso un nuevo sistema para evaluar la liberación del triclosán a partir de las nanopartículas, sin utilizar membranas de diálisis.

Además se evalúan los factores que intervienen en la preparación de nanopartículas por el método de desplazamiento de solvente y se propone un nuevo dispositivo que permite aumentar el rendimiento de este proceso y brindar una alternativa industrial para la producción de nanopartículas.



## 2. MARCO TEÓRICO.

### 2.1. EL PERIODONTO (GENERALIDADES).

El vocablo periodonto deriva de la raíz latina *peri*, alrededor y del griego *odous*, diente. Se denomina **periodonto** al conjunto de tejidos integrado por la encía (gingiva) y los tejidos de sostén del diente (hueso alveolar, ligamento periodontal y cemento radicular) [Rateischak y cols., 1989 y Medicott y cols., 1994]. En la figura 1 se pueden apreciar las principales estructuras que forman parte del periodonto.

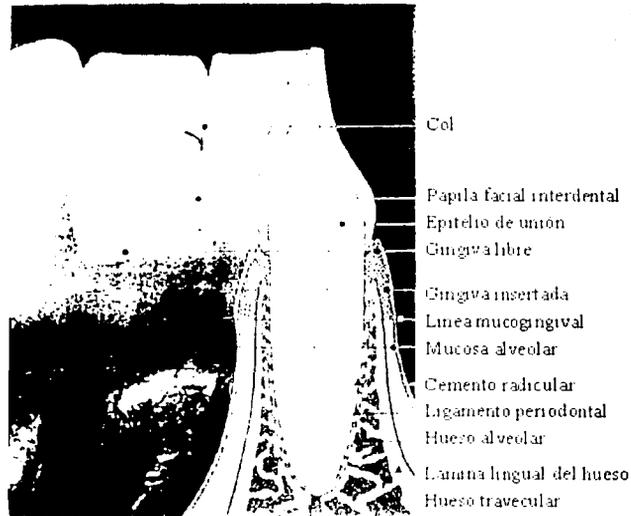
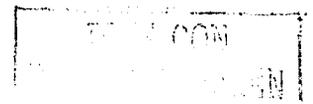


Figura 1. Estructuras Periodontales [Modificado de Rateischak y cols., 1989].

La gingiva o encía es la parte de la mucosa bucal situada en las vecindades inmediatas del diente, rodea el cuello de los dientes y es el componente más periférico del periodonto. Se divide anatómicamente en encía marginal, que forma el surco gingival; encía adherida y encía interdientaria. La encía marginal está

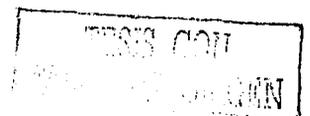


situada alrededor del cuello dentario, la gingiva insertada es la continuación de la encía marginal y la encía interdentaria ocupa el nicho gingival, que es el espacio interproximal entre las áreas de contacto de los dientes. El surco gingival es la depresión de poca profundidad o espacio que rodea al diente, limitado por la superficie del diente por un lado y la cubierta epitelial del margen de la encía por el otro [Rateischak y cols., 1989 y Medicott y cols., 1994]. El surco gingival y la unión epitelio-diente son bañados por un fluido gingival o fluido crevicular. El líquido gingival fluye hacia el surco desde el tejido gingival y conectivo a través de la delgada pared del surco a una velocidad de  $0.33 \mu\text{l}/\text{min}$  ( $20 \mu\text{l}/\text{hora}$ ) y ocupa un volumen de  $0.5 \mu\text{l}$ . El fluido gingival se recambia 40 veces por hora; este hecho puede influir en el corto tiempo de retención de agentes antibacterianos en la cavidad oral y por tanto en la duración del efecto del tratamiento de la gingivitis con pastas, geles dentales, enjuagues bucales y sistemas de irrigación [Baker y cols., 1988].

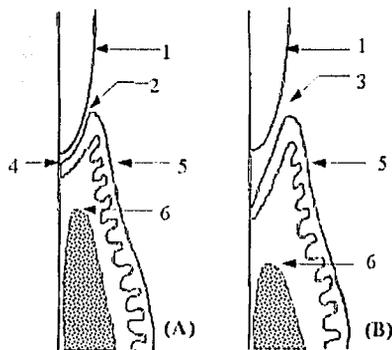
Microscópicamente la encía está formada por un núcleo central de tejido conectivo fibroso cubierto por un epitelio escamoso estratificado. El epitelio gingival está formado por tres áreas: el epitelio bucal o externo, el epitelio del surco y el epitelio de unión. El epitelio del surco es muy importante, ya que puede fungir como una membrana semipermeable a través de la cual pasan productos bacterianos lesivos hacia la encía, así como líquido tisular de la encía hacia el surco. El epitelio de unión está formado por una banda a manera de collar de epitelio escamoso estratificado no queratinizado; la inserción del epitelio de unión al diente está reforzada por fibras gingivales que dan apoyo a la encía marginal contra la superficie dentaria. El epitelio de unión y las fibras gingivales forman una unidad funcional conocida como unión dentogingival [Gordon y cols., 1981a y Rateischak y cols., 1989].

## 2.2. ENFERMEDADES PERIODONTALES.

Enfermedad periodontal es un término genérico empleado para todos los tipos de afecciones patológicas de los tejidos periodontales, que incluyen enfermedades neoplásicas, degenerativas e inflamatorias. Las enfermedades inflamatorias del periodonto abarcan las enfermedades gingivales, la periodontitis y las manifestaciones periodontales de enfermedades sistémicas, las dos primeras son la mayor causa de pérdida de dientes en adultos [Friedman y Steinberg, 1990; Medicott y cols., 1994 y Esposito y cols., 1997].



Se llama *enfermedad gingival* a las alteraciones patológicas de la gingiva; en su enorme mayoría son de tipo inflamatorio (gingivitis) y evolucionan hacia un estado de periodontitis. La *periodontitis* se caracteriza por la presencia de lesiones inflamatorias gingivales, con formación de una bolsa periodontal (surco gingival patológicamente profundizado) que conduce a la destrucción de los tejidos de soporte del diente; y finalmente a la pérdida de piezas dentales. Este proceso es esquematizado en la figura 2. Su causa primaria es infecciosa (placa bacteriana), aunque varias enfermedades sistémicas pueden presentar manifestaciones gingivales y periodontales tales como deficiencias vitamínicas y proteicas; enfermedades endócrinas (hipofunción tiroidea, trastornos hipofisarios, hiperparatiroidismo, diabetes mellitus, alteraciones hormonales durante el embarazo, etc.); enfermedades hemáticas (leucemia, agranulocitosis, etc.) e inmunodeficiencias (enfermedad de Chédiak-Higashi, SIDA, etc.). Las bolsas periodontales contienen residuos consistentes en microorganismos y sus productos (enzimas, endotoxinas y otros productos metabólicos), placa dental, líquido gingival, células epiteliales descamadas y leucocitos. Algunas especies que han sido fuertemente asociadas con la enfermedad periodontal son: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens* y *Capnocytophaga gingivalis* [Baker y cols., 1988; Friedman y Steinberg, 1990 y Medlicott y cols., 1994].



**Figura 2.** Formación de la bolsa periodontal. (A) Saco gingival sano, (B) Bolsa periodontal.

1. Corona, 2. Saco Gingival, 3. Bolsa Periodontal, 4. Epitelio de Unión, 5. Gingiva y 6. Hueso Alveolar.

### 2.3. PLAN DE TRATAMIENTO PERIODONTAL.

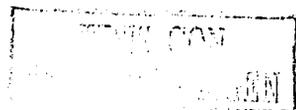
El tratamiento periodontal tiene una doble finalidad: la eliminación total de la enfermedad y el mantenimiento de la salud periodontal. En general, el objetivo del tratamiento es eliminar la placa bacteriana y crear las condiciones para que el paciente pueda mantenerse libre de ella en forma permanente [Carranza y Sznajder, 1996]. Junto con el tratamiento instrumental de la bolsa periodontal (raspado y alisado radicular) se propone la utilización de estrategias destinadas a suprimir o eliminar periodontopatógenos específicos y a controlar su crecimiento en la superficie y alrededor del diente.

La terapéutica antimicrobiana es importante para eliminar bacterias a las cuales no se puede llegar por medios instrumentales. Algunos trabajos de investigación han demostrado que la administración sistémica de algunos antimicrobianos puede alcanzar concentraciones terapéuticas en el sitio de infección, sin embargo, estas concentraciones son mantenidas por un corto periodo después de una dosis única y la dosis empleada es capaz de producir efectos sistémicos indeseables [Gordon y cols., 1981a y Gordon y cols., 1981b].

Con la administración local de antimicrobianos para el tratamiento periodontal se pueden alcanzar, en el periodonto, concentraciones más elevadas que las alcanzadas por vía sistémica empleando dosis menores [M. Addy y cols., 1988]. La principal desventaja de la administración local de antimicrobianos es la dificultad de penetrar a la bolsa periodontal y alcanzar la concentración adecuada del fármaco en el sitio de acción [B. V Somayaji, 1998]. Los métodos comúnmente empleados para administrar y/o transportar antimicrobianos dentro de la bolsa periodontal son: enjuagues, irrigación, administración sistémica y aplicación local usando dispositivos de liberación sostenida [Medlicott y cols., 1994; Drisko, 1996 y Greenstein y Polson, 1998].

### 2.4. TRATAMIENTO LOCAL DE LA GINGIVITIS Y LA PERIODONTITIS.

El éxito de los sistemas de liberación de fármacos diseñados para el tratamiento de las enfermedades periodontales depende de su habilidad para liberar los agentes antimicrobianos hacia la base de la bolsa periodontal alcanzando dentro de ella concentraciones bacteriostáticas o bactericidas. También deben facilitar la retención del medicamento en el sitio de acción el tiempo necesario para que se presente un



efecto terapéutico [Medlicott y cols., 1994; Ganem-Quintanar y cols., 1998 y Greenstein y Polson, 1998]. Las técnicas propuestas para administrar antimicrobianos que pretenden cumplir con lo anteriormente expuesto son comparadas en el cuadro 1.

**Cuadro 1.** Comparación de sistemas de liberación de fármacos para el tratamiento de la Periodontitis (Modificado de Greenstein y Polson, 1998)

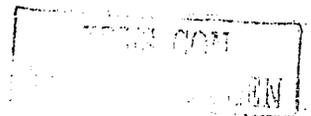
	Enjuagues Bucales	Irrigación Subgingival	Sistemas de Liberación Sostenida	Sistemas de Liberación Controlada
Alcance del sitio de acción	Pobre	Bueno	Bueno	Bueno
Concentración de fármaco adecuada	Buena	Buena	Regular	Buena
Duración adecuada de la terapia	Pobre	Pobre	Regular	Buena

Pitcher y colaboradores [1980] demostraron que un agente revelador de placa bacteriana administrado en un enjuague bucal no puede penetrar dentro de la bolsa periodontal, indicando que este método de liberación no es adecuado para el tratamiento de infecciones subgingivales.

La irrigación de soluciones antibacteriales directamente en las bolsas periodontales con jeringas manuales y/o dispositivos especiales presentan mayor penetración pero la duración de la acción es generalmente corta y se requieren aplicaciones frecuentes para mantener una concentración efectiva en la bolsa periodontal. La necesidad de aplicaciones múltiples para obtener un beneficio clínico da lugar a que el paciente no esté conforme con este tipo de tratamiento.

#### 2.4.1. SISTEMAS DE APLICACIÓN SUPRAGINGIVAL.

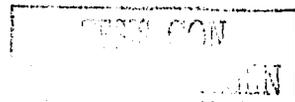
Se han propuesto algunos sistemas de liberación prolongada para aplicación supragingival de agentes capaces de controlar la acumulación de la placa dental y evitar la gingivitis. Entre estos sistemas se encuentran un barniz y una película que contienen clorhexidina [Brayer y cols., 1988 y Shapira y cols., 1994]; una película de copolímeros del ácido metacrílico con cloruro de cetilpiridinio [Kostovski y cols., 1994] y un antibiótico producido por cepas del hongo *M. xanthus* [Manor y cols., 1989].



Estos sistemas han sido utilizados después de retirar la placa dental por raspado y alisado radicular y solo han sido capaces de prevenir la acumulación de nueva placa dental.

#### 2.4.2. SISTEMAS DE APLICACIÓN SUBGINGIVAL.

Algunos agentes antimicrobianos como clorhexidina, tetraciclina y metronidazol han sido incorporados en geles que son aplicados subgingivalmente después de retirar mecánicamente la placa dental. En general, en este tipo de sistemas se ha logrado evitar que los sitios tratados sean recolonizados por patógenos [Oosterwaal y cols., 1991; Ainamo y cols., 1992; Kalaitzakis y cols., 1993; Unsal y cols., 1995; Esposito y cols., 1996 y Stelzel y Flores de Jacobi, 1996]. Con estudios de fluorescencia se ha demostrado que sólo el 50 % del gel aplicado permanece en contacto con la bolsa periodontal por un tiempo de 12 minutos, el resto del gel es eliminado inmediatamente después de su aplicación [Wade y cols., 1992]. Nakagawa y colaboradores [1991] formularon un unguento que contiene 2 % de clorhidrato de minociclina y administrándolo por irrigación 4 veces por semana lograron la eliminación de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *P. intermedia* hasta por 12 semanas, lo cual ocasiona una disminución en la profundidad de las bolsas periodontales; este efecto se ve potenciado si se realiza previamente un raspado mecánico. Otros autores [Taner y cols., 1994; Yeom y cols., 1997 y Schwach-Abdellaoui y cols., 2000] han propuesto la utilización de películas resorbibles de derivados de celulosa con doxiciclina y clorhexidina [Stabholz y cols., 1986; Taner y cols., 1994; Yeom y cols., 1997 y Schwach-Abdellaoui y cols., 2000]; todos estos sistemas han disminuido microorganismos patógenos en la bolsa periodontal. En el cuadro número 2 se presentan algunos ejemplos de sistemas de aplicación subgingival.



Cuadro 2. Sistemas de aplicación subgingival.

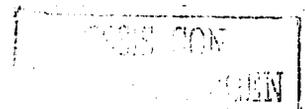
Sistema	Principio Activo	Referencia
Gel,	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Clorhexidina 2 %; Fluoruro estanoso 4 %; Fluoruro-amina 1.25 %</li> <li>- Clorhexidina 1 %</li> <li>- Metronidazol 25 %</li>   <li>- Clorhexidina al 1 %; Triclosán 40 %</li> <li>- Tetraciclina</li> <li>- Azul de metileno</li> <li>- Histatina</li> </ul>	<p>Oosteerwaal y cols., 1991.</p> <p>Kalaitzakis y cols., 1993.</p> <p>Ainamo y cols., 1992 y Stelzel y Flores de Jacobi, 1996.</p> <p>Unsal y cols., 1995.</p> <p>Esposito y cols., 1996.</p> <p>Gibson y cols., 1994.</p> <p>Paquete y cols., 1997.</p>
Ungüento	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Clorhidrato de Minociclina 1 % y 2 %</li> <li>- Triclosan 40 %</li> </ul>	<p>Van Steenberghe y cols., 1993.</p> <p>Eckles y cols., 1990.</p>
Películas de derivados de celulosa	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Clorhexidina</li> <li>- Doxiciclina</li> </ul>	<p>Stabholz y cols., 1986.</p> <p>Taner y cols., 1994; Yeom y cols., 1997 y Schwach-Abdellaoui y cols., 2000.</p>
Película de colágeno	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tetraciclina</li> </ul>	<p>Minabe y cols., 1989.</p>

#### 2.4.3. SISTEMAS DE LIBERACIÓN "INTRAPOCKET".

Estos sistemas son colocados directamente en la bolsa periodontal y pueden ser:

- a) Sistemas tipo reservorio; la liberación del activo es controlada por la difusión del fármaco a través de una membrana polimérica.
- b) Sistemas tipo matriz; el fármaco puede ser dispersado o disuelto en la matriz y es liberado por difusión y/o erosión o disolución de la matriz, dependiendo del tipo de polímero empleado.

Los sistemas "intrapocket" pueden ser preparados con polímeros no biodegradables y polímeros biodegradables. La mayor limitación de los sistemas no degradables es que deben ser removidos



después de un periodo de tratamiento. En contraste, los sistemas biodegradables (en la mayoría de los casos) se erosionan o disuelven dentro de la bolsa periodontal.

**a) Sistemas "intrapocket" tipo reservorio.**

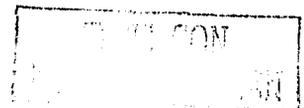
El primer sistema de este tipo fue un tubo de diálisis de acetato de celulosa con clorhidrato de tetraciclina (diámetro de 250  $\mu\text{m}$ ). Tiene una cinética de liberación de primer orden y el 95 % de su activo es liberado en las 2 primeras horas, manteniendo concentraciones terapéuticas por más de 24 horas y reduciendo patógenos periodontales [Goodson, 1979].

Posteriormente se han diseñado fibras monolíticas de polietileno, polipropileno, policaprolactona, poliuretano, celulosa y etilvinilacetato que contienen tetraciclina; [Michalowicz y cols., 1995].

También se han diseñado sistemas tipo reservorio en forma de fibras huecas que contienen gluconato de clorhexidina al 20 % [Coventry y Newman, 1982] y metronidazol al 0.5 % [Wan Yusof y cols., 1984]. Las fibras con clorhexidina liberan el 95 % del activo durante las primeras 24 horas, según estudios de liberación *in vitro* [Coventry y Newman, 1982].

**b) Sistemas "intrapocket" tipo matriz.**

Aquellos sistemas que liberan sólo por difusión son preparados usando polímeros insolubles en agua y/o polímeros biodegradables como matriz del sistema. Los sistemas que en la matriz tienen polímeros solubles en agua o polímeros biodegradables liberan su activo por difusión y por erosión o disolución de la matriz. Después de un tiempo determinado los sistemas no biodegradables deben ser retirados completamente por una persona capacitada, de lo contrario, pueden permanecer en el paciente restos del sistema, presentándose reacciones inflamatorias en los tejidos adyacentes. También, la remoción de este dispositivo es acompañada por una declinación rápida en la concentración antibacterial lo cual, a menudo, se relaciona con la recolonización de la bolsa periodontal [Tonetti y cols., 1990]. En contraste, en los sistemas biodegradables (en la mayoría de los casos) la liberación del activo y la degradación del polímero ocurre en intervalos de tiempo semejantes. En los cuadros 3 y 4 se presentan algunos ejemplos de estos sistemas.



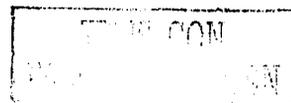
Cuadro 3. Sistemas de liberación "intrapocket" tipo matriz (no degradables).

Matriz	Forma	Principio Activo	Referencia
Poliétilmetacrilato (Orthoresin <sup>®</sup> )	Películas y Parches	- Clorhexidina, Metronidazol, - Tetraciclina - Metronidazol	Addy y cols., 1982 y Addy y Langeroudi, 1984. Yeung y cols., 1983 y Addy y cols., 1988.
Etilcelulosa	Películas	- Clorhexidina - Gluconato de clorhexidina, Clorhexidina - Metronidazol - Tetraciclina - Minociclina - Tetraciclina, Metronidazol	Friedman y Golomb, 1982 y Stabholz y cols., 1986. Soskolne y cols., 1983. Golomb y cols., 1984. Elkayam y cols., 1988. Azouri y cols., 1988. Loesche y cols., 1996 y Somayaji y cols., 1998.
Acetato de etilvinilo	Fibras	- Tetraciclina	Goodson y cols., 1983 y Tonetti y cols., 1990.
Étilmetacrilatos (Eudragit RL <sup>®</sup> )	Películas	- Clindamicina	Higashi y cols., 1990.



Cuadro 4. Sistemas de liberación "intrapocket" tipo matriz (degradables).

Matriz	Forma	Principio Activo	Referencia
Hidroxipropilcelulosa	Películas	Clorhexidina, Tetraciclina	Noguchi y cols., 1984.
Colágeno entrecruzado (Telocollagen®)	Películas, Esponjas Parches	Tetraciclina	Minabe y cols., 1989; Minabe y cols., 1989b y Minabe y cols., 1989c.
Gelatina Entrecruzada (Proteína Byco®)	Películas	Clorhexidina, Tetraciclina	Steinberg y cols., 1990.
Hidroxipropilcelulosa, copolímero S del ácido metacrílico	Película	Ofloxacina	Higashi y cols., 1990 y Kimura y cols., 1991.
Poli-ε-caprolactona, Polietilenglicol, Hidroxipropilcelulosa	Fibras	Tetraciclina	Goodson y cols., 1983 y Dunn y cols., 1983.
Ácido poliláctico	Comprimidos	Tetraciclina, Metronidazol	Collins y cols., 1989.
Ácido polihidroxibutírico	Parches	Tetraciclina, Metronidazol	Deasy y cols., 1989.
Copolímeros de ácido láctico y poliláctico	Micropartículas	Tetraciclina Minociclina	Baker y cols., 1988. Esposito y cols., 1997.
Poli-ε-caprolactona	Películas	Clorhexidina	Lawter y cols., 1990.
Monooleato de glicerilo, aceite de sésamo	Gel	Metronidazol	Ainamo y cols., 1992; Medicott y cols., 1992 y Norling y cols., 1992.

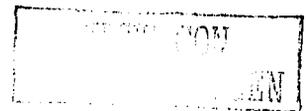


Cuadro 4 (Continuación). Sistemas de liberación "intrapocket" tipo matriz (degradables).

Matriz	Forma	Principio Activo	Referencia
Copolímeros de ácido metacrílico y metilmetacrilato (Eudragit L <sup>®</sup> y Eudragit S <sup>®</sup> )	Películas	Clindamicina	Higashi y cols., 1990.
Poli-láctico-co-glicólico	Películas	Tetraciclina	Agarwal y cols., 1993 y Webber y Mathiowitz, 1997.
Poli-orto-ésteres	Películas	Metronidazol	Vasavada y Junnarkar, 1997.
Acetato-ftalato de celulosa, Polietilenoóxido-co-propilenoóxido	Películas	Metronidazol	Gates y cols., 1994.

Las películas de polietilmetacrilato con clorhexidina, tetraciclina y metronidazol incluidas en el cuadro 3 fueron preparadas por compresión. La velocidad de liberación *in vitro* depende del tipo y cantidad de fármaco cargada en las películas. Películas que contenían 30 % p/p de fármaco (clorhexidina, tetraciclina o metronidazol) liberan, respectivamente, 57, 40 y 96.6 % de la carga total en 14 días. Las pruebas microbiológicas *in vitro* demostraron que las películas con metronidazol son más efectivas, pero no se han determinado las velocidades de liberación *in vivo*, ni la concentración de fármaco alcanzada en el fluido gingival [Addy y cols., 1982 y Addy y Langerouidi, 1984]. Se ha demostrado que la administración diaria de clorhexidina por irrigación subgingival después del raspado y alisado radicular es igualmente efectiva al tratamiento con parches de metronidazol que son colocados dentro de la bolsa periodontal y reemplazados semanalmente [Yeung y cols., 1983].

Las películas de etilcelulosa han sido producidas por la evaporación del solvente de soluciones de etilcelulosa que contienen el principio activo, disuelto o dispersado. La velocidad de liberación del activo de estos sistemas depende del tipo de solvente y del principio activo utilizados [Friedman y Golomb., 1982; Stabholz y cols., 1986 y Loesche, 1996]. En estudios *in vitro*, películas



preparadas con etanol y 5 % p/p de clorhexidina liberan el 95 % del activo en 10 días; mientras que películas preparadas con cloroformo que contenían 5, 10 y 20 % p/p de clorhexidina liberan 20, 30 y 60 % del activo, respectivamente, en un periodo de 205 días. La adición de polietilenglicol a estos sistemas favorece la velocidad de liberación del activo pues aumenta la porosidad de las películas [Friedman y Golomb, 1982].

Soskolne y colaboradores [1983] realizaron estudios *in vitro* para películas preparadas con etanol y gluconato de clorhexidina al 30 % p/p y películas preparadas con cloroformo, 30 % de clorhexidina y 10 % de polietilenglicol. Las películas con etanol liberaron 80 % de la carga total en 3 días y las de cloroformo liberan 5 % en 6 días. Se propone que el uso de etanol incrementa la fracción amorfa del polímero, lo cual favorece la difusión y por tanto la liberación del activo; así mismo, la solubilidad del activo en los diferentes solventes utilizados para preparar las películas puede modificar la velocidad de liberación. Estudios *in vivo* demostraron que el tratamiento por 9 días con películas de clorhexidina preparadas con etanol, reemplazadas cada 3 días, permite reducir patógenos periodontales hasta por 11 semanas [Soskolne y cols., 1983]. También se han preparado películas cargadas con metronidazol, tetraciclina y minociclina usando etanol y polietilenglicol, éste último favorece la liberación [Golomb y cols., 1984; Azoury y cols., 1988 y Elkayam y cols., 1988].

Diversos polímeros se han utilizado para preparar, por extrusión, fibras huecas que contienen tetraciclina; entre estos polímeros se encuentran: polietileno, polipropileno, poli- $\epsilon$ -caprolactona, poliuretano, propionato-acetato de celulosa y acetato de etilenvinilo. La velocidad de liberación *in vitro* depende del polímero utilizado, siendo más rápida la liberación a partir de fibras de polietileno y poliuretano. Las fibras de acetato de etilenvinilo son más flexibles y permiten la liberación *in vitro* de la tetraciclina hasta por 9 días [Goodson y cols., 1983 y Tonetti y cols., 1990]. Actualmente se distribuyen comercialmente fibras de acetato de etilenvinilo con tetraciclina.

Se han diseñado películas a base de hidroxipropilcelulosa que contienen clorhexidina y tetraciclina, estas películas se disuelven lentamente al entrar en contacto con saliva o fluido gingival, adhiriéndose al diente y a tejidos suaves. Estudios de liberación *in vitro* de películas con 5 % de clorhexidina o 1 % de tetraciclina liberan en una hora 90 y 80 % del activo, respectivamente. La hidroxipropilcelulosa se



disuelve en 3 horas aproximadamente. No se han realizado estudios de liberación *in vivo* ni se ha determinado la concentración del activo en el fluido gingival [Noguchi y cols., 1984].

El colágeno ha sido investigado como probable acarreador biodegradable de agentes antibacterianos hacia la bolsa periodontal. Cuando el colágeno se entrecruza utilizando formaldehído se prolonga la liberación de tetraciclina y el efecto antibacteriano puede ser mantenido por más de diez días, con una liberación controlada que alcanza una dosis efectiva en el fluido crevicular (8  $\mu\text{g/ml}$ ) [Minabe y cols., 1989a; Minabe y cols., 1989b y Minabe y cols., 1989c].

Steinberg y colaboradores [1990] han desarrollado un sistema degradable a base de gelatina entrecruzada que contiene clorhidrato de clorhexidina y diacetato de clorhexidina. El perfil de liberación de la clorhexidina es dependiente de la cantidad de clorhexidina incorporada en la película, del entrecruzamiento del polímero y de la sal de clorhexidina usada. El tiempo de liberación es corto y varía de 4 a 80 horas.

La poli-L-caprolactona es un poliéster biodegradable que ha sido propuesto para la liberación de tetraciclina y clorhexidina dentro de las bolsas periodontales. Fibras de este polímero con 25 % p/p de tetraciclina colocadas dentro de la bolsa periodontal alcanzan una concentración de 1600  $\mu\text{g/ml}$ . Dicho polímero también ha sido utilizado para preparar películas por evaporación de solvente observándose una liberación *in vitro* de orden cero durante 24 horas, la velocidad de liberación depende de la cantidad de activo incorporado y de la forma que se emplee (base o diacetato [Dunn y cols., 1983, Goodson y cols., 1983 y Lawter y cols., 1990].

En un estudio realizado *in vivo* con partículas de ácido metacrílico dispersadas en películas de hidroxipropilcelulosa con 10 % de ofloxacina se demostró que aunque la ofloxacina puede permanecer más tiempo que otros activos en la bolsa periodontal y que no hay una reducción estadísticamente significativa en la población de microorganismos subgingivales, con respecto a grupos control. El tratamiento se aplicó una vez a la semana durante 35 días [Higashi y cols., 1990 y Kimura y cols., 1991]

Los copolímeros del ácido láctico y poliláctico han sido ampliamente estudiados como sistemas de liberación "intrapocket" en diferentes presentaciones: parches, comprimidos, películas y micropartículas



[Baker y cols., 1988; Agarwal y cols., 1993; Esposito y cols., 1997 y Webber y Mathiowitz, 1997].

Películas de poliláctico-co-glicólico con 5 y 25 % de tetraciclina logran alcanzar concentraciones efectivas hasta por 14 días una vez colocadas en las bolsas periodontales, a pesar de que solo es liberado 30-69 % de la carga total de activo. Las películas de este polímero son pobremente retenidas en las bolsas periodontales, por lo que fueron aseguradas alrededor del diente con un adhesivo de cianoacrilato [Agarwal y cols., 1993 y Webber y Mathiowitz, 1997].

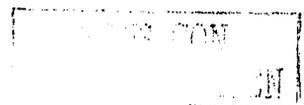
En los últimos años, se han utilizado poli( $\alpha$ -hidroxiácidos) biodegradables para la preparación de micropartículas que puedan colocarse dentro de la bolsa periodontal, entre estos polímeros los más comunes son el ácido poliláctico y el ácido poliláctico-co-glicólico. La velocidad de liberación de activos a partir de estos polímeros es influenciada por la relación láctico/glicólico, el peso molecular, la cristalinidad del copolímero y el pH del medio. Por ejemplo, la liberación de tetraciclina se incrementa cuando aumenta el pH [Baker y cols., 1988 y Esposito y cols., 1997].

Principios activos como tetraciclina y minociclina han sido incorporados en micropartículas. Baker y colaboradores [1988] proponen la suspensión de micropartículas con tetraciclina en Pluronic<sup>®</sup> F127. Este material forma un gel a temperatura corporal, manteniendo así las nanopartículas en la bolsa periodontal. En estudios realizados en monos se logró mantener niveles efectivos en el fluido crevicular hasta por 4 días. Sin embargo, para micropartículas del mismo polímero con minociclina se alcanzan concentraciones terapéuticas hasta por 14 días en bolsas periodontales de perros a los que se aplicó una dosis única de micropartículas liofilizadas [Baker y cols., 1988 y Esposito y cols., 1997].

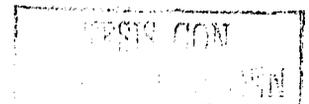
#### 2.4.4. SISTEMAS DE APLICACIÓN LOCAL DISPONIBLES COMERCIALMENTE.

En Estados Unidos y otros países se comercializan diversos sistemas, que proveen de manera local medicamentos a fin de tratar los padecimientos periodontales. Los cinco sistemas comercializados más conocidos se señalan a continuación:

- a) Actisite<sup>™</sup> son pequeñas fibras de acetato de etilvinilo con 25 % de clorhidrato de tetraciclina; deben ser insertadas dentro de la bolsa periodontal, se colocan con un aplicador y se aseguran con un adhesivo de cianoacrilato. Deben reemplazarse cada 7 días pues no son



- resorbibles; proveen una emisión controlada de tetraciclina, manteniendo niveles de 600 µg/ml en el fluido gingival crevicular durante 10 días [Drisko y cols., 1995 y Lowenguth y cols., 1995].
- b) Elyzol<sup>®</sup> se comercializa en Estados Unidos y Europa, es un gel de monooleato de glicerol y aceite de sésamo que contiene 25 % de metronidazol. Se inyecta directamente en la bolsa periodontal, aumentando su viscosidad al contacto con fluidos acuosos. Mantiene niveles terapéuticos por periodos de 2 a 3 días y debe ser usado dos veces en un lapso de tres semanas [Stelzel y Flores de Jacobi, 1997 y Noyan y cols., 1997].
- c) PerioChip<sup>™</sup> es una película delgada de forma rectangular con uno de los extremos cóncavos, sus dimensiones son: 4 mm X 5 mm X 350 µm, tiene un peso de 7.4 mg. El chip contiene 2.5 mg de gluconato de clorhexidina (como base) incorporada en una matriz biodegradable de gelatina. PerioChip<sup>™</sup> se biodegrada completamente en la bolsa periodontal aproximadamente en 7 días. El chip libera aproximadamente el 40 % del activo durante las primeras 24 horas, probablemente por un fenómeno de difusión, pero mantiene una liberación prolongada y constante durante 7 días, paralelamente, el chip sufre degradación enzimática [Soskolne y cols., 1997 y Goffin, 1998].
- d) Dentomycin<sup>®</sup> es un gel resorbible compuesto por hidroxietilcelulosa, triacetina, copolímero aminoalquil-metacrilato y cloruro de magnesio, contiene 2 % de minociclina y debe administrarse una vez a la semana [Timmermans y cols., 1996 y Graca y cols., 1997].
- e) Atrigel<sup>™</sup> es un gel resorbible formado por una base polimérica de ácido poli(D-L-láctico) en N-metil-2-pirrolidona, contiene 10 % de doxiciclina. Es inyectado con una cánula dentro de la bolsa periodontal, donde solidifica *in situ* y provee una liberación controlada del activo durante aproximadamente 7 días [Garret y cols., 1997 y Polson y cols., 1997].



## 2.5. SISTEMAS ACARREADORES DE FÁRMACOS.

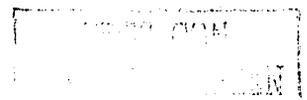
En la actualidad uno de los principales objetivos del farmacéutico es el diseño de nuevos sistemas o dispositivos de liberación de fármacos que controlen la liberación del agente farmacológico en el sitio de acción a una velocidad terapéuticamente óptima. De forma general, todos los sistemas de liberación controlada tratan de mejorar la eficacia de un tratamiento controlando la liberación temporal y espacial del fármaco. En lo referente al control temporal, el propósito de los sistemas de liberación controlada es liberar el fármaco durante un mayor periodo de tiempo o bien, entregarlo a un tiempo específico durante el tratamiento. El control de la distribución espacial del fármaco permite a los sistemas de liberación controlada dirigir el fármaco a un sitio específico dentro del cuerpo [Ulrich y cols., 1999]

La propuesta de crear sistemas dirigidos de entrega de fármacos fue introducida por Paul Ehrlich en 1906 con su concepto de "balas mágicas". Ehrlich imaginó que podrían desarrollarse sistemas que únicamente actuaran sobre un sitio blanco, depositando en él la sustancia activa. Los acarreadores coloidales de fármacos por su pequeña talla de partícula (generalmente menor a  $1\mu\text{m}$ ) parecieran hacer posible la propuesta de Ehrlich [Kreuter, 1994].

Los Sistemas Coloidales Acarreadores de Fármacos (SCAF) incluyen liposomas, niosomas, sistemas micelares, complejos macromoleculares, microemulsiones y sistemas micro- y nanoparticulados. Todos estos sistemas son semejantes en tamaño y forma. Debido principalmente a los problemas de estabilidad y de potencial escalamiento industrial de los liposomas, las nanopartículas se han posicionado como los SCAF más prometedores. reflejo de ello son el gran número de investigaciones destinadas a probar su efectividad.

Históricamente los primeros métodos usados para producir nanopartículas derivaron de la fabricación de dispersiones látex en la industria de polímeros, notables esfuerzos se han realizado para adaptar esta tecnología a la producción de acarreadores coloidales poliméricos que cumplan con los requerimientos farmacéuticos necesarios [De Jaeghere y cols , 1999].

Las tecnologías de producción de dispersiones coloidales a partir de polímeros no biodegradables no son un tema muy antiguo en el ámbito farmacéutico. Estas dispersiones coloidales han sido definidas como "pseudolátexes". Actualmente los pseudolátexes están siendo usados para recubrimiento de



formas farmacéuticas tales como tabletas o granulados debido a sus propiedades reológicas y formadoras de películas [Alonso, 1996].

El sistema coloidal acarreador de fármacos ideal, compuesto de moléculas de acarreador y fármaco, debe satisfacer los siguientes criterios:

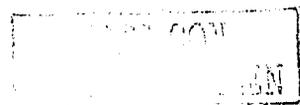
1. Ser aceptado farmacéuticamente, ser estable y de fácil administración.
2. Ser susceptible de esterilización (si se contempla para uso parenteral).
3. Debe de transportar el fármaco al sitio de acción deseado.
4. Debe liberar el fármaco a una velocidad adecuada y conveniente hacia el sitio de acción.
5. El acarreador debe ser no tóxico y biodegradable. [Marty y cols., 1978 y Oppenheim, 1986].

Es difícil que alguno de los sistemas coloidales cumplan a la perfección con todos los puntos anteriores.

## 2.6. NANOPARTÍCULAS.

Las nanopartículas pueden ser definidas como partículas coloidales sólidas con talla submicrónica (entre 10 y 1000 nm). Están formadas generalmente por materiales macromoleculares biodegradables o no y pueden utilizarse como acarreadores de fármacos. Comparadas con otros acarreadores coloidales, las nanopartículas presentan una mayor estabilidad cuando están en contacto con fluidos biológicos y su naturaleza polimérica las hace susceptibles de convertirse en sistemas de liberación prolongada y controlada. Además de ser más estables en presencia de fluidos biológicos y durante el almacenamiento ofrecen posibilidad de escalamiento [Quintanar-Guerrero y cols., 1998a].

Generalmente el término nanopartícula es usado como el nombre colectivo para describir tanto a las nanoesferas como a las nanocápsulas. La diferencia entre éstas dos formas está ligada a la morfología y a la arquitectura de la entidad. Las nanoesferas están formadas por una densa matriz polimérica donde el principio activo puede ser dispersado y/o adsorbido en la superficie de la partícula. Las nanocápsulas están compuestas de un núcleo aceitoso envuelto por una membrana polimérica, de tal manera que los activos pueden ser adsorbidos en la superficie, pueden ser disueltos en un aceite constituyendo el corazón lipofílico de la nanocápsula o bien, el mismo aceite puede ser la sustancia terapéutica [Quintanar-Guerrero y cols., 1997a]. Algunos autores [Alonso y cols., 1996] utilizan como



sinónimos únicamente los términos nanoesfera y nanopartícula, separándolos de las nanocápsulas; sin embargo las definiciones de éstos conceptos son las mismas que se señalaron con anterioridad. En este trabajo se manejará el término nanopartícula para incluir tanto a nanoesferas como a nanocápsulas. La figura 3 incluye una representación esquemática de estas entidades.

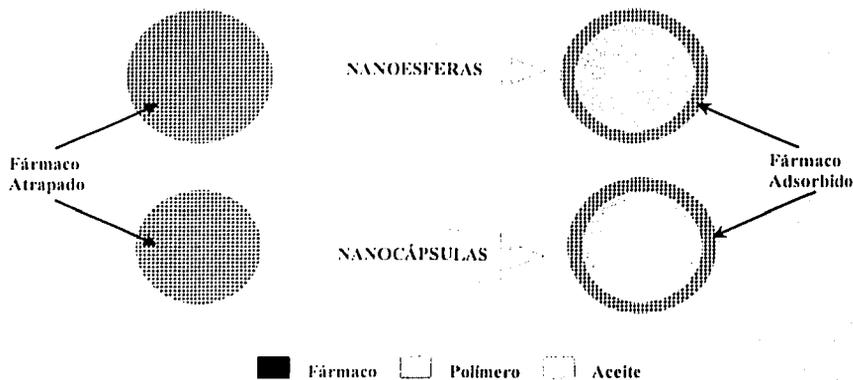
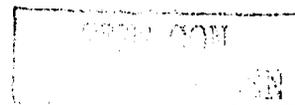


Figura 3. Representación esquemática de las Nanoesferas y las Nanocápsulas.

## 2.6.1. PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS.

### 2.6.1.1. Generalidades.

Las nanopartículas pueden ser preparadas por polimerización de monómeros dispersos y por dispersión de polímeros preformados. Los materiales usados para la preparación de nanopartículas pueden dividirse en dos grupos: polímeros naturales hidrofílicos y polímeros sintéticos hidrofóbicos. La tendencia actual es el uso de polímeros biodegradables y biocompatibles para la preparación de sistemas de liberación debido a su habilidad para ser reabsorbidos por el cuerpo, lo cual evita que deban extraerse después de un lapso de tiempo. Algunos de estos polímeros fueron originalmente investigados para otras aplicaciones biomédicas por lo que existen suficientes publicaciones que soportan su seguridad y la autorización de varias formulaciones para uso humano con estos materiales. Las rutas más comunes de biodegradación *in vivo* son la hidrólisis y el rompimiento o división de la cadena principal del polímero por acción enzimática. Sin embargo, para algunos polímeros la división de la cadena principal por



alguno de los extremos puede producir polímeros u oligómeros solubles en agua que pueden ser excretados.

**a) Polímeros Naturales Hidrofílicos.**

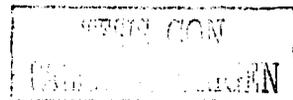
En este grupo se incluyen dos categorías de polímeros: proteínas tales como gelatina y albúmina; y polisacáridos, tales como alginato, dextrán y quitosán. El uso de polímeros naturales presenta algunas desventajas como incertidumbre de su origen, potencial antigenicidad y problemas de reproducibilidad lote a lote, además de requerir condiciones específicas para su degradación. La información disponible acerca de la seguridad del uso de este tipo de polímeros es limitada; se requiere llevar a cabo mayores investigaciones para asegurar la inocuidad de estos sistemas, sobre todo en lo referente a la administración parenteral.

**b) Polímeros Sintéticos Hidrofóbicos.**

La mayoría de polímeros que han sido usados en la preparación de dispersiones de nanopartículas han sido previamente empleados para preparar microsferas. Como consecuencia, las propiedades fisicoquímicas y biológicas de estos materiales han sido ampliamente estudiadas. Los polímeros empleados pueden ser sintetizados antes o durante la preparación de las nanopartículas. El primer grupo incluye poliésteres tales como poli- $\epsilon$ -caprolactona (PECL), la familia del ácido poliláctico (PLA), la del ácido poliglicólico (PGA) y sus copolímeros como el ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA). El segundo grupo es representado por los polialquilcianoacrilatos (PACA) [Brannon-Peppas, 1995; Alonso, 1997 y Ulrich y cols., 1999]

Los poliésteres son el sistema biodegradable mejor caracterizado y más ampliamente estudiado. En el año 1967 se reporta la primera patente para el uso de una sutura resorbible de PLA, en 1970 se comercializa la primera sutura biodegradable de PGA y hacia 1971 el PLA ya es estudiado como un material para la liberación de fármacos.

Los poliésteres derivados de tres monómeros (láctico, glicólico y caprolactona) son los más comúnmente empleados en el área clínica. La ruta sintética predominante para producción de poliésteres es por polimerización de los monómeros obtenidos después de la apertura del anillo de la lactona cíclica correspondiente (figura 4).



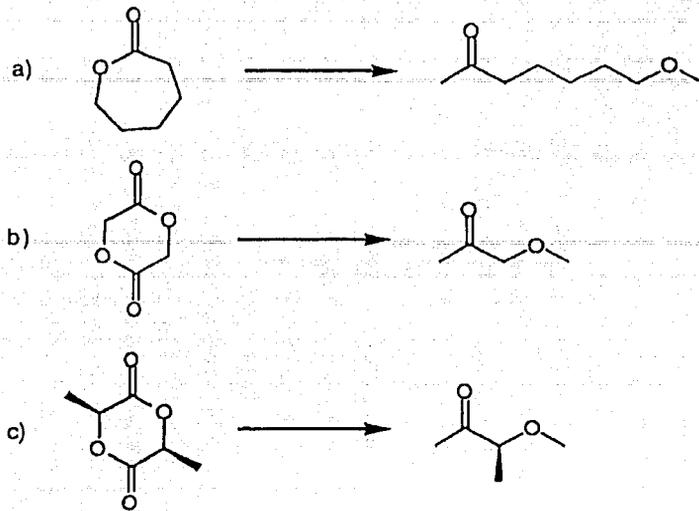


Figura 4. Apertura del anillo de lactonas cíclicas para obtener los monómeros de: a) Poli-ε-caprolactona (PCL); b) Ácido poliglicólico (PGA) y c) Ácido poliláctico (PLA).

El ácido láctico es una molécula quiral por lo que existen isómeros L y D. Las formas ópticamente activas son el ácido poli-L-láctico (L-PLA) y el ácido poli-D-láctico (D-PLA). La mezcla racémica ópticamente inactiva es el poli-D,L-láctico (DL-PLA). El homopolímero L-PLA y el copolímero PLGA o ácido poliláctico-co-glicólico son los más utilizados. La forma en que se encuentra en la naturaleza el ácido láctico es la forma L, por lo que se considera que el L-PLA es más biocompatible. Estos polímeros son derivados a partir de monómeros que son metabolitos naturales del cuerpo, así, la degradación de estos materiales produce el correspondiente hidroxiláctico convirtiéndolos en sistemas seguros para su uso *in vivo*. La biocompatibilidad de los monómeros es el fundamento de la biocompatibilidad del polímero. El ácido láctico y el glicólico entran al ciclo de los ácidos tricarbónicos o ciclo de Krebs, son metabolizados y posteriormente eliminados del cuerpo como bióxido de carbono y agua.

El PGA es altamente cristalino debido a la carencia del sustituyente metilo del PLA; la mezcla racémica del PLA es amorfa. El PLA es más hidrofóbico que el PGA; se degrada más lentamente ya que el grupo metilo le da cierta protección a la hidrólisis. Por lo anterior, los copolímeros de PLGA con alta proporción de monómeros del ácido láctico son menos hidrofílicos, absorben menos agua y en consecuencia se degradan más lentamente. En el cuadro 5 se presentan las temperaturas de transición vítrea y los puntos de fusión de algunos poliésteres.

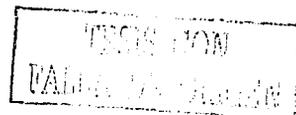
Cuadro 5. Temperaturas de transición vítrea y puntos de fusión de algunos poliésteres.

T<sub>g</sub> = Temperatura de Transición Vítrea y T<sub>m</sub> = Temperatura de Fusión

Polímero	T <sub>g</sub> (°C)	T <sub>m</sub> (°C)
Poli-L-láctico	60-67	172-174
Poli-DL-láctico	57-59	-----
Poli-D-láctico	60-67	172-174
Poli-glicólico	36	230
Poli-DL-láctico-co-glicólico (25:75)	60	-----
Poli-DL-láctico-co-glicólico (50:50)	58	-----
Poli-DL-láctico-co-glicólico (70:30)	58	-----
Poli-DL-láctico-co-glicólico (85:15)	45	-----
Poli-ε-caprolactona	-65	63

Las propiedades físicas tales como el peso molecular y el índice de polidispersidad afectan la fuerza mecánica del polímero y su habilidad para ser formulado como un dispositivo para liberación de fármacos. También estas propiedades pueden controlar la velocidad de degradación del polímero y su hidrólisis.

La fuerza mecánica, la capacidad para resistir la hidrólisis y la velocidad de degradación están directamente relacionadas con la cristalinidad del polímero. La cristalinidad del PLGA es dependiente del tipo y relación molar de los monómeros que lo componen (láctico y glicólico). El PLGA con una relación 50:50 de láctico y glicólico son hidrolizados mucho más rápido que aquellos que contienen



una mayor proporción de cualquiera de los dos monómeros. Copolímeros del PLGA preparados con L-PLA y PGA son cristalinos mientras que aquellos preparados con D,L-PLA y PGA son amorfos. El grado de cristalinidad y el punto de fusión esta relacionado directamente con el peso molecular del polímero.

Todos los polímeros de esta familia son insolubles en agua pero se degradan por ataque hidrolítico del enlace éster. Las propiedades de degradación son afectadas por la cristalinidad, el peso molecular, la temperatura de transición vítrea y la hidrofobicidad del monómero. La solubilidad de los polímeros en solventes orgánicos es un factor importante que debe ser considerado en la fabricación de sistemas de liberación de fármacos. Los homopolímeros de DL-, D-, y L-láctico son muy solubles en hidrocarburos halogenados, acetato de etilo, tetrahidrofurano, dioxano y algunos otros solventes. Copolímeros de láctico-glicólico con contenido de glicólico menor al 50 % muestran características similares a los homopolímeros de láctico. El ácido poli-glicólico y los copolímeros ricos en glicólico son prácticamente insolubles [Brannon-Peppas, 1995; Li y Vert, 1999; Ulrich y cols., 1999; Griffith, 2000 y Jain, 2000].

#### 2.6.1.2. Métodos de preparación.

Las nanopartículas pueden ser preparadas por métodos que involucran la polimerización de monómeros dispersos o por dispersión de polímeros preformados utilizando materiales de origen natural o sintético. De forma general, la preparación de nanopartículas a partir de la polimerización de monómeros presenta diversos inconvenientes pues los productos de la reacción pueden ser no compatibles entre sí o con el activo o incluso provocar irritación, además de dejar residuos más o menos tóxicos tales como monómeros, oligómeros, catalizadores e iniciadores. Además, cuando la polimerización es inducida por radiación se pueden degradar los componentes de las nanopartículas. Por lo anterior, desde el punto de vista farmacéutico, se prefiere la preparación de nanopartículas a partir de polímeros ya formados. La elección del método de producción de nanopartículas depende esencialmente del tipo de polímero que se utilizará (biocompatibilidad, degradación, perfil de liberación deseado); de las características del activo que será asociado con las partículas (solubilidad, toxicidad) y de la ruta de administración y la aplicación biomédica que se pretende [De Jaeghere y cols., 1999].



Quintanar-Guerrero y colaboradores [1998] reúnen las técnicas de preparación de nanopartículas a partir de polímeros preformados en cuatro categorías:

- a) Emulsificación- evaporación.
- b) Desplazamiento de solvente.
- c) Efecto "Salting-out" o inmiscibilidad por soluciones salinas.
- d) Emulsificación- difusión.

Las técnicas anteriores presentan ciertos aspectos en común, tales como el uso de solventes orgánicos que contiene los componentes de la nanopartícula y que funciona como fase interna durante la preparación y una fase acuosa externa que contiene los estabilizantes (medio de dispersión). Todas tienen baja eficiencia de encapsulación para activos parcialmente y altamente solubles al agua (incluyendo péptidos y proteínas) debido a su tendencia de dirigirse a dirigirse a la fase externa. Todos los métodos anteriores permiten la preparación de nanoesferas pero las nanocápsulas sólo pueden prepararse por el método de desplazamiento de solvente y el de emulsificación- difusión.

A continuación se describen de manera muy general las etapas más importantes en estas técnicas, señalando algunos aspectos importantes para las dos técnicas que serán empleadas en este proyecto, la de desplazamiento de solvente y la de emulsificación- difusión.

#### **a) Emulsificación-Evaporación.**

En esta técnica el polímero y el activo son disueltos en un solvente orgánico volátil inmiscible al agua, el cual es emulsificado en una solución acuosa que contiene un estabilizante formando una emulsión aceite en agua (o / w). Esta emulsión cruda es entonces expuesta a una fuente de alta energía tal como un dispositivo de ultrasonido o pasado a través de homogeneizadores, molinos coloidales o microfluidizadores, con el objeto de reducir el tamaño del glóbulo. Finalmente se remueve el solvente orgánico, a temperatura ambiente o con calor por agitación y/o con rotavapor a presión reducida, para obtener una dispersión fina de nanoesferas.

Esta técnica, esquematizada en la figura 5, fue utilizada por primera vez para la preparación de nanoesferas por Gurny y colaboradores [1981] y se fundamenta en el procedimiento propuesto por Vanderhoff en 1979. Este método fue adoptado posteriormente para la producción de nanoesferas de



diferentes polímeros incluidos PLGA, PCL, PHB (poli-β-hidroxibutarato), copolímeros del ácido acrílico y derivados de celulosa. Los solventes orgánicos usados comúnmente son cloroformo y cloruro de metileno, algunos agentes estabilizantes que se han utilizado en este métodos incluyen polisorbato, poloxameros, dodecil sulfato de sodio y polivinilalcohol. Este método ha permitido el encapsulamiento con alta eficiencia de sustancias tales como testosterona, indometacina, ciclosporina A y acetato de triamcinolona [Quintanar-Guerrero y cols., 1998a y De Jaeghere y cols., 1999].

Recientemente, Blanco y Alonso [1997] han propuesto el encapsulamiento de albúmina bovina formando una doble emulsión agua/aceite/agua (w/o/w) alcanzando eficiencias de encapsulamiento hasta del 70 %.

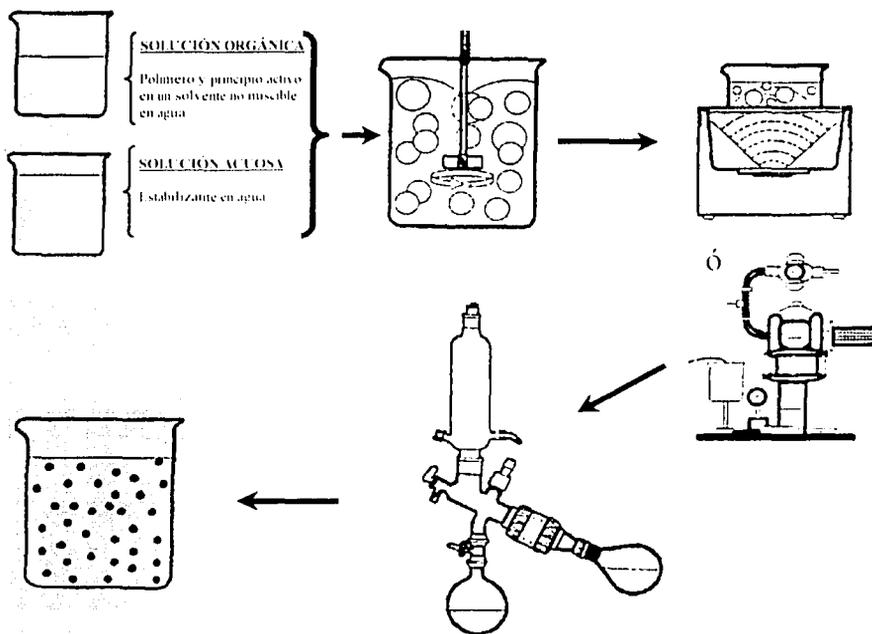


Figura 5: Representación esquemática del método de emulsificación-evaporación para preparar nanoesferas.

## b) Desplazamiento de solvente.

Esta técnica fue propuesta por Fessi y colaboradores en 1981 y se esquematiza en la figura 6. Involucra el uso de un solvente orgánico que es completamente miscible con la fase acuosa, típicamente acetona aunque también puede emplearse etanol o metanol. Este método permite la obtención de nanoesferas y nanocápsulas sin necesidad de formar previamente una emulsión.

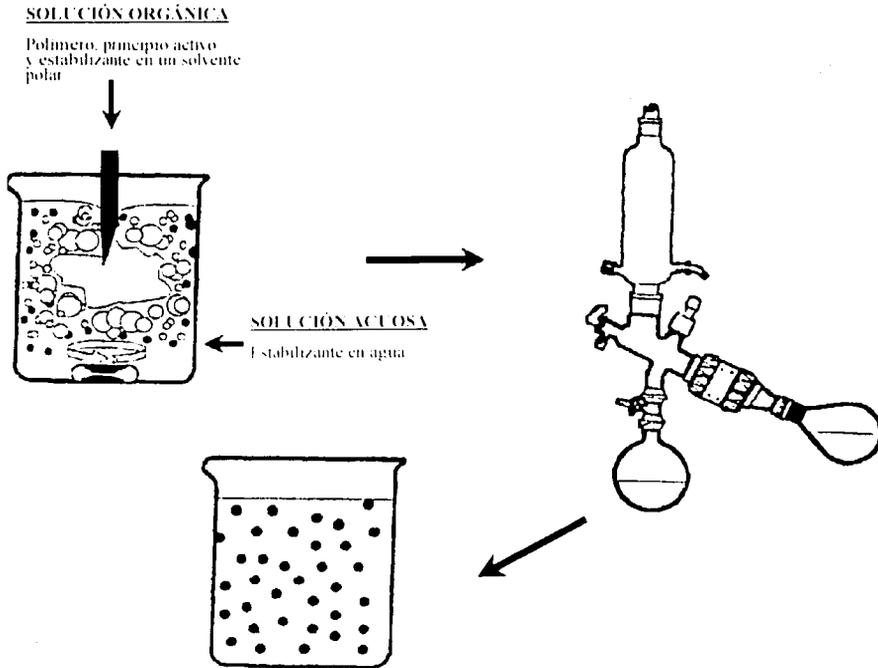


Figura 6. Representación esquemática del método de desplazamiento de solvente para preparar nanoesferas y nanocápsulas.

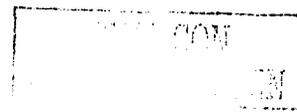
En este caso la precipitación del polímero es inducida directamente en un medio acuoso (conteniendo o no un surfactante) por la adición de la fase acuosa a la solución del polímeros con agitación magnética. Después de la formación de las nanopartículas, el solvente es removido a presión reducida.

La aplicación de este método se limita a fármacos que son muy solubles en solventes polares, pero ligeramente solubles en agua para evitar pérdida de fármaco durante la difusión del solvente, por ejemplo, indometacina. De hecho, la principal limitación del método es la difícil selección del sistema polímero/fármaco/solvente/no-solvente que permita altas eficiencias de encapsulamiento y rendimientos aceptables. En general, este método se ha llevado a cabo con bajas concentraciones de polímero en la fase orgánica. En esos casos, la dispersión del polímero y partículas de tamaños pequeños se obtienen fácilmente. En contraste, cuando se aumenta la cantidad de polímero en la fase orgánica (por ejemplo, para lotes más grandes) se forman agregados y se tienen bajos rendimientos. [Quintanar-Guerrero y cols., 1998a y De Jaeghere y cols., 1999].

El mecanismo de formación de las nanopartículas por esta técnica ha sido explicado por la turbulencia interfacial generada durante el desplazamiento del solvente. La mutua miscibilidad entre solventes provoca una violenta propagación del solvente polar de donde las minúsculas gotas son arrancadas de la interfase durante el proceso de difusión. Estas gotas son rápidamente estabilizadas por el agente usado para este propósito (alcohol polivinílico, por ejemplo), hasta que se completa la difusión del solvente y entonces se da la agregación del polímero.

Este método también se conoce con el término nanoprecipitación; sin embargo, es importante señalar que de acuerdo con el mecanismo descrito, la formación de las nanopartículas es debida a la agregación del polímero desde las gotas de la emulsión y aparentemente no se involucran fenómenos de nucleación y crecimiento del cristal [Quintanar-Guerrero y cols., 1998a y De Jaeghere y cols., 1999].

Niwa y colaboradores en 1993 propusieron el método de emulsificación espontánea y difusión del solvente para la preparación de nanocápsulas de poliláctico-co-glicólico con 5-fluorouracilo e indometacina. Este proceso es sólo una modificación del método de desplazamiento de solvente utilizando mezclas de solventes orgánicos, uno inmisible y otro miscible en agua (cloruro de metileno y acetona) para facilitar el encapsulamiento de sustancias hidrofílicas. También se utiliza una solución acuosa de polivinilalcohol para formar la emulsión. La acetona juega un papel importante para mejorar la disolución de ciertas sustancias en la fase orgánica y favorece la dispersión de la fase orgánica en la fase acuosa externa lo cual permite la formación de partículas de tamaño submicrónico; cabe señalar que utilizando únicamente diclorometano no es posible obtener esferas con diámetros menores a 1  $\mu\text{m}$ .



## c) "Salting-out".

Este proceso fue propuesto por Bindschaedler y colaboradores en 1990 y posteriormente fue optimizado por Allémann y colaboradores [1992] y se esquematiza en la figura 7.

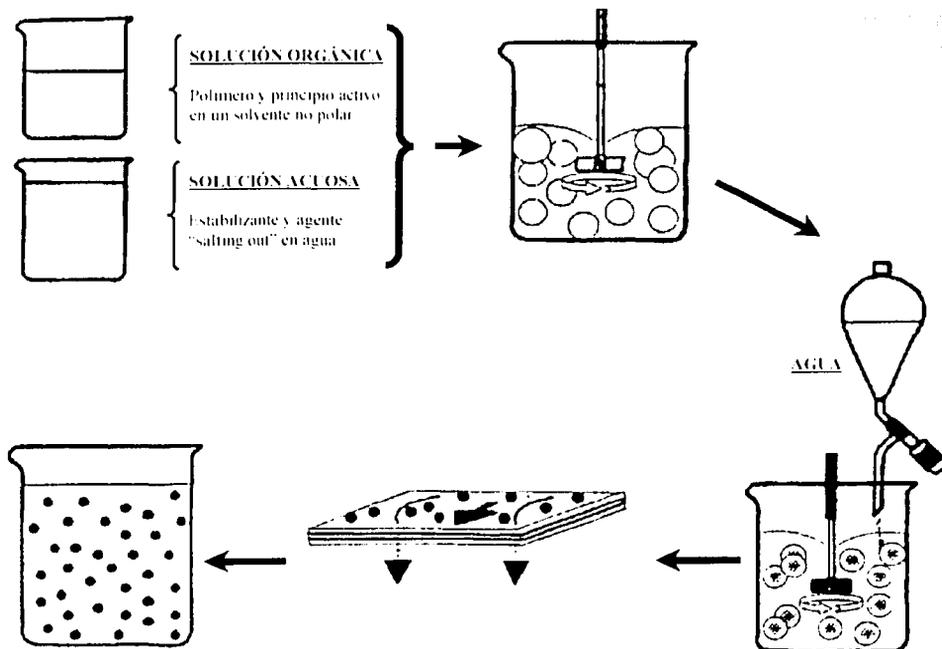


Figura 7. Representación esquemática del método de "salting out" para preparar nanoesferas.

El proceso está basado en la separación (inmiscibilidad) de un solvente originalmente acuosoluble de soluciones acuosas por el efecto de la adición de sales. Generalmente se utiliza acetona como solvente acuosoluble, debido a sus propiedades solubilizantes y su conocida separación de soluciones por electrolitos. El polímero y activo son disueltos en acetona y esta solución se emulsifica con agitación mecánica vigorosa en un gel acuoso que contiene el electrolito (acetato de magnesio o cloruro de



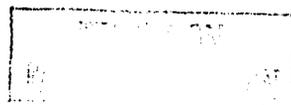
magnesio) y un estabilizante coloidal como el polivinilalcohol. Esta emulsión aceite/agua (o/w) se diluye con un volumen de agua o soluciones acuosas para permitir la difusión de la acetona hacia la fase acuosa, induciendo así la formación de nanoesferas. Finalmente el solvente y el electrolito son eliminados por filtración tangencial. Cabe señalar que Allémann y colaboradores [1992] utilizaron como solvente orgánico el tetrahidrofurano y como agente "salting out" la sucrosa (no electrolito), lo que resalta la versatilidad de este método.

Aunque el mecanismo de formación no ha sido propuesto, éste puede tener cierta similitud con el observado por la técnica de desplazamiento de solvente. Las ventajas de esta técnica radican en la posibilidad de incorporar altas cantidades de polímero y activo con excelentes rendimientos, además existe la posibilidad de escalamiento industrial. Por otro lado, está técnica se limita a activos lipofílicos, electrolitos que permitan separación de fases sin precipitación y estabilizantes solubles y compatibles con los electrolitos y que no coaccrven en presencia del solvente orgánico [Quintanar-Guerrero y cols., 1998a y De Jaeghere y cols., 1999].

#### d) Emulsificación- Difusión.

Este método puede ser considerado como una modificación del proceso de "salting-out", pero suprimiendo el uso de sales y por tanto evitando prolongadas etapas de purificación. Involucra el uso de solventes parcialmente miscibles con agua, los cuales son previamente saturados en agua con el objeto de asegurar el equilibrio termodinámico de ambos líquidos. El polímero es disuelto en el solvente (saturado con agua) y esta fase orgánica se emulsifica con agitación vigorosa en una solución acuosa que contiene el estabilizante. La subsecuente adición de agua al sistema causa que el solvente difunda hacia la fase externa, dando como resultado la formación de nanopartículas orgánico [Quintanar-Guerrero y cols., 1998a y De Jaeghere y cols., 1999]

El mecanismo de formación de nanopartículas por este método ha sido revisado bajo diferentes condiciones de preparación y por métodos turbidimétricos [Quintanar-Guerrero y cols., 1997b]. Se ha reportado que cada gota de la emulsión produce varias nanopartículas y que estas son formadas por fenómenos interfaciales durante la difusión del solvente. Sin embargo, estos fenómenos no pueden ser explicados completamente por los efectos de convección causados por la turbulencia interfacial, por lo



que se sugiere que las nanopartículas se forman debido a una inestabilidad fisicoquímica producida por el transporte de solvente por un mecanismo similar al usado para explicar los procesos de emulsificación espontánea. La idea básica es que la difusión del solvente desde los glóbulos acarrea moléculas hacia la fase acuosa, formando regiones locales de supersaturación, desde las cuales son formados nuevos glóbulos o agregados de polímeros (no totalmente desolvatados). La estabilización de estas "protonanopartículas" por la presencia de un estabilizante es muy importante para evitar su colascencia y la formación de aglomerados. Entonces, si el estabilizante permanece en la interfase líquido-líquido durante el proceso de difusión y su efecto protector es adecuado, se formarán las nanopartículas después de que se ha completado la difusión del solvente [Quintanar-Guerrero y cols., 1998a]. El proceso se presenta en la figura 8

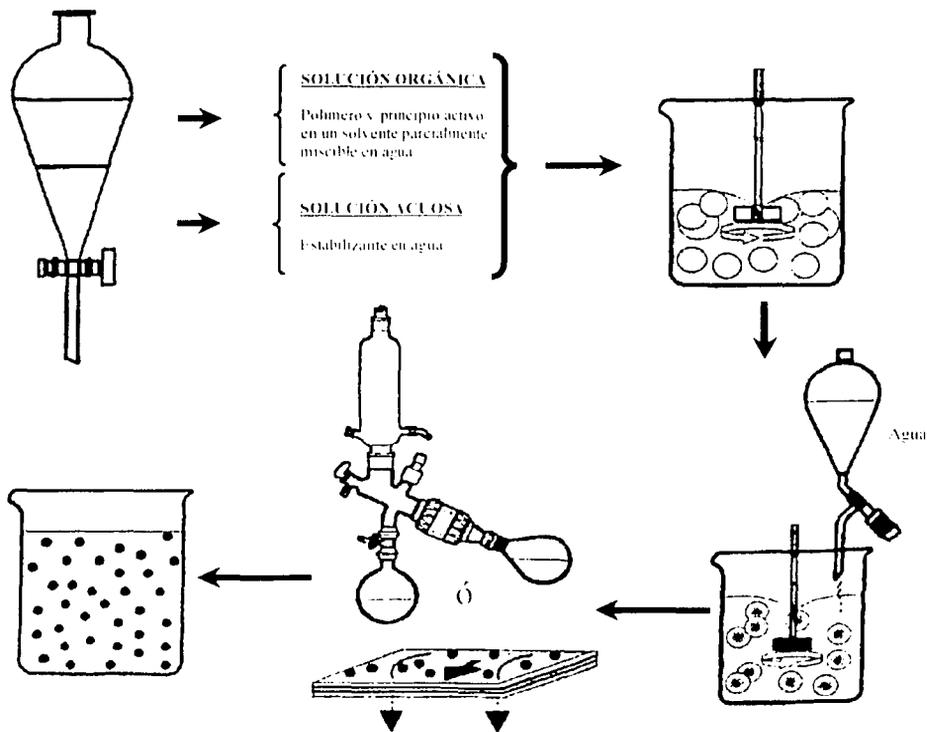


Figura 8. Representación esquemática del método de "emulsificación-difusión" para preparar nanoesferas y nanocápsulas



Algunos solventes que han sido utilizados son alcohol bencílico, carbonato de propileno, acetato de etilo, acetato de metilo, acetato de isopropilo y metiltilcetona; como estabilizante pueden utilizarse poloxameros o polivinilalcohol. El tipo de solvente y estabilizante a utilizar se selecciona de acuerdo al tipo de polímero que se empleará y al fármaco que se pretende encapsular.

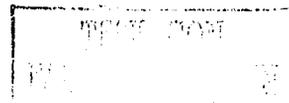
Esta técnica ofrece algunas ventajas sobre los otros métodos, tales como el uso de solventes orgánicos aceptados farmacéuticamente, no requiere de etapas de homogeneización, se obtienen altos rendimientos, se tienen alta reproducibilidad lote a lote y es susceptible de escalamiento industrial. Las principales desventajas es que se requiere eliminar grandes volúmenes de agua de la suspensión y la pérdida de activos acuosolubles hacia la fase acuosa saturada durante la etapa de emulsificación [Quintanar-Guerrero y cols , 1997c y Quintanar-Guerrero y cols , 1998a].

Ganem-Quintanar y colaboradores [1998] prepararon nanopartículas biodegradables de ácido poliláctico por la técnica de emulsificación difusión, las nanoesferas obtenidas tienen una talla de 300 nm y fueron cargadas con un marcador fluorescente (rojo de nilo). Se realizaron estudios *ex vivo* con mandíbula porcina y mediante microscopía confocal laser se analizó la capacidad de las nanopartículas de penetrar a través del epitelio de unión de la región dentogingival. Los cortes ópticos realizados demostraron que después de 6 horas de contacto las nanopartículas habían penetrado 45  $\mu\text{m}$  por debajo de la superficie. Lo anterior ofrece una nueva alternativa para la aplicación de las nanopartículas en el tratamiento local de enfermedades periodontales.

## 2.6.2. LIBERACIÓN DE FÁRMACOS A PARTIR DE NANOPARTÍCULAS.

Como se señaló anteriormente, durante las últimas décadas se ha tenido un amplio incremento en el interés por el uso de sistemas dispersos como acarreadores de fármacos; entre éstos se encuentran liposomas, micropartículas, nanopartículas y emulsiones submicrónicas. El interés en estos sistemas es su potencial para transportar fármacos a sitios específicos; además debido a su tamaño (menos de 1 micrómetro) pueden penetrar fácilmente los capilares de diámetro muy pequeño.

Una característica física central en este tipo de sistemas acarreadores es el perfil de liberación del fármaco que contienen. En otras palabras se requiere conocer la fracción de fármaco que se ha liberado desde el sistema disperso en función del tiempo, después de que el sistema ha sido administrado.



Entendiendo por administrado, en este caso, el fármaco que el acarreador está cediendo, sin restricciones, al entorno [Washington, 1990].

#### 2.6.2.1. Mecanismos de liberación.

En general, la liberación del o de los fármacos contenidos en las nanopartículas puede ocurrir por los siguientes mecanismos:

- a) Desorción del fármaco enlazado a la superficie de la partícula
- b) Difusión a través de la matriz de la nanopartícula
- c) Difusión a través de la pared polimérica, en el caso de nanocápsulas
- d) Erosión de la matriz de la nanopartícula
- e) Combinación de procesos de erosión y difusión.

La velocidad de liberación de los fármacos a partir de las nanopartículas está influenciada por el mecanismo de liberación, el coeficiente de difusión y la velocidad de biodegradación. Las nanopartículas también pueden interactuar con fluidos biológicos y membranas biológicas; como consecuencia, la liberación de fármacos *in vitro* puede ser diferente a la liberación *in vivo*. A pesar de lo anterior, la determinación de los perfiles de liberación de nanopartículas es importante para propósitos de caracterización de las nanopartículas y como control de calidad para evaluar la confiabilidad de las nanopartículas. Además proporcionan información que permite describir la estructura y el comportamiento microscópico de la formulación, así como la interacción fármaco-acarreador. Finalmente los perfiles de liberación pueden ayudarnos a diseñar nuevas formulaciones con las propiedades que sean requeridas [Kreuter, 1994 y Washington, 1990].

#### 2.6.2.2. Métodos experimentales.

La caracterización *in vitro* de la liberación de fármacos a partir de acarreadores coloidales, especialmente bajo condiciones "sink" es técnicamente difícil de alcanzar. Lo anterior debido a que por el tamaño tan pequeño es difícil separar rápida y eficazmente las partículas acarreadoras del medio de disolución que contiene el fármaco ya liberado y disuelto. Para la determinación experimental de los perfiles de liberación *in vitro* de los fármacos contenidos en nanopartículas se han propuesto diferentes métodos:



- a) Técnicas con membranas de difusión: Celdas de difusión y Bolsas de diálisis
- b) Técnicas de muestreo y separación: Ultrafiltración y Ultracentrifugación
- c) Método *in situ*
- d) Métodos de flujo continuo

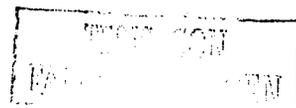
Los experimentos de liberación *in vivo* a partir de acarreadores coloidales deben de llevarse a cabo bajo condiciones "sink" con el fin de evitar la interpretación errónea de los datos de la liberación [Washington, 1990; Magenheim y S. Benita, 1991 y Kreuter, 1994].

**a) Técnicas con membranas de difusión.**

En estos experimentos las nanopartículas son suspendidas en un pequeño volumen de fase continua y son separadas a través de una membrana de diálisis de otra fase que se encuentra en condiciones "sink". El fármaco difunde a través de la membrana hacia la fase que está en condiciones "sink". Periódicamente se toman muestras que se analizan para determinar la cantidad de fármaco liberado.

En celdas de difusión el fármaco pasa de un compartimiento donador hacia el compartimiento receptor a través de una membrana. El compartimiento receptor se muestra a determinados tiempos para cuantificar el fármaco que ha difundido, reemplazando con medio fresco el volumen tomado para el muestreo.

Una de las técnicas más utilizadas para evaluar los perfiles de liberación *in vitro* de sistemas coloidales es la técnica de difusión en bolsas de diálisis que pueden mantenerse estáticas o con agitación. En esta técnica se coloca cierto volumen de la dispersión coloidal dentro de la bolsa de diálisis que se cierra herméticamente y se coloca dentro de una solución "sink" con agitación magnética opcional y a una temperatura determinada. El experimento puede llevarse a cabo con diferentes soluciones acuosas (agua, etanol al 70 %, albúmina al 1 %, etc.) o, inclusive, si el fármaco es poco soluble en agua se pueden agregar solventes no acuosos o agentes solubilizantes, siempre tratando de mantener condiciones "sink". Se toman muestras del compartimiento receptor a diferentes intervalos de tiempos y se cuantifica el contenido de fármaco por diversos métodos analíticos. Esta técnica ha sido criticada debido a que se considera que la muestra no se mantiene en condiciones "sink" puesto que nunca se diluye la

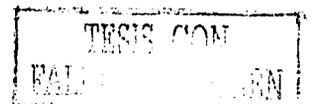


suspensión de nanopartículas, solo se tienen condiciones "sink" en el compartimiento receptor. En consecuencia, el método no mide la verdadera velocidad de liberación.

En 1990 Levy y Benita propusieron la evaluación de la liberación de diazepam a partir de un acarreador coloidal (emulsión submicrónica) utilizando el método denominado bolsa de diálisis reversa. En esta técnica se coloca un cierto volumen de suspensión coloidal directamente en una solución amortiguadora en condiciones "sink" agitado magnéticamente; en la misma solución se colocan pequeñas bolsas de diálisis que contienen un volumen conocido de una solución amortiguadora igual a la solución en que son sumergidas, obviamente sin acarreador coloidal. Es importante señalar que para lograr un equilibrio entre el contenido de las bolsas y la solución que las rodea, las bolsas deben ser sumergidas en la solución amortiguadora en condiciones "sink" unas horas antes de agregar la suspensión coloidal a la solución. A diferentes tiempos se retiran las bolsas de diálisis de la solución "sink" y se cuantifica el fármaco contenido dentro de la bolsa por métodos analíticos. Generalmente los experimentos se llevan a cabo con agitación magnética continua y a temperaturas de 37°C. Este método ha sido utilizado satisfactoriamente para estudiar el perfil de liberación *in vitro* de emulsiones submicrónicas y de nanocápsulas, nanoesferas y nanoemulsiones cargadas con [Washington, 1990; Magenheimer y S. Benita, 1991 y Kreuter, 1994].

#### b) Técnicas de muestreo y separación.

En estas técnicas el acarreador coloidal en estudio es diluido manteniendo condiciones "sink" y se toman muestras a diferentes tiempos. Después se separa la fase continua de la fase dispersa por ultrafiltración o ultracentrifugación y se determina la cantidad de fármaco que se encuentra en la fase continua, es decir el fármaco que ha sido liberado. Los resultados obtenidos con estas técnicas son, en general, satisfactorios siempre y cuando las fases dispersa y continua puedan ser separadas rápida y eficientemente para no alterar el perfil de liberación. La separación de las fases puede complicarse a medida que disminuye el tamaño de partícula de los sistemas analizados, en general, partículas menores a 1 µm presentan dificultad para ser separadas de la fase continua pues los tiempos y velocidades de centrifugación que se requieren son mayores y pueden alterarse los perfiles de liberación. Conforme los tamaños decrecen, los problemas de separación aumentan y la liberación es más rápida.



En las técnicas de ultrafiltración frecuentemente se utilizan tubos Eppendorf con membrana de ultrafiltración, estos dispositivos permiten la fácil separación de nanopartículas del medio de dispersión por centrifugación. La muestra de nanopartículas es puesta directamente en un volumen determinado de solución manteniendo agitación y temperatura constante, a diferentes tiempos se toma una pequeña muestra que se coloca en los tubos con membrana y se centrifuga, finalmente el ultrafiltrado es analizado para determinar la cantidad de fármaco que se ha liberado.

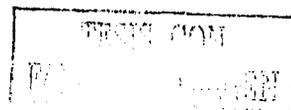
También se ha reportado la evaluación del perfil de liberación de una emulsión submicrónica de miconazol utilizando ultrafiltración a presión reducida. Cierta volumen de dispersión coloidal es colocado directamente en una solución amortiguadora manteniendo condiciones "sink". A diferentes tiempos muestras de este medio son filtradas a través de una membrana de ultrafiltración a baja presión (0.5 bar) usando gas nitrógeno. El filtrado es analizado para determinar la cantidad liberada [Washington, 1990 y Magenheimer y S. Benita, 1991].

#### c) Método *in situ*.

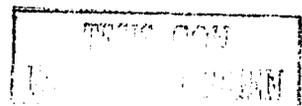
En este caso el acarreador es diluido en un gran volumen de solución (manteniendo condiciones "sink") pero el fármaco liberado es cuantificado en la misma solución sin separar el acarreador del medio de dispersión. Se requiere contar con un método analítico que permita cuantificar únicamente el fármaco en solución y no las partículas dispersadas. Algunos de los métodos usados son la polarografía y la espectroscopia UV/Visible. La polarografía requiere que la sustancia a analizar tenga un potencial redox apropiado. Con la espectroscopia el principal problema que se presenta es que las partículas dispersadas pueden alterar la respuesta generada por el o los grupos cromóforos de la sustancia liberada [Washington, 1990].

#### d) Métodos de flujo continuo.

En este tipo de métodos el acarreador es adicionado a un pequeño volumen de solución "sink" contenido en una celda de filtración que se mantiene en agitación. El filtrado es analizado continuamente y posteriormente se elimina. El volumen de la celda se mantiene constante adicionando solución "sink" a la suspensión. Si la fase "sink" es removida y reemplazada en la celda infinitamente



rápido, entonces, a cualquier tiempo la concentración de fármaco del filtrado analizado debe ser la misma que en la celda lo que nos daría a conocer la verdadera velocidad de liberación del sistema. Desafortunadamente es imposible remover y reemplazar la fase "sink" rápidamente, en especial cuando los filtros o ultrafiltros utilizados permiten una velocidad de flujo del filtrado muy baja. Lo anterior puede evitarse utilizando presión para aumentar las velocidades de flujo [Washington, 1990].



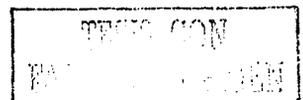
### 3. OBJETIVOS.

#### OBJETIVOS GENERALES.

1. Preparar un sistema nanoparticulado biodegradable para el tratamiento local de enfermedades periodontales.
2. Proponer un sistema de preparación de nanopartículas por desplazamiento de solvente que favorezca el escalamiento industrial de la fabricación de nanopartículas.

#### OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1.1 Encapsular un principio activo para el tratamiento de la gingivitis y la periodontitis mediante la técnica de emulsificación-difusión utilizando diferentes proporciones de un polímero biodegradable.
- 1.2 Caracterizar las nanopartículas obtenidas por su forma, tamaño y eficiencia de encapsulamiento.
- 1.3 Diseñar un aparato para realizar pruebas de liberación *in vitro* de fármacos contenidos en nanoesferas que permita el contacto directo entre la muestra y el medio de disolución.
- 1.4 Realizar ensayos de liberación *in vitro* a las nanopartículas para evaluar el mecanismo y tipo de liberación implicados.
- 2.1 Preparar nanopartículas biodegradables por el método de desplazamiento de solvente.
- 2.2 Analizar las variables que influyen en la producción de nanopartículas por el método de desplazamiento de solvente.
- 2.3 Diseñar un sistema de reflujo que permita aumentar el rendimiento del proceso de obtención de nanopartículas por desplazamiento de solvente.
- 2.4 Evaluar las variables que influyen en la formación de nanopartículas utilizando el sistema de reflujo.



**4. PARTE EXPERIMENTAL.****4.1. POLÍMEROS.**

- a) Poli(D,L-lactico-co-glicólico) 50:50, Resomer<sup>®</sup> RG502; Boehringer Ingelheim, Alemania
- b) Acetato ftalato de celulosa; Vita Drug, México
- c) Poli(D,L-lactico), Resomer<sup>®</sup> R104; Boehringer Ingelheim, Alemania
- d) Poli-ε-caprolactona; Aldrich, Estados Unidos de América

**4.2. ESTABILIZANTE.**

- a) Poli(vinilalcohol), Mowiol<sup>®</sup> 4-88; Glomarza, México

**4.3. PRINCIPIO ACTIVO.**

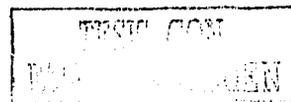
- a) Triclosán; Multiquim, México

**4.4. REACTIVOS EN GENERAL.**

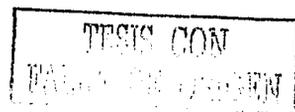
- a) Polioxi-etilen(20)etiléter, Brij<sup>®</sup> 58; ICI Specialty Chemicals, Estados Unidos de América
- b) Polioxi-etilen(20)sorbitanmonooleato, Polysorbate 80, Tween<sup>®</sup> 80; ICI Surfactants, Estados Unidos de América
- c) Acetato de etilo, grado espectrofotométrico, Fermont, México
- d) Metiletilcetona, grado HPLC, Fermont, México
- e) Acetona, grado HPLC, Fermont, México
- f) Hidróxido de sodio en hojuelas, grado reactivo, J. T. Baker, México
- g) Ácido clorhídrico, grado reactivo, J. T. Baker, México
- h) Yodo resublimado, grado reactivo, Merck, México
- i) Yoduro de Potasio, grado reactivo, J.T. Baker, México
- j) Ácido bórico, grado reactivo, Productos Químicos Monterrey, México
- k) Agua destilada obtenida de un equipo RiOs Millipore<sup>®</sup>

**4.5. MATERIAL Y EQUIPO.**

- a) Filtros Millex<sup>®</sup> GV de 2.5 cm de diámetro y poro de 0.22 μm (Millipore<sup>®</sup>)
- b) Membranas de nitrato de celulosa de 2.5 cm de diámetro y poro de 0.1 μm (Advantec MFS)
- c) Manguera Master Flex Norprene<sup>®</sup> 6402-13
- d) Manguera Master Flex Norprene<sup>®</sup> 6402-16
- e) Portafiltros de teflón Millipore<sup>®</sup> de 2.5 cm de diámetro con adaptador para jeringa
- f) Portafiltros de teflón Millipore<sup>®</sup> de 1 cm de diámetro con adaptador para jeringa
- g) Termómetro de vidrio Brannan de -20 a 110 °C



- h) Agitador de velocidad variable RZR-1, Caframo<sup>®</sup>, Alemania
- i) Rotavapor Laborota<sup>®</sup> 4000, Heidolph, Alemania
- j) Liofilizadora de mesa, Labconco, Estados Unidos de América
- k) Ultracentrifuga Optima<sup>®</sup> LE-80K, Beckman, Estados Unidos de América
- l) Ultrasonificador Branson<sup>®</sup> 3200, Estados Unidos de América
- m) Recirculador de líquidos con termostato, VWR Scientific, Estados Unidos de América
- n) Nanosizer<sup>®</sup> Coulter N4 Plus, Beckman, Estados Unidos de América
- o) Espectrofotómetro DU<sup>®</sup>-64, Beckman, Estados Unidos de América
- p) Balanza analítica BBC32, Boeco, Alemania
- q) Parrilla eléctrica con agitación Cimarec<sup>®</sup>, Thermoline, Estados Unidos de América
- r) Agitador magnético Magnestir<sup>®</sup>, Lab-Line Instruments, Estados Unidos de América
- s) Microscopio electrónico de barrido JSM-25 S II, JEOL, Japón
- t) Campana para recubrimiento con oro JFC-1100, JEOL, Japón
- u) Bomba Peristáltica Master Flex<sup>™</sup> L/S modelo 7518, 6-600 rpm, Cole Parmer, Estados Unidos de América
- v) Cabezal para bomba peristáltica Easy-load<sup>™</sup> Master Flex<sup>™</sup> 7518-10, Cole Parmer, Estados Unidos de América
- w) Bomba Peristáltica Watson Marlow 502 S, New Brunswick Scientific, Estados Unidos de América
- x) Calorímetro diferencial de barrido DSC Q10; TA Instruments, Estados Unidos de América
- y) Material de cristalería



## 4.6. METODOLOGÍA.

### 4.6.1. DETERMINACIONES PREVIAS.

#### 4.6.1.1. Espectros de absorción.

Se determinaron las longitudes de onda ( $\lambda$ ) de máxima absorción para el triclosán en NaOH 0.1 N y en solución acuosa de Brij<sup>®</sup> 58 al 2 % p/v. Los barridos se hicieron de 200 a 400 nm.

La  $\lambda$  de máxima absorción para el complejo de polivinilalcohol (PVAL) con ácido bórico 0.65 M ( $H_3BO_3$  0.65 M) y solución de yodo 0.05 M / yoduro de potasio 0.15 M ( $I_2$  / KI) se determinó haciendo un barrido desde 400 hasta 800 nm.

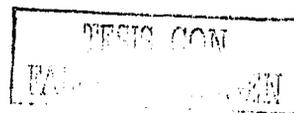
#### 4.6.1.2. Curvas de calibración.

Las curvas de calibración para triclosán en NaOH 0.1 N, triclosán en Brij<sup>®</sup> 58 al 2 % p/v y para el complejo PVAL -  $H_3BO_3$  -  $I_2$  - KI se prepararon por quintuplicado con 6 diferentes concentraciones cada una, leyéndose a  $\lambda = 290, 282$  y  $640$  nm, respectivamente.

Para la curva del complejo PVAL -  $H_3BO_3$  -  $I_2$  - KI el sistema blanco utilizado fue el siguiente: 5 ml de  $H_2O$ , 2 ml de  $H_3BO_3$  y 1 ml de  $I_2/KI$ . Todos los puntos de la curva se manejaron con la misma proporción de  $H_3BO_3$  y  $I_2/KI$ , es decir, se trabajaron diferentes concentraciones de solución acuosa de PVAL pero siempre se utilizaron 5 ml de dichas soluciones con 2 ml de  $H_3BO_3$  y 1 ml de  $I_2/KI$  para formar el complejo.

#### 4.6.1.3. Determinación de la solubilidad de triclosán en Brij 58<sup>®</sup> al 2 % p/v.

Se saturaron 15 ml de solución acuosa de Brij<sup>®</sup> 58 al 2 % p/v con triclosán y se mantuvieron con agitación magnética constante a 37 °C por 72 horas. Después de filtrarlo se hicieron 2 diluciones tomando 1 ml de solución y aforando a 10 ml cada vez, la última dilución se leyó en el espectrofotómetro a  $\lambda = 282$  nm y la lectura obtenida se interpoló en la curva correspondiente. La prueba se realizó por triplicado.



#### 4.6.2. PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS POR EL MÉTODO DE EMULSIFICACIÓN-DIFUSIÓN.

Se saturaron mutuamente el acetato de etilo y el agua destilada en un embudo de separación, agitando y manteniendo en contacto ambos líquidos al menos 20 minutos. En el solvente orgánico saturado se disolvió el polímero y el activo (triclosán). Esta solución se emulsificó con una solución acuosa de PVAL al 5 % p/v (en agua saturada) con agitación mecánica a 1700 rpm durante 10 minutos. Se adicionó agua destilada al sistema con agitación continua. El solvente orgánico fue eliminado bajo presión reducida con rotavapor.

La suspensión se concentró hasta un volumen aproximado de 80 ml por la eliminación de agua a presión reducida y posteriormente fue centrifugada a 20000 rpm durante 20 minutos. La pastilla se resuspendió en agua destilada y se centrifugó nuevamente. Se llevaron a cabo dos procesos de lavado-centrifugado. La pastilla de la última centrifugación se resuspendió en agua. Esta suspensión se congeló a  $-40^{\circ}\text{C}$  en un enfriador de inmersión con solución etanol-agua 50:50 y posteriormente fue liofilizada. Los volúmenes de solvente orgánico y solución acuosa de PVAL al 5 % p/v dependen de la cantidad de polímero empleado. En la tabla 1 se indican los lotes que se prepararon, el tipo de polímero y los solventes empleados en cada lote, así como las cantidades de polímero, activo y solución de PVAL empleadas. En la figura 9 se muestra una representación esquemática del método empleado para la preparación de las nanopartículas por el método de emulsificación-difusión.

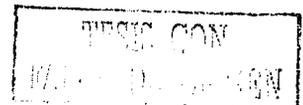


Tabla 1. Materiales y cantidades empleadas para la preparación de los lotes de nanopartículas por el método de emulsificación-difusión.

No. de Lote	Polimero	Solvente Saturado	Triclosán (mg)	Polimero (mg)	Porcentaje de Triclosán	Solvente Saturado (ml)	PVAL al 5% (ml)	Agua Destilada (ml)
1	PLGA	Acetato de etilo	0.0	400.0	0.00	20.0	40.0	160.0
2	PLGA	Acetato de etilo	50.0	4000.0	1.23	200.0	400.0	1600.0
3	PLGA	Acetato de etilo	120.0	2400.0	4.76	120.0	240.0	960.0
4	PLGA	Acetato de etilo	200.0	2000.0	9.09	100.0	200.0	800.0
5	PLGA	Acetato de etilo	160.0	800.0	16.67	40.0	80.0	320.0
6	PLGA	Acetato de etilo	120.0	400.0	23.08	20.0	40.0	160.0
7	PLGA	Acetato de etilo	200.0	400.0	33.33	20.0	40.0	160.0
8	PLA	Acetato de etilo	0.0	400.0	0.00	20.0	40.0	160.0
9	PLA	Acetato de etilo	50.0	4000.0	1.23	200.0	400.0	1600.0
10	PLA	Acetato de etilo	120.0	2400.0	4.76	120.0	240.0	960.0
11	PLA	Acetato de etilo	200.0	2000.0	9.09	100.0	200.0	800.0
12	CAP	Metiletilcetona	0.0	400.0	0.00	20.0	40.0	160.0
13	CAP	Metiletilcetona	50.0	4000.0	1.23	200.0	400.0	1600.0
14	CAP	Metiletilcetona	120.0	2400.0	4.76	120.0	240.0	960.0
15	CAP	Metiletilcetona	200.0	2000.0	9.09	100.0	200.0	800.0

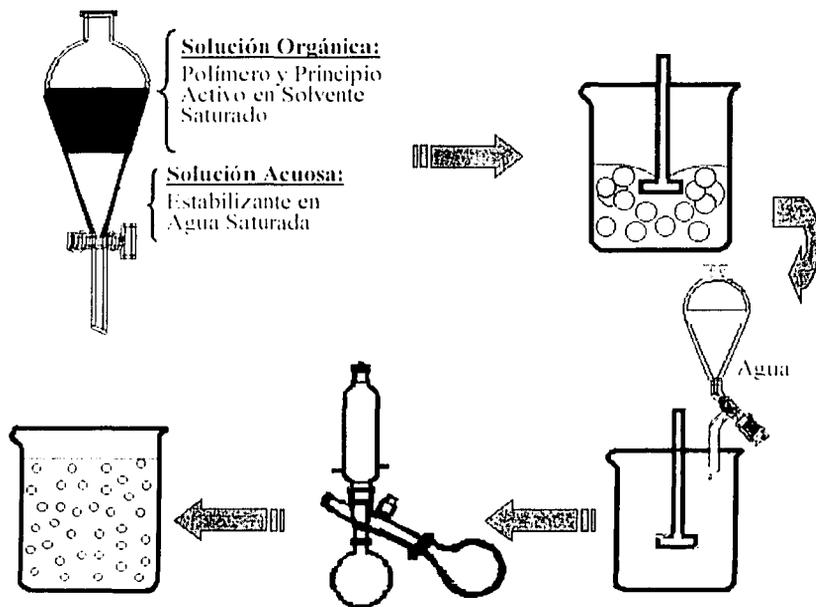


Figura 9. Preparación de nanopartículas por el método de emulsificación-difusión.

### 4.6.3. EVALUACIÓN DE NANOPARTÍCULAS.

#### 4.6.3.1 Tamaño de partícula.

Se determinó la talla de partícula promedio y la distribución del tamaño de partícula con un contador Nanosizer<sup>®</sup>. Las determinaciones se hicieron por triplicado preparando diluciones de una suspensión acuosa de nanopartículas liofilizadas.

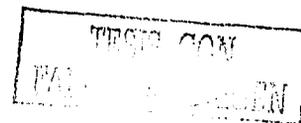
#### 4.6.3.2. Morfología.

Las nanopartículas de PLGA se observaron por microscopía electrónica de barrido, recubriéndolas previamente con oro (1200 V, 5 mAmp y 0.15 Torr durante 6 minutos).

#### 4.6.3.3. Determinación del PVAL residual en nanopartículas de PLGA y PLA.

Se digirió una cantidad conocida de nanopartículas liofilizadas (5-10 mg) con 5 ml de hidróxido de sodio 0.1 N (NaOH 0.1 N) en un pesafiltro, se agitó magnéticamente por 48 horas. Después de neutralizar el sistema con ácido clorhídrico 1 N (HCl 1 N) se filtró con filtro Millipore<sup>™</sup> de 0.22  $\mu\text{m}$  y se ajustó el volumen a 10 ml con agua destilada. Posteriormente se tomó 1 ml de filtrado y se llevó a 5 ml con agua destilada. Los 5 ml de filtrado se mezclaron con 2 ml de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.65 M y 1 ml de solución de  $\text{I}_2$  0.05 M / KI 0.15 M para formar un complejo colorido. El sistema se leyó con el espectrofotómetro a  $\lambda = 640 \text{ nm}$ , la absorbancia obtenida se interpoló en la curva de calibración correspondiente para obtener la concentración del sistema.

Cuando la lectura de absorbancia era demasiado baja o alta para ser interpolada en la curva de calibración se tomaron mayores volúmenes de filtrado o bien se hicieron diluciones del mismo, llevando siempre a un volumen final de 5 ml antes de mezclar con el  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.65 M y la solución de  $\text{I}_2$  0.05 M / KI 0.15 M. Al mismo tiempo se corrió un estándar bajo las mismas condiciones. Las determinaciones se realizaron por triplicado.



#### 4.6.3.4. Determinación del PVAL residual en nanopartículas de CAP.

Se disolvió una cantidad conocida de nanopartículas liofilizadas (5-10 mg) con 5 ml de metiletilcetona en un matraz de bola de 20 ml con boca esmerilada, la solución se llevó a sequedad con un rotavapor a presión reducida. Después se agregaron 9 ml de agua destilada y se continuó la agitación con el rotavapor calentando el matraz con baño de agua a 65°C a presión atmosférica durante 60 minutos. Posteriormente se filtró (Millipore™ de 0.22 μm), se tomó 1 ml de filtrado y se llevó a 5 ml con agua destilada. Los 5 ml de filtrado se mezclaron con 2 ml de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.65 M y 1 ml de solución de I<sub>2</sub> 0.05 M / KI 0.15 M para formar un complejo colorido. El sistema se leyó con el espectrofotómetro a λ = 640 nm, la absorbancia obtenida se interpoló en la curva de calibración correspondiente para obtener la concentración del sistema

Cuando la lectura de absorbancia era demasiado baja o alta para ser interpolada en la curva de calibración se tomaron mayores volúmenes de filtrado o bien se hacían diluciones del mismo, llevando siempre a un volumen final de 5 ml antes de mezclar con el H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.65 M y la solución de I<sub>2</sub> 0.05 M / KI 0.15 M. Al mismo tiempo se corrió un estándar bajo las mismas condiciones. Las determinaciones se realizaron por triplicado

#### 4.6.3.5. Determinación de triclosán en las nanopartículas de PLGA y PLA.

Se digirió una cantidad conocida de nanopartículas liofilizadas (5-10 mg) con 5 ml de hidróxido de sodio 0.1 N (NaOH 0.1 N) en un pesafiltro, con agitación magnética por 48 horas. Después el sistema se filtró con membrana Millipore™ de 0.22 μm y se ajustó el volumen a 10 ml con agua destilada. Se determinó la absorbancia a λ = 290 nm y se interpoló en la curva de calibración correspondiente para obtener la concentración del sistema utilizando como blanco NaOH 0.1 N. En algunos lotes fue necesario diluir el filtrado. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

#### 4.6.3.6. Determinación de triclosán en las nanopartículas de CAP.

Se disolvió una cantidad conocida de nanopartículas liofilizadas (5-10 mg) con 5 ml de metiletilcetona en un matraz de bola de 20 ml con boca esmerilada, la solución se llevó a sequedad con un rotavapor a presión reducida. Después se agregaron 9 ml de NaOH 0.1 N y se continuó la agitación con el



rotavapor a presión atmosférica durante 60 minutos. Posteriormente se filtró (Millipore™ de 0.22  $\mu\text{m}$ ), se tomó 1 ml de filtrado y se llevó a 10 ml con agua destilada. La absorbancia ( $\lambda = 290 \text{ nm}$ ) se interpoló en la curva de calibración correspondiente para obtener la concentración del sistema utilizando como blanco NaOH 0.1 N. En algunos lotes fue necesario diluir el filtrado. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

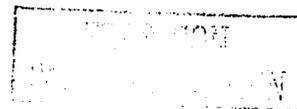
#### 4.6.3.7. Calorimetría Diferencial de Barrido.

Muestras de nanopartículas liofilizadas de cada uno de los lotes preparados se analizaron por calorimetría diferencial de barrido a una velocidad de calentamiento de  $10 \text{ }^\circ\text{C} / \text{min}$ . Los termogramas para las nanopartículas de PLGA y PLA se corrieron de  $30$  a  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ . Las muestras de nanopartículas de CAP se analizaron de  $30$  a  $200 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 4.6.4. PERFILES DE LIBERACIÓN.

Para los estudios de liberaciones se diseñó un sistema que permite el contacto directo entre las nanopartículas y el medio de disolución. Este sistema se presenta en la figura 10 y consta de una cámara perfectamente sellada dentro de la cual se coloca el medio de disolución y se dispersan las nanopartículas. La cámara se sumerge en un baño de agua que se calienta con un recirculador con termostato. La cámara contiene un orificio en la tapa superior donde se inserta una propela y con ayuda de un monodisolutor el sistema se mantiene con agitación. La temperatura dentro de la cámara fue de  $37 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ . El medio de disolución empleado fue una solución acuosa de Brij™ 58 al 2 % p/v y el volumen utilizado fue de 500 ml. La velocidad de agitación se mantuvo a 25 rpm. Las muestras fueron tomadas con ayuda de una jeringa conectada a un portafiltras con una membrana de 2.5 cm de diámetro y poro de 0.10  $\mu\text{m}$ . Se tomaron muestras de 3 ml reponiendo el mismo volumen con medio de disolución fresco a los 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 105, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 y 360 minutos.

Las muestras de la disolución se leyeron a una longitud de onda de 282 nm. Se llevaron a cabo tres disoluciones para cada lote excepto para los lotes 2, 9 y 13 para los que sólo se hicieron dos disoluciones



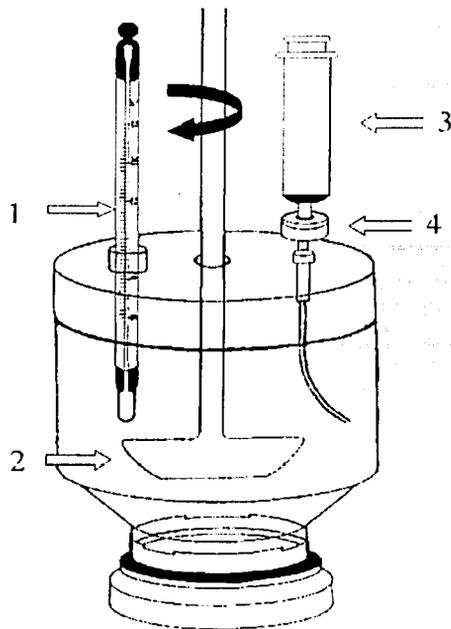


Figura 10. Aparato empleado para las pruebas de disolución.

- 1) Termómetro, 2) Propela, 3) Jeringa para toma de muestra ó Jeringa para reponer el volumen de la muestra y
- 4) Portafiltro de teflón acoplado a la jeringa y con membrana de 0.1  $\mu\text{m}$  de poro.

#### 4.6.5. PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS POR EL MÉTODO DE DESPLAZAMIENTO DE SOLVENTE.

##### 4.6.5.1. Preparación por el método convencional.

Se prepararon soluciones de poli- $\epsilon$ -caprolactona en acetona a tres concentraciones: 2.5, 5.0 y 7.5 % p/v. Se inyectaron 20 ml de cada solución con bomba peristáltica en un vaso de precipitados de 250 ml que contenían 125 ml de agua destilada, mientras el sistema se mantenía con agitación magnética. Se emplearon 3 velocidades de inyección: 14.2, 25 y 35 ml/min. La dispersión se pasó por un tamiz malla 200 para separar los agregados formados. Se determinó el tamaño de partícula del filtrado con un contador NanoSizer™ N4Plus. Los agregados se llevaron a peso constante en un desecador para



determinar la eficiencia del proceso. Todas las pruebas se llevaron a cabo por quintuplicado. El método se esquematiza en la figura 11.

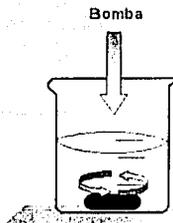


Figura 11. Preparación de nanopartículas por desplazamiento de solvente (Método Convencional).

#### 4.6.5.2. Preparación con un sistema de reflujo.

Se diseñó un sistema de reflujo que se esquematiza en la figura 12; con bomba peristáltica (Bomba 1) se mantuvo recirculando el volumen del sistema a 3 diferentes velocidades: 27.5, 55 y 83 ml/min.

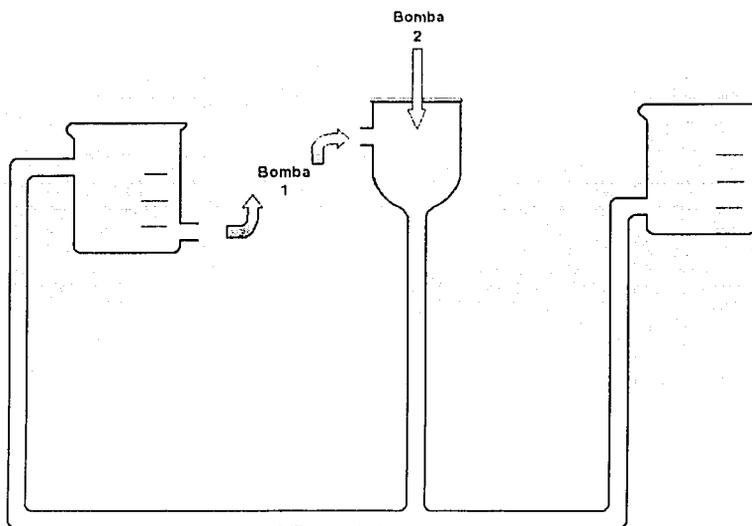


Figura 12. Preparación de nanopartículas por desplazamiento de solvente (Sistema de Reflujo).



Se prepararon soluciones de poli- $\epsilon$ -caprolactona en acetona a tres concentraciones: 2.5, 5.0 y 7.5 % p/v. Se inyectaron 20 ml de cada solución con bomba peristáltica (Bomba 2) en el sistema de reflujo que contenía 125 ml de agua destilada, mientras el sistema se mantenía en recirculación. Se emplearon 3 velocidades de inyección: 14, 25 y 35 ml/min. Terminada la inyección de la solución orgánica se pasó la dispersión formada por un tamiz malla 200 para separar los agregados. Se determinó el tamaño de partícula del filtrado con un contador NanoSizer<sup>®</sup> N4Plus y los agregados se llevaron a peso constante en un desecador para determinar la eficiencia del proceso. Todas las pruebas se llevaron a cabo por quintuplicado, preparando un total de 135 dispersiones. Después de preparar cada dispersión el sistema se lavó con acetona y se enjuagó tres veces con agua destilada.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

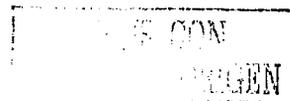
Los espectros de absorción obtenidos para triclosán en NaOH 0.1 N , triclosán en Brij<sup>®</sup> 58 al 2 % p/v y el complejo de PVAL - H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> - I<sub>2</sub> - KI se incluyen en el anexo 1 junto con los valores de los coeficientes de absortividad ( $\epsilon$ ) obtenidos para las curvas de calibración. Las curvas de calibración del triclosán se leyeron a las longitudes de onda máximas, determinadas según los espectrogramas obtenidos. La curva de calibración del complejo de PVAL - H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> - I<sub>2</sub> - KI que se utilizó para determinar el PVAL residual en las nanopartículas se leyó a 640 nm, aunque la longitud de onda de máxima absorción ( $\lambda_{max}$ ) es de 620 nm. A 640 nm se tiene buena respuesta además, la cuantificación de PVAL residual en las nanopartículas está basada en un método previamente validado por Raygoza y colaboradores (1996) en el que se trabajó a  $\lambda = 640$  nm.

La solubilidad del triclosán en la solución acuosa de Brij<sup>®</sup> 58 al 2% p/v fue de  $9.6936 \pm 0.0212$  mg/ml; el primer valor es el promedio de tres determinaciones realizadas y el segundo indica la desviación estándar.

Las nanopartículas fueron preparadas por el método de emulsificación-difusión, como se señaló anteriormente, esta técnica involucra el uso de solventes parcialmente solubles en agua. La selección del tipo de solvente a utilizar para la preparación de las nanopartículas se apoyó en trabajos de investigación en los que se han preparado nanocápsulas y nanocápsulas con PLA, PLGA y CAP [Piñón-Segundo y cols , 2000 y Chávez-Monroy y cols , 2002].

Algunos de los polímeros que se han utilizado como estabilizantes en el método de emulsificación-difusión son el PVAL y poloxameros como Pluronic<sup>™</sup> 188 y Pluronic<sup>™</sup> F127. El PVAL evita la agregación de las nanopartículas de PLA aun después de ser sometidas a un proceso de liofilización, pues posee una gran afinidad a la superficie de las mismas, las cadenas de PVAL se unen fuertemente a la superficie de las nanopartículas formando una capa estable [Quintana-Guerrero y cols , 1998b]. El principal inconveniente de la utilización de este polímero es la dificultad para removerlo completamente de las nanopartículas obtenidas [Gref y cols , 2001 y Mu y Feng, 2002].

El principio activo incorporado en las nanopartículas fue el triclosán. Cabe recordar que los compuestos que pueden ser encapsulados por la técnica de emulsificación-difusión deben ser insolubles en agua. El

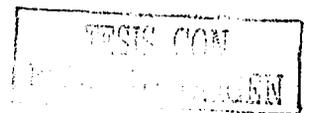


triclosán (2,4,4'-tricloro-2-hidroxidifeniléter) es un agente antimicrobiano no catiónico que presenta eficacia contra una amplia variedad de bacterias formadoras de placa, incluidas *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *F. nucleatum* y *C. rectus*. El triclosán usado en dentífricos reduce la gingivitis y la placa dental [Rosling y cols., 1997a] y retarda su progresión hacia periodontitis [Rosling y cols., 1997b]; evita la formación de nueva placa [Ramberg y cols., 1995 y Furuichi y cols., 1997] y reduce la placa supragingival ya establecida [García Godoy y cols., 1990]. Además en estudios realizados por Waaler y colaboradores [1993] se demostró que el triclosán puede penetrar mucosas y que su administración tópica en compartimientos orales y extraorales reduce signos clínicos de inflamación. En un estudio reciente de gingivitis experimental se demostró que el triclosán usado en enjuagues inhibe o retarda la inflamación gingival que se ocasiona en presencia de placa [Ramberg y cols., 1995].

Para la determinación de la talla de las partículas obtenidas se utilizó un contador NanoSizer™ N4Plus, la determinación del tamaño de las partículas se basa en la medición y las fluctuaciones de la luz dispersada después de que un rayo láser incide sobre una celda con la dispersión de la muestra en estudio. La velocidad de difusión de las partículas en un medio líquido depende de la temperatura, viscosidad del líquido y tamaño de las partículas por lo que se requiere que todas las muestras sean analizadas bajo las mismas condiciones. Para todos los lotes analizados se utilizó como medio de dispersión agua grado MilliQ®, todas las lecturas se realizaron a 25°C y el ángulo de incidencia del rayo láser fue 90°. Los datos obtenidos con este análisis son la talla promedio de las partículas, la distribución del tamaño de partícula y la desviación estándar de la misma, además del índice de polidispersidad de la muestra. La desviación estándar ( $d_e$ ) de la distribución del tamaño de partícula proporciona una indicación cualitativa de la polidispersidad de la muestra. El índice de polidispersidad (IP) está relacionado con el coeficiente de variación (C.V.) de la distribución del tamaño de partícula por la expresión:

$$C.V. = \frac{1}{\sqrt{\frac{1}{IP} + 4}}$$

Ecuación (1)

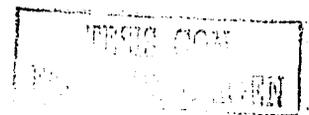


## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se muestran los resultados obtenidos en las determinaciones de la talla de partícula para los diferentes lotes de nanopartículas (Tablas 2 a 4; Figuras 13 a 27 y Gráfico 1).

Tabla 2. Talla de partícula promedio para nanopartículas de PLGA y de PLGA con triclosán.

Lote	Talla (nm)	d. e. (nm)	I.P.	C.V.
1	171.2	48.7	0.120	0.350
	179.4	59.8	0.200	0.392
	178.2	55.2	-0.156	0.373
	$\bar{X}$ 176.3			0.372
2	222.8	56.5	-0.087	0.320
	214.3	44.5	0.052	0.271
	222.2	62.0	-0.113	0.345
	$\bar{X}$ 219.8			0.312
3	248.0	42.9	-0.034	0.231
	250.5	66.2	-0.970	0.471
	240.7	42.7	-0.036	0.236
	$\bar{X}$ 246.4			0.313
4	277.2	86.8	-0.161	0.375
	264.4	41.2	0.027	0.211
	276.2	71.2	-0.091	0.325
	$\bar{X}$ 272.6			0.303
5	304.5	94.2	-0.155	0.372
	307.2	109.5	-0.258	0.410
	313.1	110.6	-0.249	0.408
	$\bar{X}$ 308.3			0.397
6	340.7	159.3	-1.748	0.483
	355.6	91.1	-0.089	0.322
	367.3	160.5	-0.808	0.465
	$\bar{X}$ 354.5			0.424
7	471.2	211.0	-1.015	0.472
	450.7	183.5	0.492	0.446
	453.5	153.2	0.210	0.396
	$\bar{X}$ 458.5			0.438



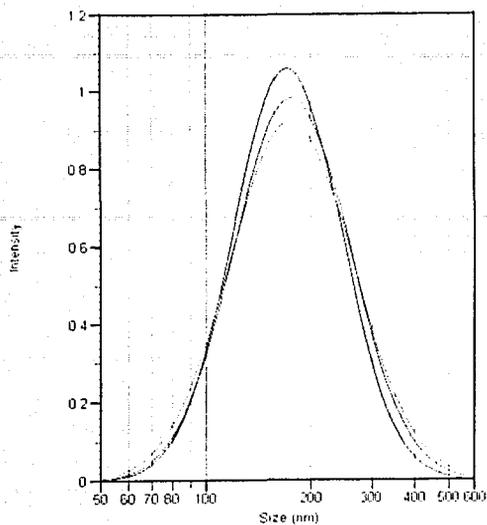


Figura 13. Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de PLGA (Lote 1).

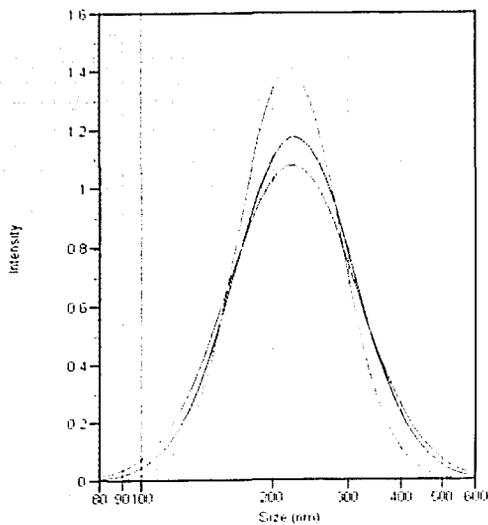
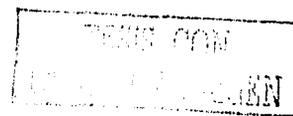


Figura 14. Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de PLGA con triclosán (Lote 2).



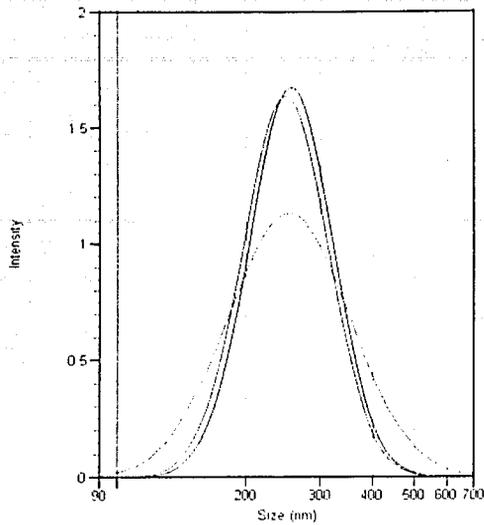


Figura 15. Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de PLGA con triclosán (Lote 3).

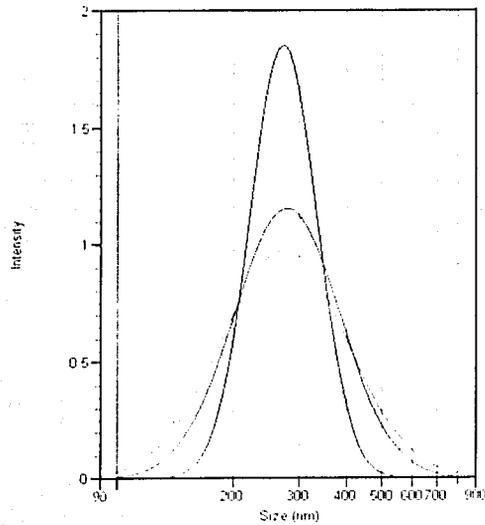
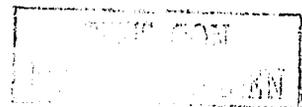


Figura 16. Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de PLGA con triclosán (Lote 4).



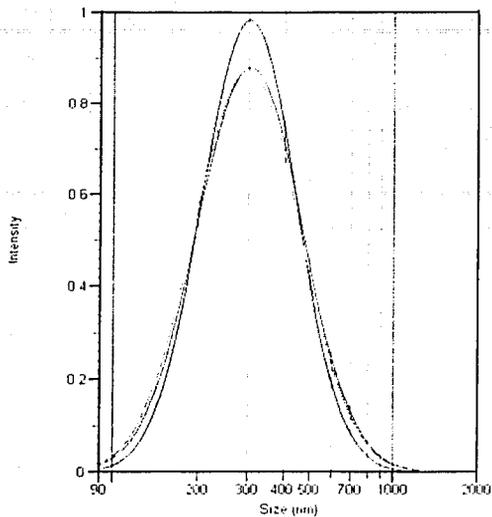


Figura 17. Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de PLGA con triclosán (Lote 5).

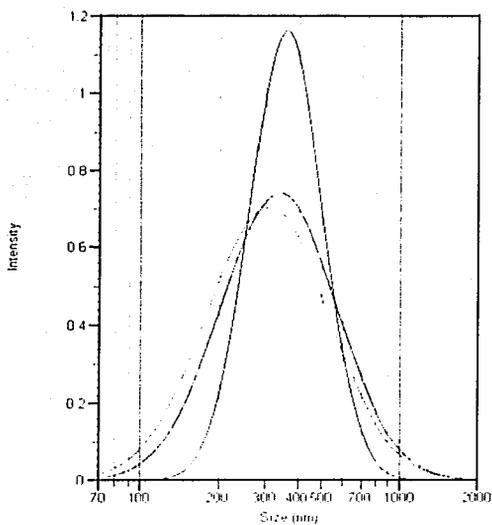
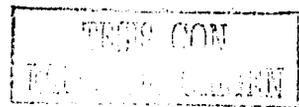


Figura 18. Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de PLGA con triclosán (Lote 6).



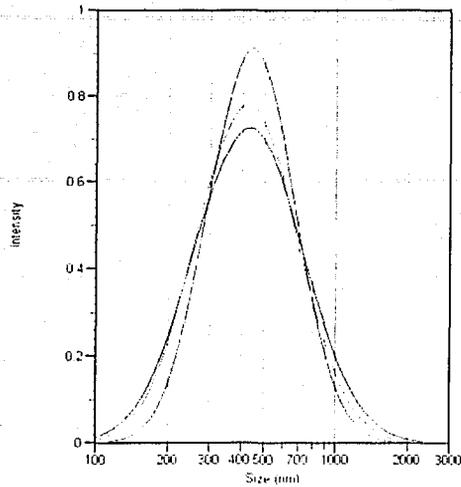


Figura 19. Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de PLGA con triclosán (Lote 7).

Tabla 3. Talla de partícula promedio para nanopartículas de PLA y PLA con triclosán.

Lote	Talla (nm)	d. e. (nm)	I.P.	C.V.
8	223.1	60.3	-0.103	0.336
	217.3	55.7	0.089	0.322
	216.8	69.1	-0.171	0.380
	$\bar{X}$ 219.1			0.346
9	207.0	45.8	0.061	0.286
	209.2	20.8	0.010	0.136
	206.3	70.5	0.219	0.399
	$\bar{X}$ 207.5			0.274
10	219.1	68.7	0.162	0.376
	212.8	63.0	-0.135	0.360
	213.3	68.3	0.174	0.381
	$\bar{X}$ 215.1			0.372
11	288.9	95.1	-0.191	0.389
	285.4	117.7	-0.531	0.450
	284.0	55.8	0.046	0.259
	$\bar{X}$ 286.1			0.366



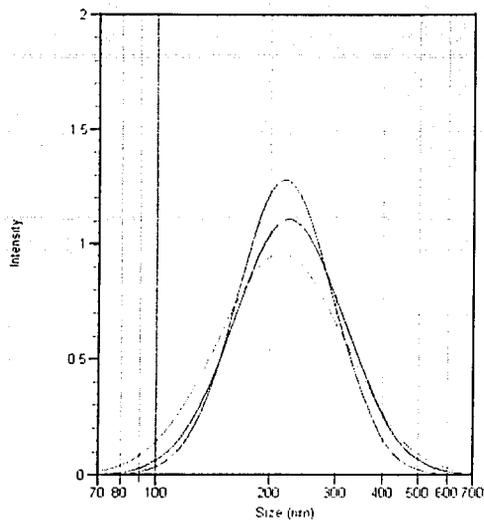


Figura 20. Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de PLA (Lote 8).

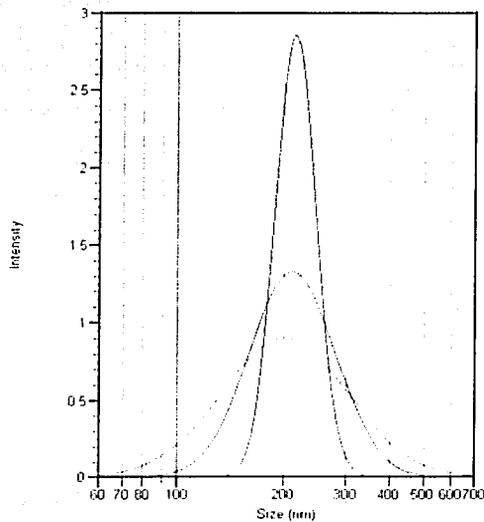
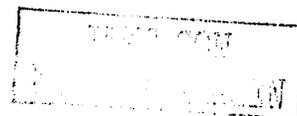


Figura 21. Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de PLA con triclosán (Lote 9).



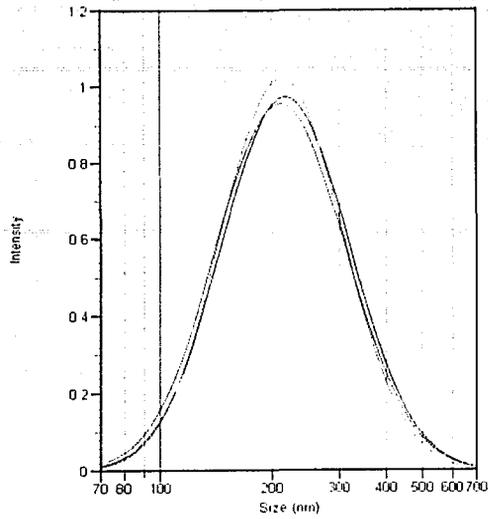


Figura 22. Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de PLA con triclosán (Lote 10).

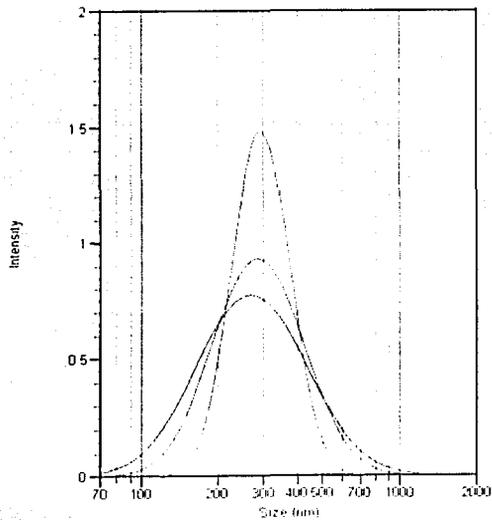


Figura 23. Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de PLA con triclosán (Lote 11).

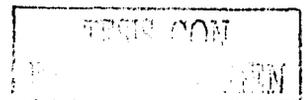


Tabla 4. Talla de partícula promedio para nanopartículas de CAP y CAP con triclosán.

Lote	Talla (nm)	d. e. (nm)	I.P.	C.V.
12	231.1	93.2	0.466	0.444
	212.4	80.4	0.336	0.427
	225.2	93.1	-0.539	0.450
	$\bar{X}$ 222.9			0.440
13	214.4	58.7	-0.107	0.340
	220.6	70.0	0.168	0.379
	224.7	97.1	-0.738	0.462
	$\bar{X}$ 219.9			0.394
14	189.7	52.6	0.111	0.343
	193.1	50.4	-0.093	0.327
	196.0	35.3	0.037	0.239
	$\bar{X}$ 192.9			0.303
15	223.9	80.1	0.262	0.411
	251.8	100.6	0.440	0.441
	230.7	89.9	0.386	0.435
	$\bar{X}$ 235.5			0.429

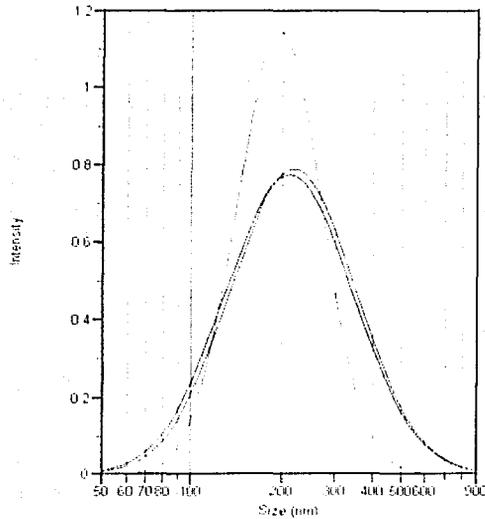
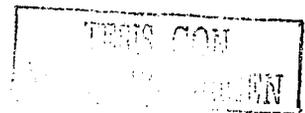


Figura 24. Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de CAP (Lote 12).



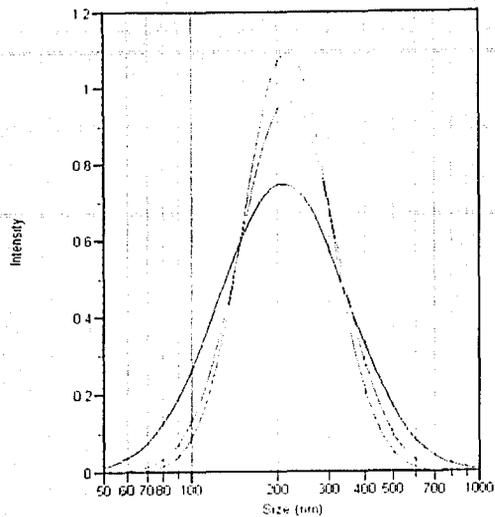


Figura 25. Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de CAP con triclosán (Lote 13).

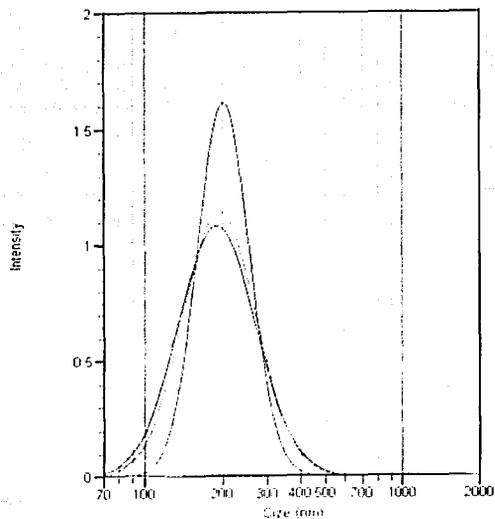
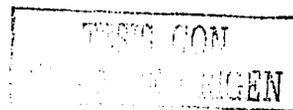


Figura 26. Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de CAP con triclosán (Lote 14).



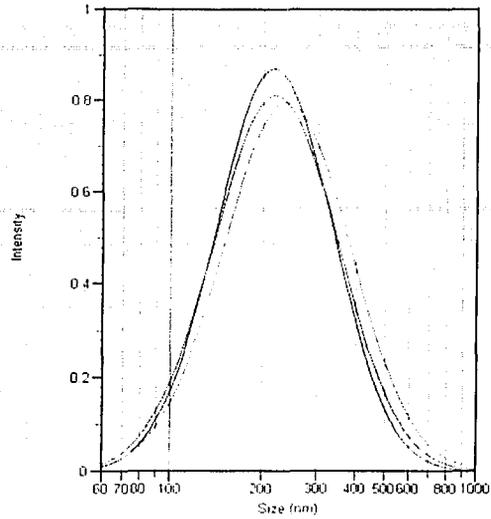


Figura 27. Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de CAP con triclosán (Lote 15).

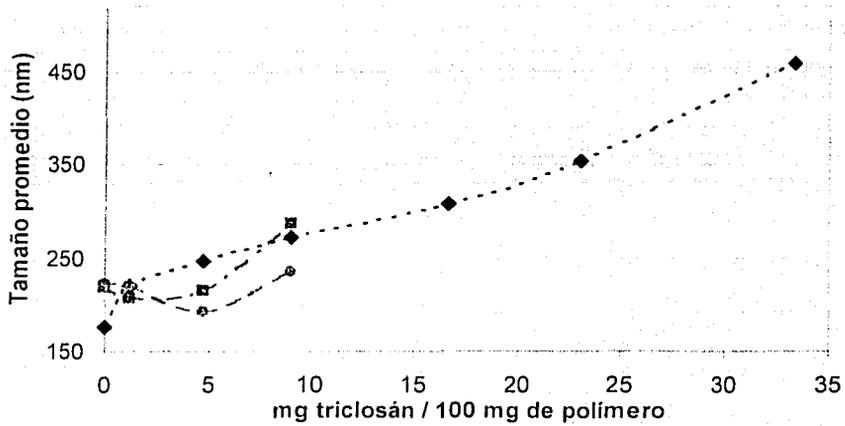


Gráfico 1. Comportamiento del tamaño de partícula.

---♦--- FLGA      ---■--- FLA      ---●--- CAP

De manera general, todos los lotes preparados presentan talla submicrónica y todas las partículas obtenidas son menores a 500 nm, como se muestra en las tablas 2, 3 y 4 y en las figuras 13 a 27. En los lotes de PLGA se aprecia que al aumentar la cantidad de triclosán en las nanopartículas la talla de las mismas se ve incrementada. Esta tendencia se puede ver claramente en el gráfico 1, sobre todo a partir del lote con 9.09% p/p de triclosán (lote 4). Para las nanopartículas de PLA y CAP no se puede aseverar que el triclosán aumente la talla de las partículas, pues los lotes que se prepararon contienen cantidades muy bajas del activo.

Los lotes de PLGA con mayor proporción de triclosán presentan una mayor desviación estándar en la distribución del tamaño de partícula, lo cual es un indicativo de que los lotes incrementan su polidispersidad. Para calcular el coeficiente de variación se consideraron los valores absolutos de los índices de polidispersidad.

Las partículas obtenidas fueron analizadas con el microscopio electrónico de barrido para el análisis de su morfología. Se pudo determinar que poseían una estructura sólida de forma definida, semejante a una esfera y que eran de tamaño menor a un micrómetro (nanoesferas). En la figura 28 se muestran algunas de las fotografías obtenidas de las nanoesferas de PLGA con triclosán, la barra blanca mayor de la parte inferior izquierda de las fotografías representa una longitud de 1  $\mu\text{m}$ . Puede apreciarse que al aumentar la cantidad de triclosán en las nanoesferas el tamaño de las mismas aumenta, asimismo, se aprecia que tienden a fusionarse unas con otras. En un estudio previo [Piñón-Segundo y cols., 2000] se sugiere que el triclosán pudo favorecer la fusión de las nanoesferas, actuando como un plastificante no convencional que favorece la formación de películas. En las páginas siguientes se retoma este planteamiento, relacionándolo con estudios de calorimetría diferencial de barrido.

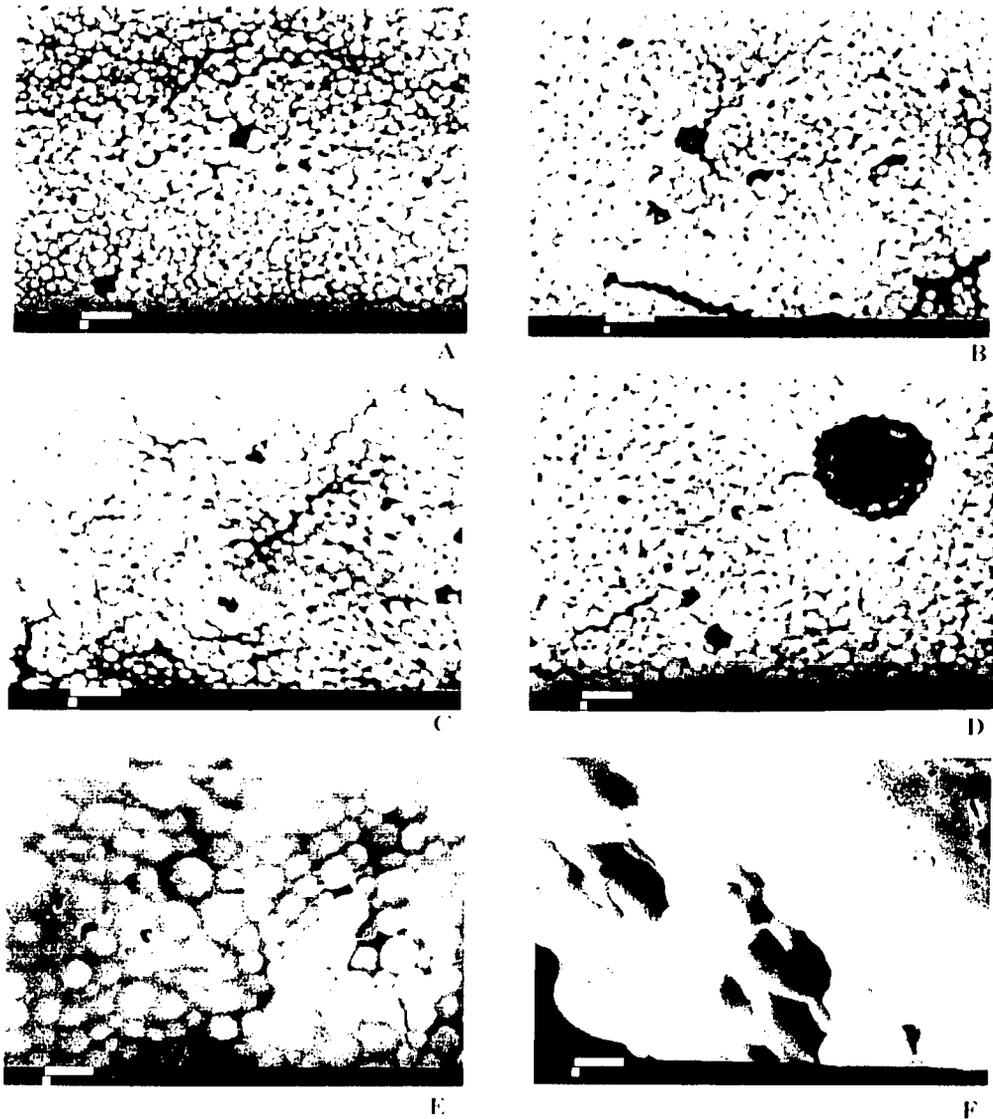


Figura 28. Fotografías de nanosferas de PLGA con Triclosán, Microscopía electrónica de barrido, 10000X. A) Lote 2 (1.23 % de Triclosán), B) Lote 3 (4.76 % de Triclosán), C) Lote 4 (9.09 % de Triclosán), D) Lote 5 (16.67 % de Triclosán), E) Lote 6 (23.08 % de Triclosán) y F) Lote 7 (33.33% de Triclosán). La barra mayor representa 1 μm.

Dentro del marco teórico se señaló que Quintanar-Guerrero y colaboradores (1997b) sugieren que en el método de emulsificación-difusión las nanopartículas son formadas por la difusión del solvente desde los glóbulos de la emulsión. Cuando el solvente difunde acarrea moléculas de polímero hacia la fase acuosa, originando regiones locales de supersaturación, desde las cuales son formados nuevos glóbulos o agregados de polímeros (no totalmente desolvatados). La estabilización de estas "protonanopartículas" por la presencia de un estabilizante (PVAL) es muy importante para evitar su coalescencia y la formación de aglomerados. Entoncecs, si el estabilizante permanece en la interfase líquido-líquido durante el proceso de difusión y su efecto protector es adecuado, se formarán las nanopartículas después de que se ha completado la difusión del solvente. En la figura 29 se esquematiza el mecanismo de formación de nanopartículas por este método.

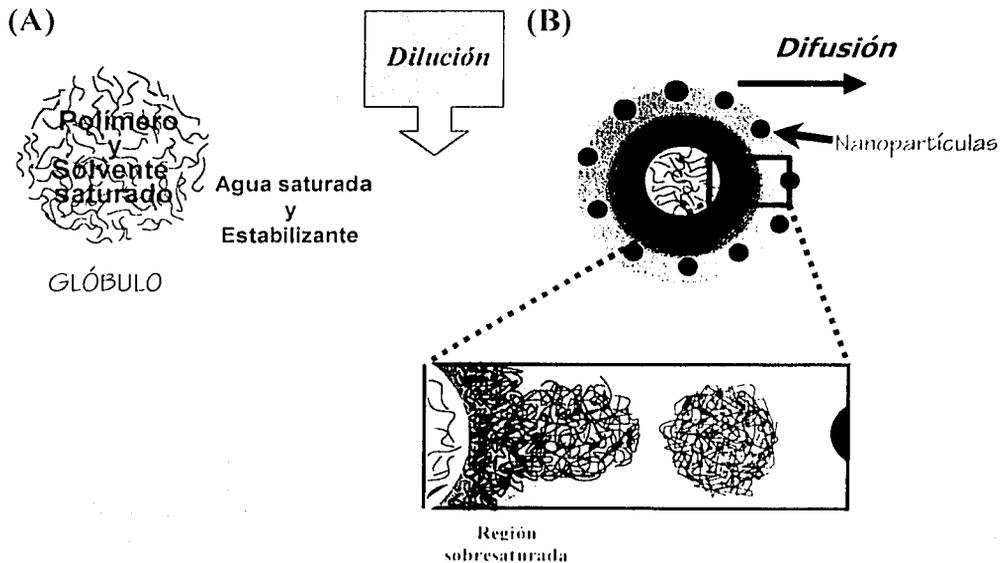
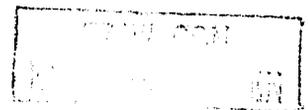


Figura 29. Esquema del mecanismo propuesto para la formación de nanopartículas por el método de emulsificación difusión. (A) Antes de la etapa de difusión, (B) Después de la etapa de difusión [Modificado de Quintanar-Guerrero y cols , 1997b]



La cantidad residual de estabilizante (PVAL) en las nanoesferas obtenidas se determinó con base en un método validado por Raygoza y colaboradores (1996); se fundamenta en una técnica propuesta por Joseph H. Finley en 1961 para cuantificar PVAL en papel y que posteriormente fue adaptada por Allémann y colaboradores (1993) para la cuantificación de PVAL residual en nanopartículas de PLA. El PVAL forma complejos coloridos con yodo en presencia de ácido bórico. El compuesto formado es de color verde y dicho complejo es estable por 15 minutos [Raygoza y cols., 1995].

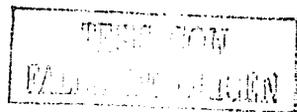
Después de determinar espectrofotométricamente la cantidad de triclosán presente en las nanoesferas se procedió a calcular el porcentaje de fármaco contenido en las nanoesferas (% de triclosán cargado) y la eficiencia de encapsulamiento (E.E.) para cada uno de los lotes de acuerdo a lo propuesto por Leroux y colaboradores (1994), las fórmulas empleadas fueron las siguientes:

$$\text{Triclosán Cargado (\%)} = \frac{\text{Cantidad de Triclosán en nanoesferas}}{\text{Cantidad de nanoesferas}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación (2)}$$

$$\text{E.E. (\%)} = \frac{\% \text{ Triclosán cargado}}{\% \text{ Triclosán inicial} \cdot (1 - \text{fracción de PVAL residual})} \cdot 100 \quad \text{Ecuación (3)}$$

Debido a que cierta cantidad de PVAL se adsorbe en la superficie de la nanopartículas durante el proceso de obtención de las mismas, se debe introducir el factor de corrección  $1/(1-\text{fracción de PVAL residual})$  para evitar una sobrestimación de la eficiencia de encapsulamiento [Leroux y cols., 1994]. Para el porcentaje de triclosán inicial (% Triclosán inicial) se consideró la cantidad de triclosán empleada en la preparación de cada lote

Diversos autores no consideran el factor de corrección antes señalado. Por ejemplo, Görner y colaboradores (1999) prepararon nanoesferas de PLA cargadas con lidocaína y no consideran el PVAL residual para la determinación de la E.E., a pesar de tener nanoesferas con 8.1 % de PVAL.



Es importante señalar que en algunos trabajos se reporta el porcentaje de recobro de fármaco, el cual es igual al % E.E. sin considerar el factor de corrección por residuos del estabilizante polimérico [Niwa y cols., 1993 y Kawashima y cols. 1999].

Los resultados obtenidos para los diferentes lotes de nanoesferas se incluyen en la Tabla 5, sólo se muestran los promedios de las tres determinaciones realizadas.

Tabla 5. Caracterización de nanoesferas de PLGA, PLA y CAP (Porcentaje de triclosán cargado en las nanoesferas, Porcentaje de PVAL residual y Eficiencia de Encapsulamiento).

Lote	Polímero		Triclosán (mg)	% Triclosán inicial	E.E. (%)	% Triclosán Cargado	% PVAL residual
	Nombre	(mg)					
1	PLGA	400.0	0.0	0.00	—	—	2.14
2	PLGA	4000.0	50.0	1.23	70.04	0.84	2.85
3	PLGA	2400.0	120.0	4.76	85.12	3.93	3.04
4	PLGA	2000.0	200.0	9.09	63.88	5.62	3.22
5	PLGA	800.0	160.0	16.67	71.40	11.46	3.70
6	PLGA	400.0	120.0	23.08	72.23	16.18	2.93
7	PLGA	400.0	200.0	33.33	73.04	23.75	2.45
8	PLA	400.0	0.0	0.00	0.00	0.00	2.74
9	PLA	4000.0	50.0	1.23	88.51	1.06	2.99
10	PLA	2400.0	120.0	4.76	89.40	4.10	3.69
11	PLA	2000.0	200.0	9.09	79.52	7.03	2.76
12	CAP	400.0	0.0	0.00	0.00	0.00	2.35
13	CAP	4000.0	50.0	1.23	82.28	0.98	3.52
14	CAP	2400.0	120.0	4.76	87.90	4.07	2.77
15	CAP	2000.0	200.0	9.09	89.21	7.92	2.34

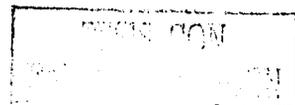
Para todos los lotes se obtuvieron residuos de PVAL muy bajos (<4%), lo cual indica que los lavados realizados durante el proceso con la finalidad de eliminar el PVAL son adecuados. Quintanar-Guerrero y colaboradores (1998b) reportan 6-8 % de PVAL residual en nanoesferas de PLA preparadas por el método de emulsificación difusión. Algunos otros autores reportan PVAL residual desde 5 hasta 10 % para nanopartículas de PLA cargadas con savoxepina preparadas por el método de salting-out y 5.5 y 9.8 % para nanopartículas de PLA con cloramibucilo preparadas por el método de emulsificación difusión [Allémman y cols., 1993 y Leroux 1995].



El PVAL funciona como un coloide protector para las glóbulos de la emulsión formada durante la preparación de las nanoesferas; las moléculas de PVAL adsorbidas en la superficie de los glóbulos previenen su coalescencia [Niwa y cols., 1993]. Además, el PVAL forma una capa estable sobre la superficie de las nanopartículas la cual permite una redispersión casi instantánea cuando las nanopartículas liofilizadas son suspendidas en agua [Allémman y cols., 1993; Leroux 1995 Quintanar-Guerrero y cols., 1998b].

Los porcentajes de E.E. pueden considerarse como muy aceptables pues, generalmente, es difícil alcanzar eficiencias mayores al 80%. A pesar de que el triclosán es un compuesto considerado prácticamente insoluble en agua, es probable que al manejar grandes volúmenes de agua durante la preparación de las nanoesferas parte del triclosán sea arrastrado, lo cual disminuye la cantidad de triclosán cargada en las nanopartículas. Asimismo, al utilizar un solvente parcialmente miscible en agua (acetato de etilo) el triclosán pudo haber sido arrastrado fuera de los glóbulos de la emulsión durante la etapa de difusión en el proceso de formación de las nanopartículas, es decir, en el momento en que se agrega agua destilada al sistema. Además el triclosán pudo eliminarse junto con el sobrenadante de los procesos de lavado-centrifugado.

Como se señaló anteriormente, en las fotografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido se observó que las nanoesferas de PLGA con altas proporciones de triclosán tendían a fusionarse unas con otras. En un estudio previo se planteó la posibilidad de que el triclosán pudiese fungir como un plastificante no convencional que favoreciera la formación de películas [Piñón-Segundo y cols., 2000]. En las figuras 30, 31 y 32 se presentan compendios de los termogramas obtenidos para los diferentes lotes de nanopartículas y para el triclosán, las muestras de nanoesferas de cada polímero se analizaron bajo las mismas condiciones y se presentan en un solo gráfico para facilitar su análisis.



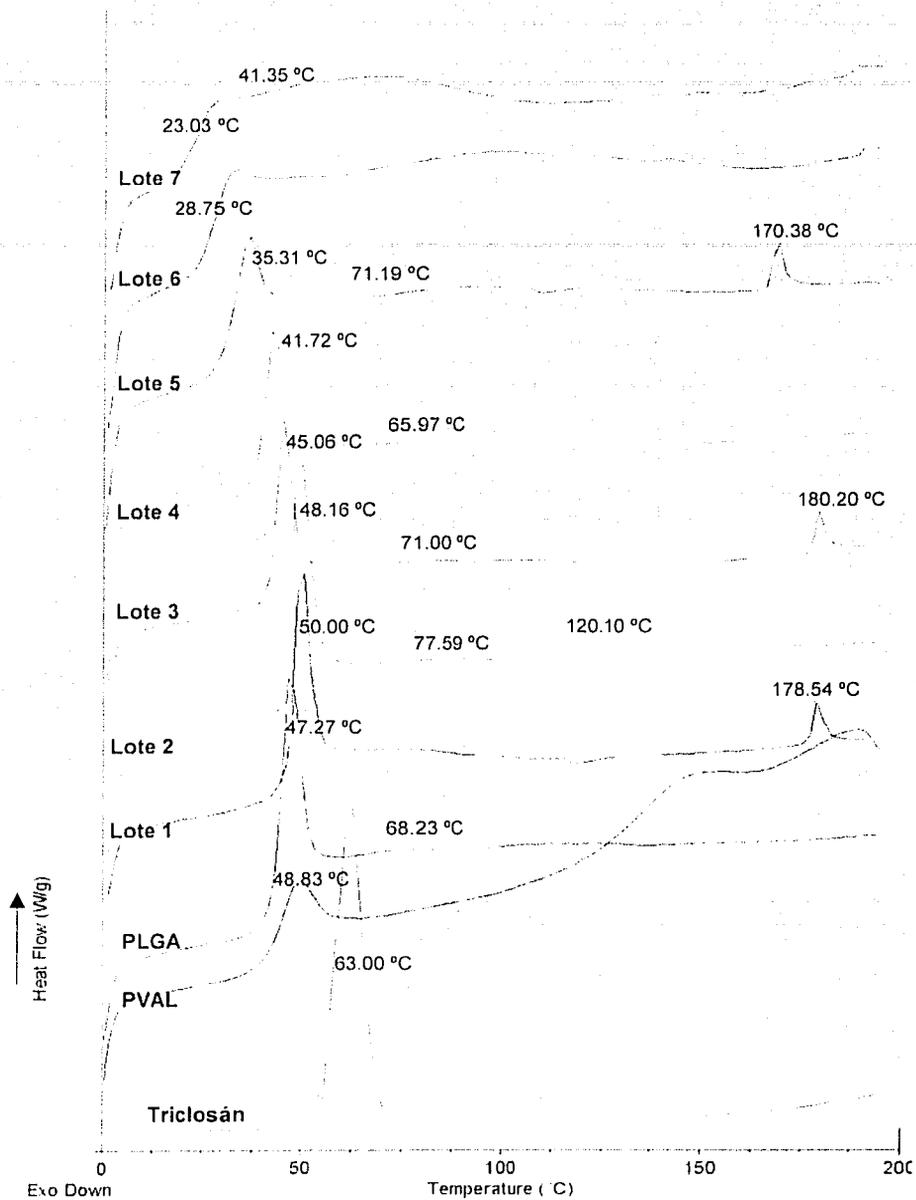


Figura 30. Termogramas para triclosán y nanoesferas de PLGA con Triclosán. Porcentajes de triclosán: Lote 1, 0%, Lote 2, 1.23%, Lote 3, 4.76%, Lote 4, 9.09%, Lote 5, 16.67%, Lote 6, 23.08% y Lote 7, 33.33%.



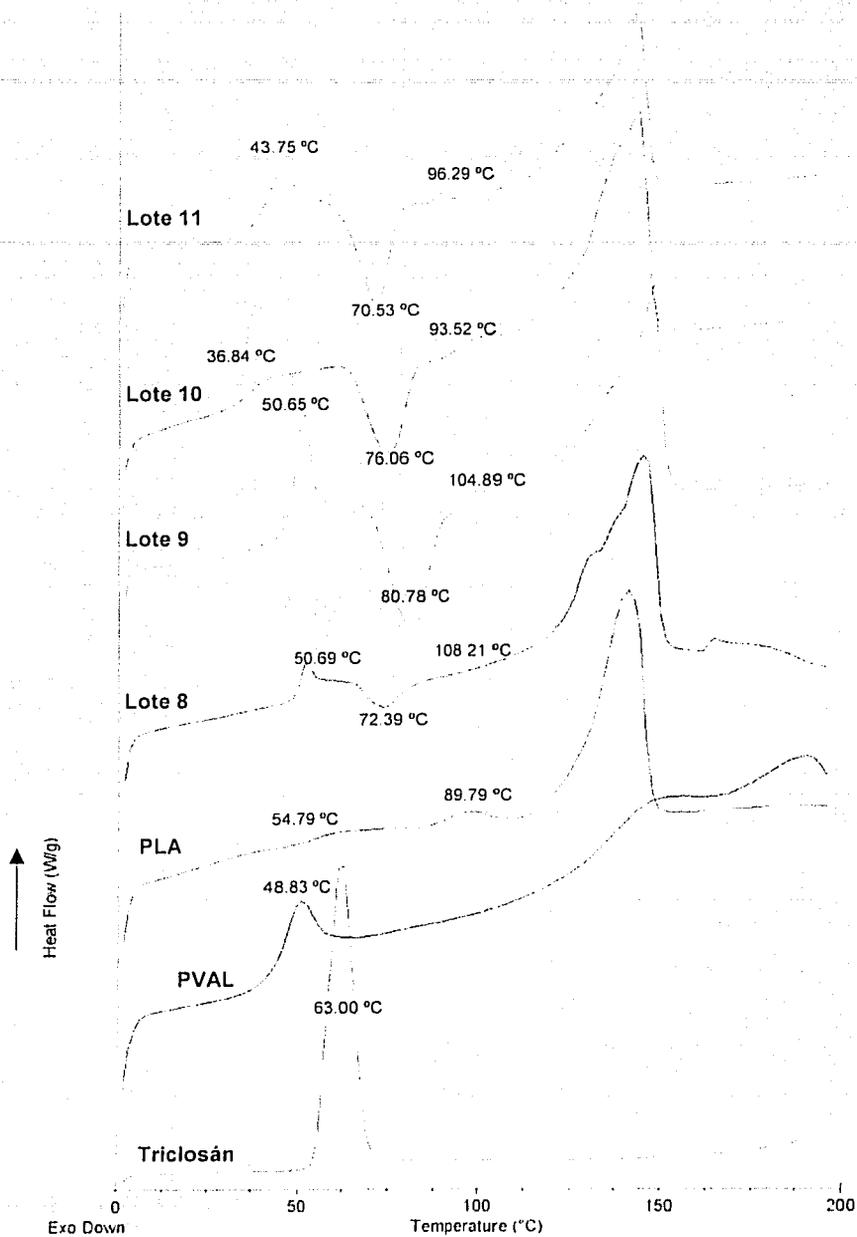
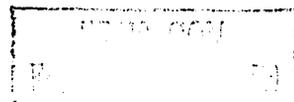


Figura 31. Termogramas para nanoesferas de PLA con Triclosán. Porcentajes de triclosán: Lote 8, 0%, Lote 9, 1.23%, Lote 10, 4.76% y Lote 11, 9.09%.



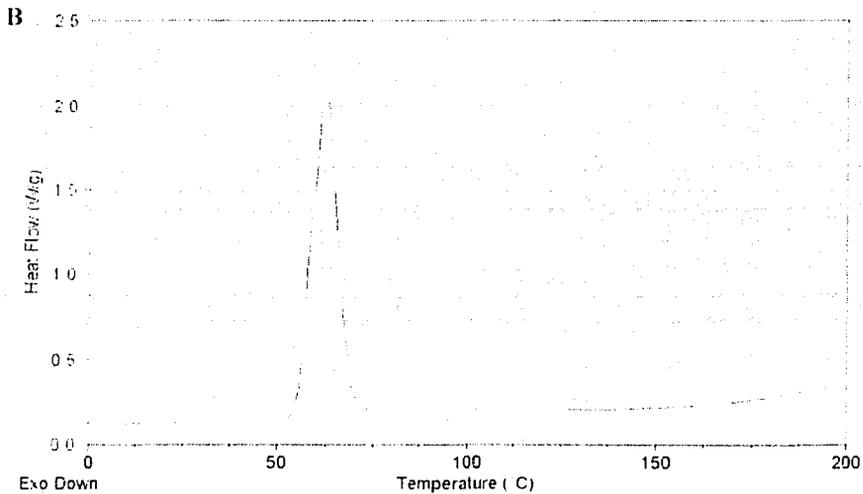
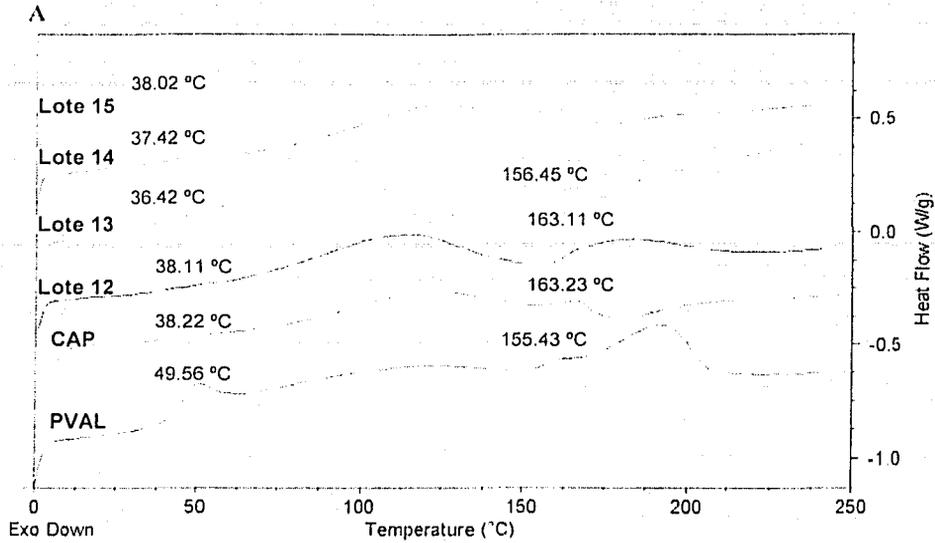


Figura 32. A) Termograma para nanoesferas de CAP con Triclosán. Porcentajes de triclosán: Lote 12, 0%; Lote 13, 1.23%, Lote 14, 4.76% y Lote 15, 9.09%. B) Termograma para Triclosán.



Peracchia y colaboradores (1997) reportan la preparación de nanoesferas de PLA, PLGA y PCL cargadas con lidocaína y cubiertas de polietilenglicol (PEG) con el propósito de prolongar el tiempo de circulación en sangre puesto que las cadenas hidrofílicas del PEG en la superficie del acarreador previenen el reconocimiento de las nanoesferas por parte del sistema fagocítico mononuclear. En pruebas de calorimetría diferencial de barrido encontraron que las nanoesferas de PCL cubiertas con PEG presentaban un comportamiento térmico diferente al aumentar la proporción de lidocaína en el sistema. Los picos endotérmicos del termograma (atribuidos a la lidocaína) se desplazaban hacia temperaturas más bajas conforme se aumentaba la proporción de lidocaína con respecto al polímero, además de modificarse la forma de los picos, tendiendo a ensancharse al aumentar la cantidad de lidocaína (30%). Los datos obtenidos sugirieron que la lidocaína y el polímero acarreador interactúan uno con el otro lo cual es de gran relevancia ya que dichas interacciones afectan el proceso de liberación del activo. Para las nanoesferas de PLGA y PLA con lidocaína no se apreciaron diferencias notables en los picos obtenidos para el fármaco puro y las nanoesferas con 10, 20 y 33% de lidocaína; se registraron picos muy semejantes en forma y magnitud al de la lidocaína, además de que se localizaban a la misma temperatura.

Otros autores [Gref y cols., 1994] con estudios de calorimetría y rayos X han demostrado que la lidocaína puede cristalizar en las nanoesferas, durante el proceso de fabricación, cuando se trabaja con cargas cercanas o superiores al 30 % p/p. Cuando la carga de activo es menor al 10 % la lidocaína se dispersa molecularmente en las nanoesferas y con porcentajes de carga mayores parte del activo cristaliza en las nanoesferas por lo que la lidocaína cristalizada se disuelve y difunde más lentamente hacia la fase acuosa.

Considerando los dos párrafos anteriores podemos afirmar que la lidocaína de las nanoesferas preparadas por Peracchia y colaboradores (1997) no se encontraba dispersa en la matriz polimérica sino que se encontraba en forma de cristales, por lo que al hacer el estudio por calorimetría diferencial de barrido con las nanoesferas cargadas se detectaban picos característicos de la fusión del activo.

Una de las principales aplicaciones de la calorimetría diferencial de barrido para el análisis de las nanoesferas es la determinación de la forma en que se encuentra el activo en la matriz polimérica, pues permite establecer si el activo se encuentra disperso molecularmente en la matriz o en forma de cristales.



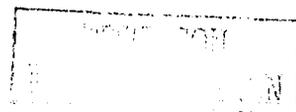
Cuando existe una dispersión molecular del activo en las nanopartículas no se detecta el pico endotérmico característico de la fusión del activo en los termogramas de las nanopartículas cargadas. Una vez comprobada la dispersión molecular del activo en la matriz polimérica se puede determinar si existen interacciones químicas entre el fármaco y el polímero utilizando rayos X o espectros de infrarrojo [Calvo y cols., 1996].

En las figuras 30, 31 y 32 puede apreciarse que en ninguno de los termogramas de las nanoesferas con triclosán se presenta la endoterma del triclosán (63 °C) por lo que se afirma que en todos los lotes preparados (nanoesferas de PLGA, PLA y CAP) el triclosán se encuentra disperso molecularmente.

En la figura 30 se muestra el termograma para el PLGA, se presenta una endoterma relacionado con la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) del polímero a 47.27 °C; también se encuentra un cambio atribuible a una transición vítrea a 68.23 °C. Fitzgerald y Corrigan (1996) prepararon microesferas de PLGA con levamisol y reportan una temperatura de transición vítrea para el polímero a 51 °C. La  $T_g$  del PLA y del PLGA puede verse disminuida por la hidratación del polímero. El termograma del PVAL presenta un pico relacionado con la  $T_g$  a 48.83 °C. En el termograma del lote 1 se aprecia que aparece una endoterma a 178.54 °C, considerando que este pico no se aprecia en el termograma del polímero puro puede pensarse que la endoterma se relaciona con el PVAL residual presente en las nanoesferas. En los termogramas de los lotes 2 al 7 puede apreciarse que, al aumentar la cantidad de triclosán en las nanoesferas, la temperatura de transición vítrea del polímero disminuye.

Relacionando los resultados obtenidos con las fotografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido podemos afirmar que el triclosán está actuando como un plastificante no convencional que favorece la unión entre las nanoesferas.

En la figura 31 se incluye el termograma para el PLA, se aprecian dos temperaturas de transición vítrea a 54.79 y 89.79 °C. El termograma para el lote 8 (nanoesferas de PLA sin triclosán) presenta un exoterma a 80.78 °C, el cual se atribuye a un proceso de cristalización. En los termogramas de los lotes 9 y 11 se aprecian endotermas a 50.65 y 43.75 °C, respectivamente, los cuales se atribuyen a la  $T_g$  del polímero; también se observan señales a 104.89 y 96.29 °C relacionadas también con una



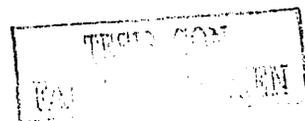
transición vítrea del polímero. Para el lote 10 no se aprecia de una manera muy clara la primer endoterma, sólo se observa un ligero cambio de pendientes ( $T_g$ ) a  $36.84\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $93.52\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

En la figura 32 se muestran los termogramas para el triclosán y para las nanoesferas de CAP con triclosán. Puede apreciarse que el triclosán se encuentra disperso molecularmente en el polímero. No se detectan cambios considerables en las temperaturas de transición vítrea en los diferentes lotes de nanoesferas para este polímero.

Con respecto al análisis de la liberación *in vitro* del triclosán a partir de las nanoesferas preparadas se realizaron estudios empleando un sistema que permitiese el contacto directo entre el medio de disolución y las nanoesferas analizadas.

Es recomendable que los estudios de liberación se efectúen bajo condiciones "sink", es decir, por debajo del 15% de la solubilidad. Si el fármaco en estudio es pobremente soluble en agua es válido adicionar solventes no acuosos o agentes solubilizantes al medio de dispersión con el objeto de mantener las condiciones "sink". Este tipo de estudios pueden ser de gran importancia para la determinación del mecanismo de liberación del activo a partir del acarreador. Si el fármaco es liberado por difusión a través de la matriz polimérica, la composición del solvente en condiciones "sink" puede no influenciar la liberación del activo; pero si el solvente penetra en la matriz, es muy probable que la composición del medio de disolución influya en la liberación del fármaco aún cuando se mantengan condiciones "sink" [Washington, 1990]. Leclarasamce y colaboradores (1986) observaron que al adición de agentes solubilizantes por debajo de la concentración micelar crítica al medio en condiciones "sink" incrementa la velocidad de liberación de hidrocortisona a partir de microcápsulas de ácido poli-D,L-láctico. Propusieron que ese efecto puede ser ocasionado porque se favorece el mojado del polímero y se incrementa la penetración del solvente.

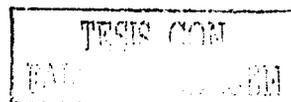
Como se señaló en el marco teórico, los métodos hasta ahora utilizados para el estudio de los perfiles de liberación de activos a partir de sistemas nanoparticulados no han sido totalmente aceptados. En el presente trabajo uno de los objetivos fue diseñar un aparato que nos permitiera evaluar la liberación real de las nanoesferas obtenidas sin el uso de membranas o bolsas de diálisis que limitaran la liberación del activo. Debido a que el fármaco empleado (triclosán) es prácticamente insoluble en agua se decidió adicionar al medio de disolución un agente que facilitara su disolución y por tanto aumentara la



solubilidad. Se realizaron varias pruebas utilizando diferentes concentraciones de Tween<sup>®</sup> 80 y de Brij<sup>®</sup> 58; finalmente se decidió trabajar con Brij<sup>®</sup> 58 al 2% pues este surfactante a esa concentración aumentó la solubilidad del triclosán y no alteró la detección espectrofotométrica del mismo.

Es importante aclarar que se realizaron diversas pruebas para seleccionar el volumen de medio a utilizar, así como el volumen muestreado durante las disoluciones, los mejores resultados se obtuvieron con 500 ml de medio de disolución y volúmenes de muestra de 3 ml. Los resultados muestran sólo las 6 primeras horas de la liberación, después de 24 horas se muestreo nuevamente y en ninguna de las disoluciones se observó cambio alguno; lo que indicó que todo el triclosán había sido liberado y que se había alcanzado la concentración máxima que nos permitió conocer la cantidad máxima liberada ( $M_{\infty}$ ). Las disoluciones se llevaron a cabo por triplicado.

En el anexo 2 se reportan los porcentajes de triclosán liberados para cada lote de nanoesferas respecto al porcentaje de triclosán cargado en las nanopartículas indicado en la tabla 5. Aunque el porcentaje liberado se calculó para cada una de las disoluciones sólo se incluye el promedio para cada lote y la desviación estándar. Con esos datos se construyeron los gráficos 2, 3 y 4 en los que se indica el porcentaje de activo liberado en función del tiempo.



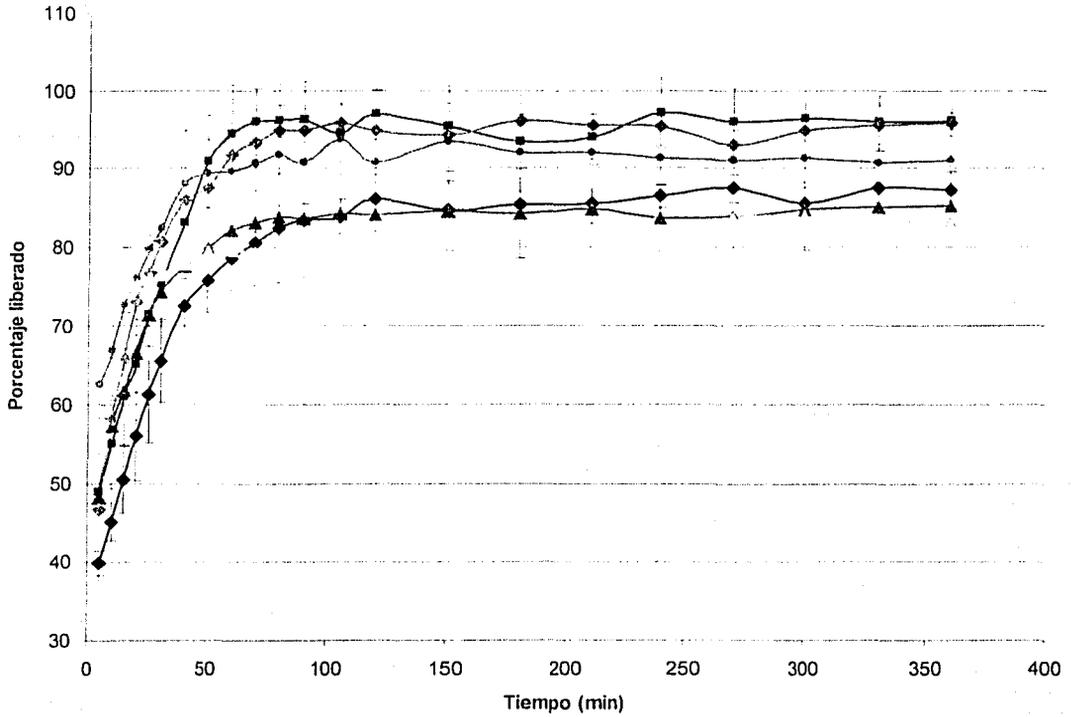


Gráfico 2. Perfil de liberación para las nanoesferas de PLGA con triclosán, considerando como 100% el triclosán cargado en las nanoesferas. —◆— Lote 2 (1.23 % de Triclosán); —■— Lote 3 (4.76 % de Triclosán); —▲— Lote 4 (9.09 % de Triclosán); —◆— Lote 5 (16.67 % de Triclosán); —●— Lote 6 (23.08 % de Triclosán) y —◆— Lote 7 (33.33% de Triclosán).



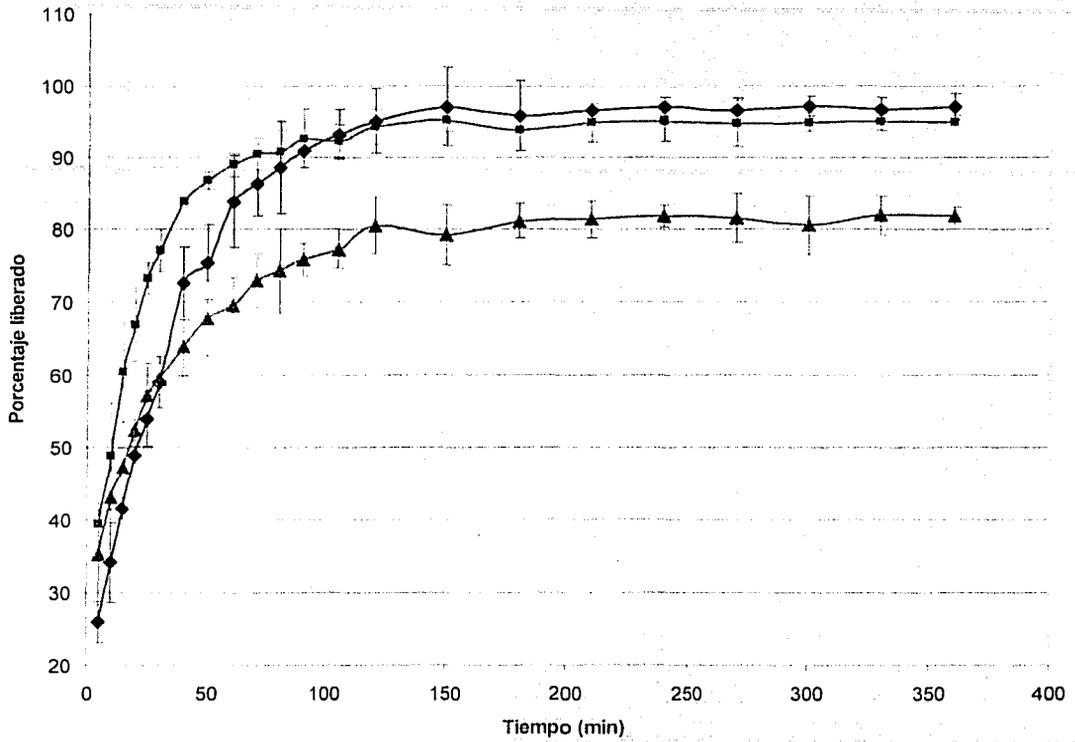
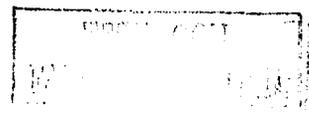


Gráfico 3. Perfil de liberación para las nanoesferas de PLA con triclosán, considerando como 100% el triclosán cargado en las nanoesferas. —◆— Lote 9 (1.23 % de Triclosán); —■— Lote 10 (4.76 % de Triclosán) y —▲— Lote 11 (9.09 % de Triclosán).



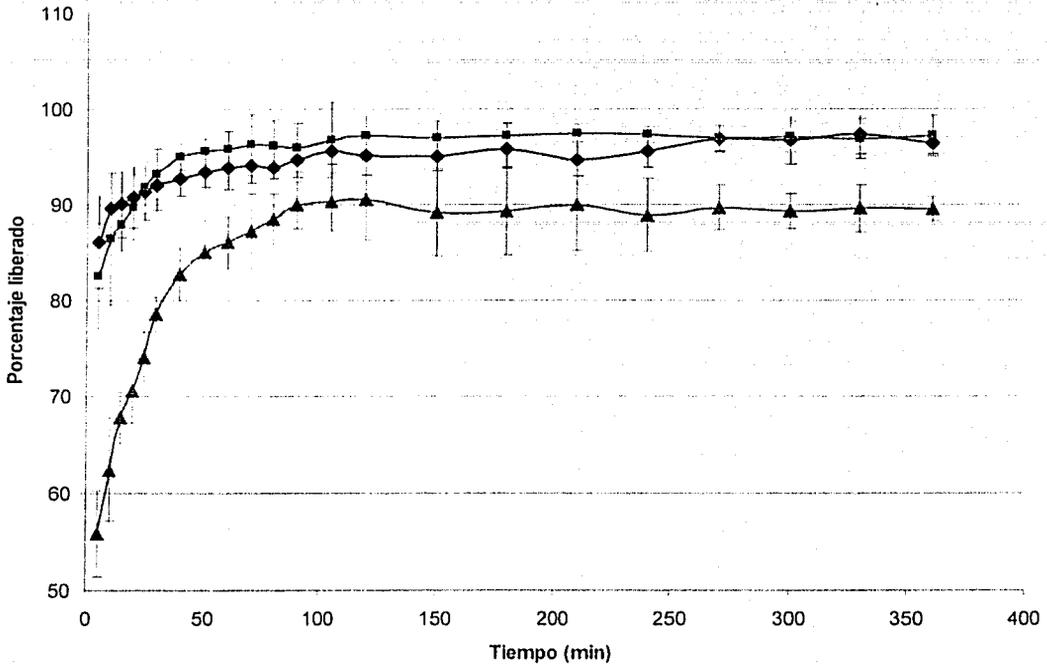
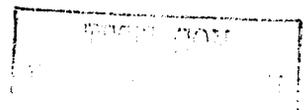


Gráfico 4. Perfil de liberación para las nanoesferas de CAP con triclosán, considerando como 100% el triclosán cargado en las nanoesferas. —◆— Lote 13 (1.23 % de Triclosán); —■— Lote 14 (4.76 % de Triclosán) y —▲— Lote 15 (9.09 % de Triclosán).

Los porcentajes incluidos en el anexo 3 representan la cantidad de fármaco que realmente es capaz de difundir hacia el medio de disolución, la cantidad que participa en el proceso de liberación. Por esta razón, se procedió a calcular los porcentajes liberados para cada tiempo considerando como el 100% ya no la carga total de triclosán en las nanoesferas, sino la cantidad máxima liberada al equilibrio. En el anexo 3 se presentan los promedios de los porcentajes de triclosán liberado a diferentes tiempos y la desviación estándar de los mismos considerando como 100% la cantidad máxima liberada. Con los datos obtenidos se obtuvieron los gráficos 5, 6 y 7, donde  $M_t$  es la cantidad liberada a un tiempo  $t$  y  $M_{\infty}$  es la cantidad máxima liberada de triclosán.



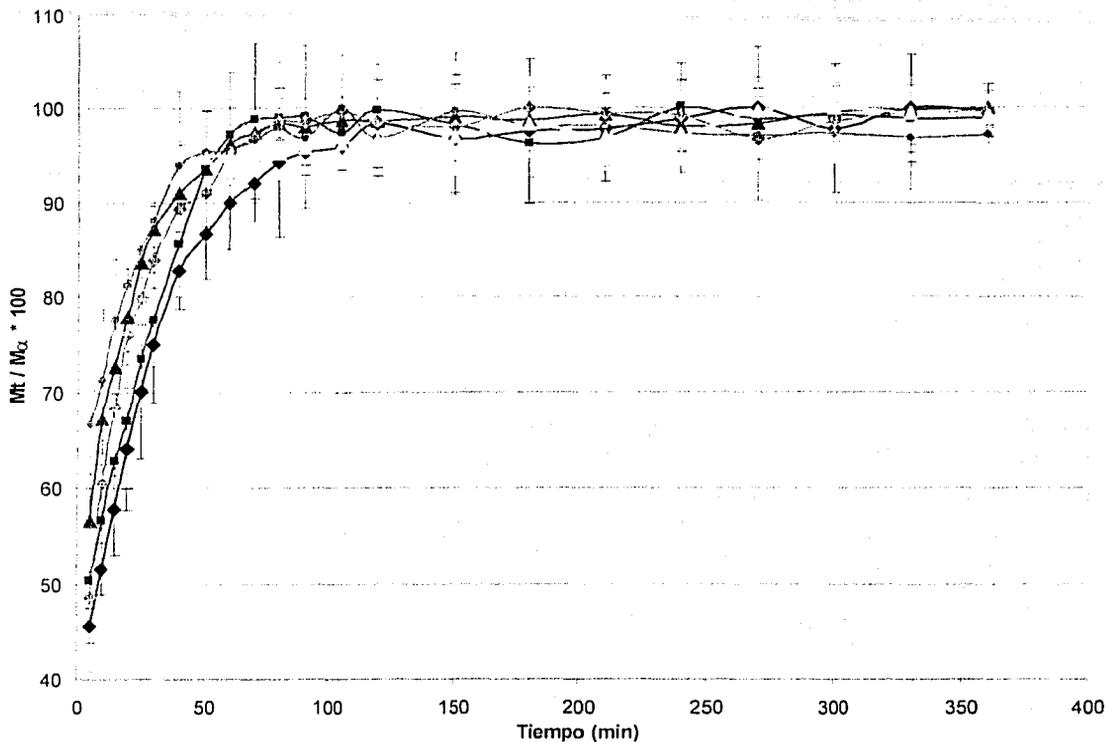
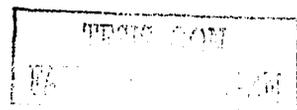


Gráfico 5. Perfil de liberación para las nanoesferas de PLGA con triclosán, considerando como 100% la cantidad máxima liberada. —◆— Lote 2 (1.23 % de Triclosán); —■— Lote 3 (4.76 % de Triclosán); —▲— Lote 4 (9.09 % de Triclosán); —◇— Lote 5 (16.67 % de Triclosán); —●— Lote 6 (23.08 % de Triclosán) y —○— Lote 7 (33.33% de Triclosán).



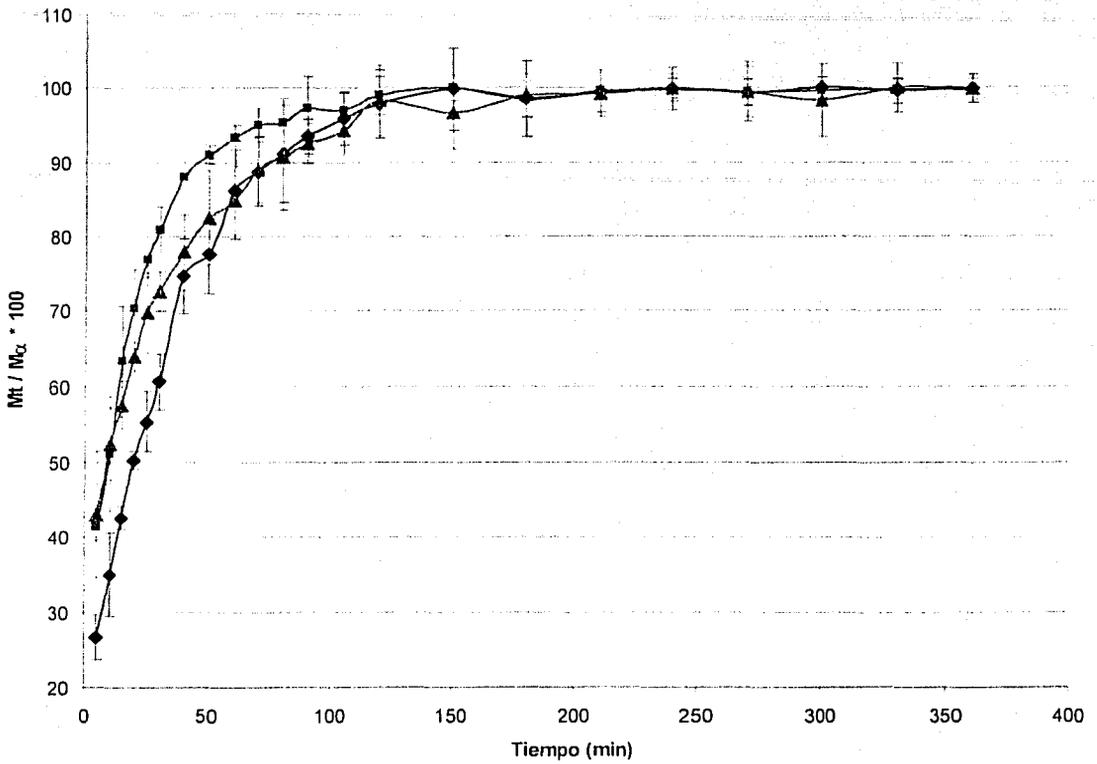
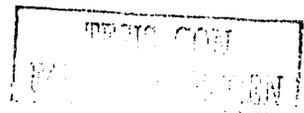


Gráfico 6. Perfil de liberación para las nanoesferas de PLA con triclosán, considerando como 100% la cantidad máxima liberada. —●— Lote 9 (1.23 % de Triclosán); —■— Lote 10 (4.76 % de Triclosán) y —▲— Lote 11 (9.09 % de Triclosán).



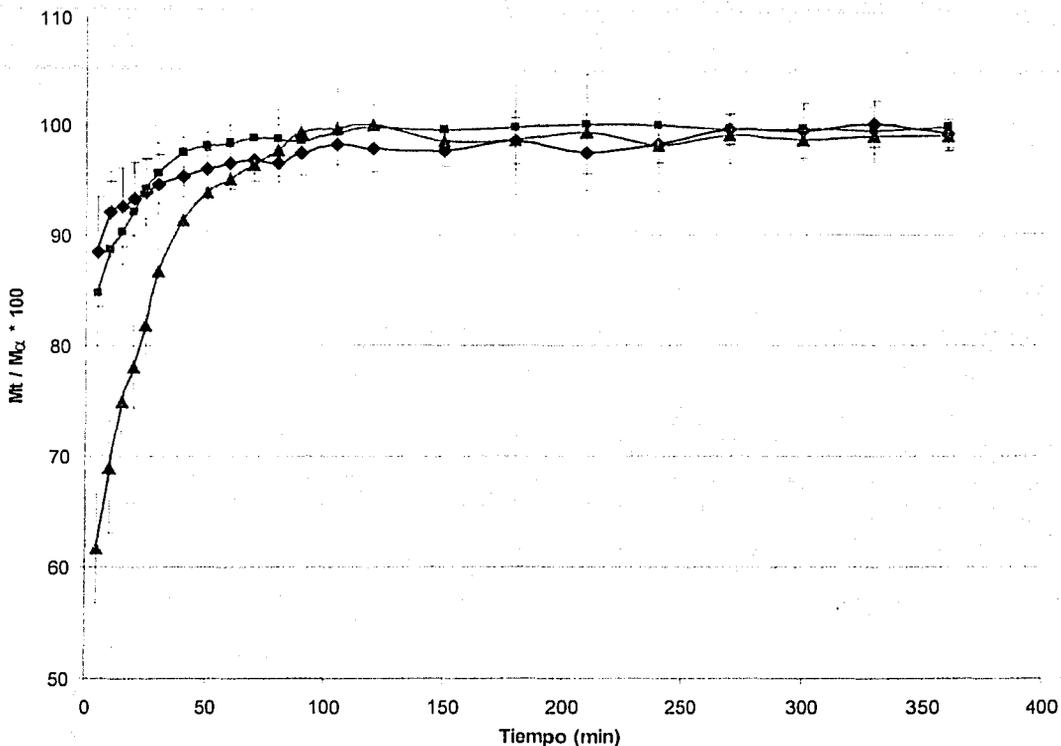
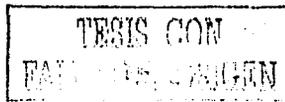


Gráfico 7. Perfil de liberación para las nanoesferas de CAP con triclosán, considerando como 100% la cantidad máxima liberada. —◆— Lote 13 (1.23 % de Triclosán); —■— Lote 14 (4.76 % de Triclosán) y —▲— Lote 15 (9.09 % de Triclosán).

En los gráficos anteriores puede apreciarse que el triclosán se liberó rápidamente. Al inicio de este proyecto se había contemplado únicamente el estudio de la liberación de nanoesferas de PLGA y al ver algunos perfiles de liberación de pruebas preliminares que se realizaron con el propósito de definir los volúmenes del medio de disolución y de las muestras tomadas se decidió preparar nanoesferas con otros polímeros para determinar si presentaban el mismo comportamiento.

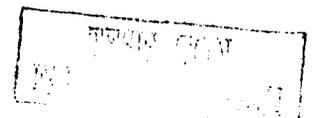
En el gráfico 5 se observa que el lote 2 que contenía menor proporción de triclosán (1.23%) es el que libera más lentamente. En general, como era esperado, al aumentar la cantidad de triclosán en las nanoesferas la liberación es más rápida porque hay más fármaco en la matriz. El lote 7 con 33.33% de



triclosán libera casi inmediatamente el 90% del total de triclosán ( $t = 20$  min). Es importante señalar que las nanoesferas entran en contacto directo con el medio de disolución, por lo que se favorece una rápida liberación del triclosán.

En 1996, P. Calvo y colaboradores realizaron un estudio de liberación *in vitro* para nanoesferas, nanocápsulas y nanoemulsiones por el método de bolsa de diálisis reversa; el polímero usado fue poli- $\epsilon$ -caprolactona y el activo fue indometacina. Los perfiles de liberación obtenidos fueron similares para las tres formulaciones, el 85 % del activo es liberado en las dos primeras horas y en 4 horas se libera el 100 %. La liberación rápida del activo únicamente se presentó cuando se mantuvieron condiciones "sink" pues en lotes de suspensiones no diluidas que se utilizaron para analizar la estabilidad del tamaño de partícula no se detectó liberación total del fármaco aún después de 6 meses de almacenamiento, lo anterior indicó que un factor muy importante para la liberación de la indometacina de estos acarreadores coloidales es el volumen del medio en el que se llevó a cabo la liberación. La liberación de indometacina de las nanocápsulas y la nanoemulsión fue afectada por la partición del fármaco entre las gotas de aceite y el medio acuoso externo. La rápida liberación de la indometacina de las nanoesferas se atribuyó a un mecanismo de difusión a través de la matriz polimérica favorecido por alta permeabilidad del polímero a sustancias de bajo peso molecular por poseer una baja temperatura de transición vítrea ( $T_g = 60$  °C). Es importante recalcar que los estudios de calorimetría diferencial de barrido que se realizaron indicaron que la indometacina estaba dispersa molecularmente en el polímero.

En otra investigación, Górner y colaboradores (1999) prepararon nanopartículas de PLA con un anestésico local, lidocaína, cargadas con diferentes cantidades del fármaco. Las partículas con más carga de lidocaína (30%) presentaron una liberación lenta (24-30 horas) y nanoesferas con 13% de lidocaína liberaron su contenido en 15 horas y nanoesferas con 7% de lidocaína liberaron el fármaco en tan sólo un par de horas. Podría esperarse que mientras exista menos lidocaína en la matriz la liberación sea más lenta, sin embargo ocurre lo contrario. Un dato importante en ese estudio es que el tamaño de las nanoesferas aumenta notablemente con el incremento de la cantidad de lidocaína, nanoesferas con 30% de lidocaína midieron aproximadamente 800 nm, mientras que las que contenían 7% de lidocaína fueron de 250 nm. Probablemente el aumento del área superficial en las nanoesferas con menor tamaño (7% de lidocaína) influya más en el proceso de liberación que la proporción de activo y

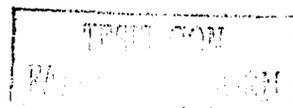


polímero en el sistema. Además, la velocidad de liberación del activo está relacionada directamente con la manera en que se encuentre presente el fármaco en la matriz, es decir si se encuentra disperso molecularmente en la matriz polimérica o formando de cristales. Otros autores [Gref y cols., 1994] con estudios de calorimetría y rayos X han demostrado que la lidocaína puede cristalizar en las nanoesferas cuando se trabaja con cargas cercanas o superiores al 30 % p/p durante el proceso de fabricación. Cuando la carga de activo es menor al 10 % la lidocaína se dispersa molecularmente en las nanoesferas y con porcentajes de carga mayores parte del activo cristaliza en las nanoesferas por lo que la lidocaína cristalizada se disuelve y difunde más lentamente hacia la fase acuosa.

En nuestro caso, las nanoesferas más pequeñas son las que contienen menos triclosán y a pesar de que el área superficial es mayor, la liberación es más lenta. Además, como se señaló anteriormente, las pruebas de calorimetría realizadas demostraron que el triclosán se encontraba disperso en la matriz polimérica sin formar cristales. La rápida liberación del triclosán de las nanoesferas preparadas puede ser atribuida también al sistema utilizado para la disolución, el cual es un buen solvente para el triclosán.

La liberación de fármacos a partir de nanopartículas depende de la naturaleza del sistema acarreador. En el caso de un sistema tipo matriz, el activo es distribuido o dispersado en la matriz polimérica y la liberación ocurre por difusión o por erosión del sistema. Si la difusión del activo es más rápida que la degradación de la matriz, entonces el mecanismo de liberación ocurre principalmente por difusión. La liberación inicial del activo se atribuye a la liberación de la fracción de fármaco que es adsorbido o enlazado débilmente a la superficie de las nanoesferas. Trabajando en condiciones "sink" se observa al principio una fase de liberación rápida seguida por una liberación más lenta debida a la difusión del activo a partir de la matriz [Soppimath y cols., 2001]. Además si se tiene un volumen del medio de disolución grande se favorece una completa y rápida liberación del fármaco contenido en las nanoesferas [Calvo y cols., 1996].

De acuerdo con los termogramas obtenidos para las nanoesferas de PLGA, PLA y CAP el triclosán se encuentra atrapado molecularmente en la matriz polimérica, por lo que podemos hablar de que las nanopartículas preparadas son un sistema tipo matriz. Podemos afirmar que el proceso que controló la liberación fue un proceso de difusión, pues los tiempos manejados son muy cortos como para poder hablar de que la degradación de los polímeros influyera sobre la liberación.



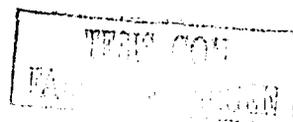
El ácido láctico es más hidrofóbico que el ácido glicólico por lo que los copolímeros de PLGA ricos en ácido láctico son menos hidrofílicos, absorben menos agua y por tanto se degradan más lentamente [Jain, 2000]. Considerando lo anterior se justifica el comportamiento observado para las nanoesferas de PLGA (Gráfico 5) con respecto a las de PLA (Gráfico 6), la liberación del triclosán a partir de nanoesferas de PLA es más lenta que a partir de nanoesferas de PLGA con el mismo contenido de triclosán.

Para determinar el probable mecanismo de liberación los datos obtenidos se trataron de acuerdo al modelo semi-empírico propuesto por Rigter y Peppas [Lowman y Peppas, 1999 y Peppas y cols., 2000], de acuerdo a este modelo se graficó  $\ln (M_t / M_\infty)$  en función de  $\ln t$ , donde  $M_t$  es la cantidad liberada al tiempo  $t$  y  $M_\infty$  es la cantidad máxima liberada. De acuerdo a este modelo, la fracción liberada de una sustancia depende de una constante y de un exponente difusional "n" que indica el probable mecanismo físico de transporte y el tipo de liberación (Ver Cuadro 6). Si  $n = 0.5$  el mecanismo de transporte es difusión fickiana y el tipo de liberación es dependiente del tiempo.

Cuadro 6. Mecanismo de transporte y tipo de liberación de acuerdo al valor de "n" en el modelo semi-empírico de Peppas.

Valor de "n"	Mecanismo de Transporte	Tipo de Liberación
0.5	Difusión Fickiana	Dependiente del tiempo $f(t^{1/2})$
$0.5 < n < 1$	Transporte No Fickiano (Anómalo)	Dependiente del tiempo $f(t^{n-1})$
1	Transporte Caso II	Independiente del tiempo (orden cero)
$n > 1$	Transporte Super Caso II	Dependiente del tiempo $f(t^{n-1})$

En los gráficos 8, 9 y 10 se reportan los datos obtenidos de acuerdo al modelo de Peppas, en la tabla 6 se muestran los valores de "n" para los diferentes lotes de nanoesferas. Los gráficos se obtuvieron a partir de los datos incluidos en el anexo 4.



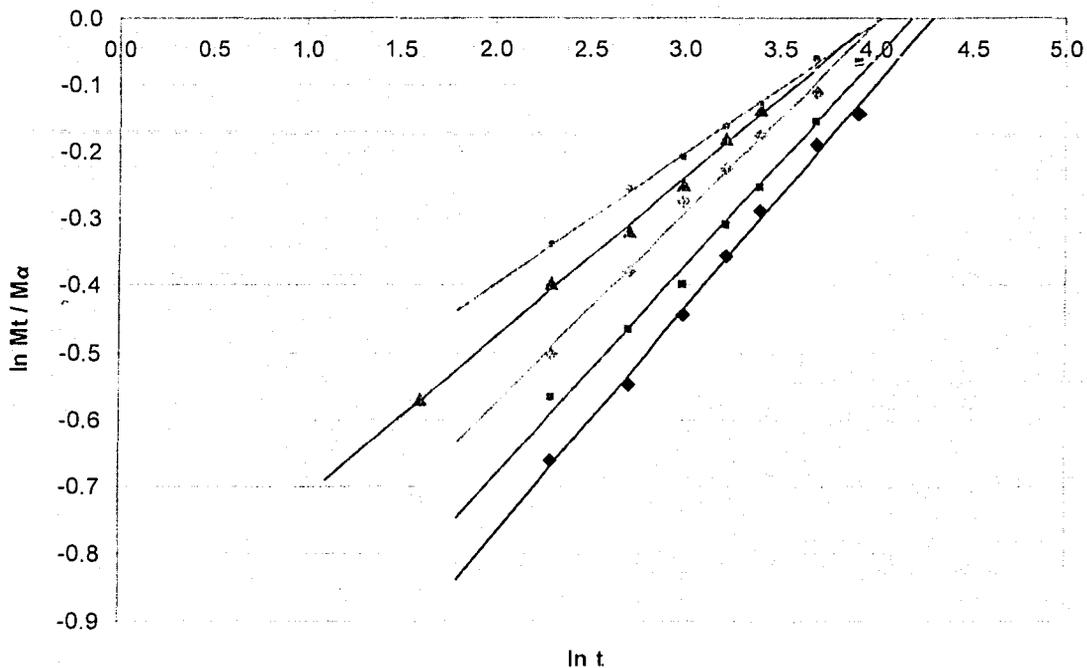
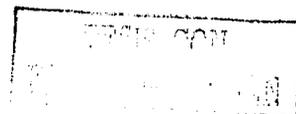


Gráfico 8. Modelo de Peppas aplicado a la liberación de triclosán a partir de nanoesferas de PLGA.  $\blacklozenge$  Lote 2 (1.23 % de Triclosán);  $\blacksquare$  Lote 3 (4.76 % de Triclosán);  $\blacktriangle$  Lote 4 (9.09 % de Triclosán);  $\blacklozenge$  Lote 5 (16.67 % de Triclosán);  $\blacktriangle$  Lote 6 (23.08 % de Triclosán) y  $\blacklozenge$  Lote 7 (33.33% de Triclosán).



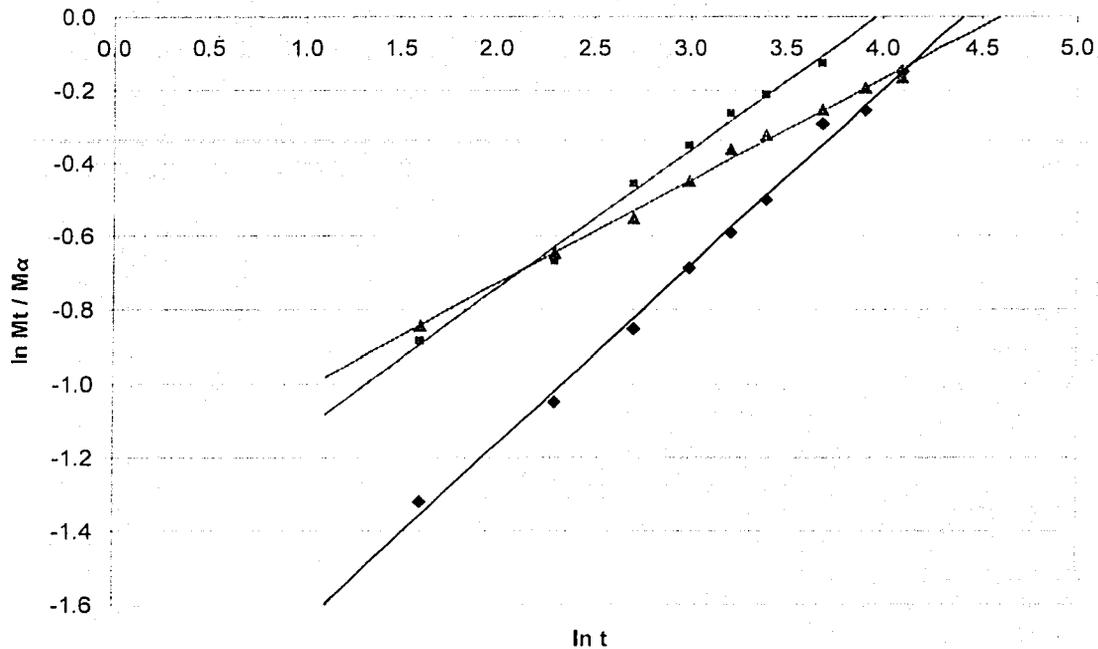
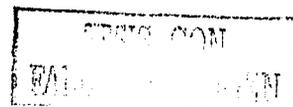


Gráfico 9. Modelo de Peppas aplicado a la liberación de triclosán a partir de nanoesferas de PLA. —◆— Lote 9 (1.23 % de Triclosán); —■— Lote 10 (4.76 % de Triclosán) y —▲— Lote 11 (9.09 % de Triclosán).



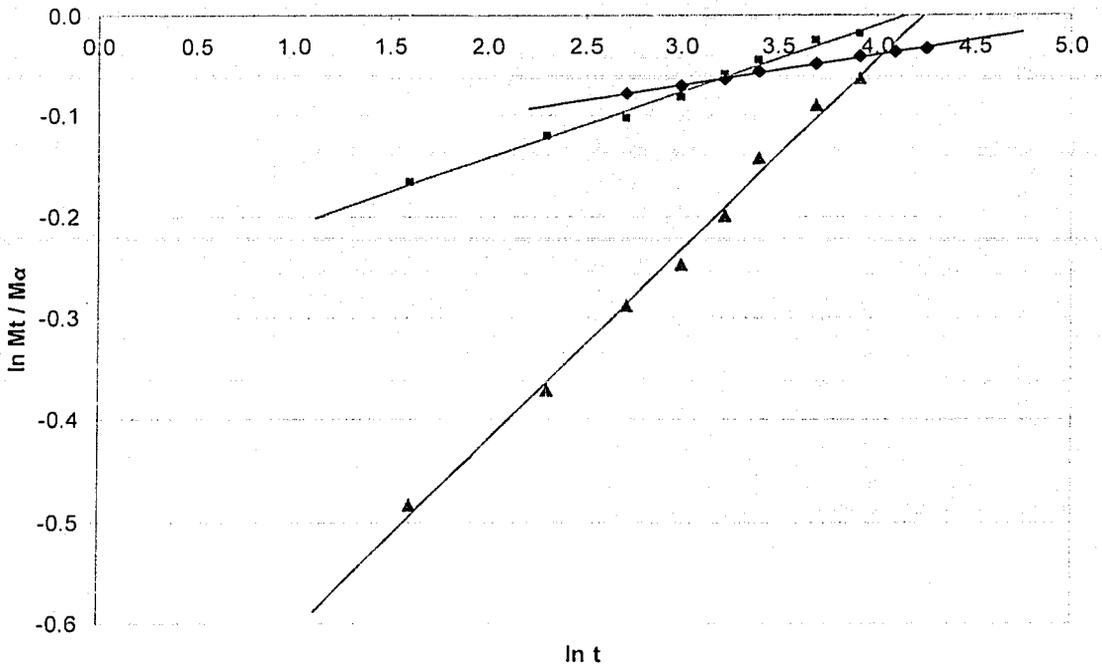


Gráfico 10. Modelo de Peppas aplicado a la liberación de triclosán a partir de nanoesferas de CAP. ◆ Lote 13 (1.23 % de Triclosán); ■ Lote 14 (4.76 % de Triclosán) y ▲ Lote 15 (9.09 % de Triclosán).

Tabla 6. Coeficientes de determinación y valor de "n" de acuerdo al modelo de Peppas, el tiempo que se reporta es el intervalo en el que se obtiene la máxima linealidad para el cálculo de las constantes.

Lote	n	r <sup>2</sup>	t (min)
2	0.3369	0.9955	10-50
3	0.3131	0.9910	10-50
4	0.2392	0.9970	5-30
5	0.2849	0.9919	10-40
6	0.1959	0.9979	10-40
7	0.0374	0.9905	10-40
9	0.4852	0.9946	5-60
10	0.3791	0.9926	5-40
11	0.2816	0.9951	5-60
13	0.0301	0.9967	15-70
14	0.0665	0.9908	5-50
15	0.1884	0.9942	5-50



El menor valor propuesto por Peppas para el coeficiente difusional "n" es 0.5, los valores de "n" obtenidos para las liberaciones en estudio son menores a 0.5. El lote que liberó más lentamente es el lote 9, el valor de "n" para este lote es el que más se acerca a 0.5, las nanoesferas de ese lote son de PLA con menor cantidad de triclosán (1.23 %). Cabe señalar que Peppas propone que sean considerados en su modelo los datos de la primera parte de las liberaciones, hasta el 60% de la cantidad total liberada; sin embargo, se aplicó el modelo a las disoluciones en estudio en los intervalos señalados en la tabla 6, puesto que el 60% de la liberación se alcanza en los primeros minutos para la mayoría de los lotes.

Se observa que para los lotes de nanoesferas de CAP con triclosán son los que liberan más rápido y son los de valores de "n" más pequeños; los lotes 13 y 14 de nanoesferas de CAP con triclosán liberan en los primeros minutos más del 60% de la carga total de fármaco. Las liberaciones son tan rápidas que no permiten tener el suficiente número de datos para aplicar adecuadamente el modelo semiempírico propuesto. Es muy probable que los sistemas liberan tan rápido que es imposible tener un estado de movimiento de la capa de depleción y la salida del activo sólo depende de que se genere un gradiente de difusión.

El análisis detallado del modelo de Peppas ha demostrado que "n" es 0.5 únicamente para sistemas planos y es diferente para otras formas geométricas; por ejemplo, la liberación Fickiana de una sustancia a partir de una esfera se caracteriza por un valor de "n" = 0.432. Es importante señalar que en los sistemas coloidales es difícil poder observar una fase  $t^{1/2}$  en las liberaciones, debido a la rapidez del proceso de difusión en esos sistemas tan pequeños [Washington, 1990].

Los datos obtenidos de las liberaciones de los diferentes lotes fueron tratados de acuerdo al modelo propuesto por Higuchi que estudia la liberación de fármacos a partir de sistemas matriciales [Washington, 1990 y Narasimhan y cols, 1999]. El modelo asume que al estar en contacto la matriz con el medio de disolución, éste es capaz de penetrar formando una capa de hidratación. Cuando sólo una cara de la matriz está expuesta al medio de disolución, el grosor de la capa de hidratación aumenta de manera unidireccional. Sin embargo, la hidratación relativa disminuye al incrementarse la profundidad de la penetración del medio. Si la velocidad de hidratación de la matriz es menor que la de la disolución del fármaco contenido en la matriz, la liberación obedece el modelo de la raíz cuadrada de



Higuchi. La penetración del medio a la base favorece la difusión del fármaco hacia el seno del solvente, constituyéndose lo que Higuchi llama "zona de depleción". Esta zona de depleción aumenta conforme transcurre la difusión del fármaco de manera proporcional con respecto al tiempo estableciéndose un estado pseudoestable.

El tratamiento de los datos de las disoluciones con el modelo de Higuchi se incluye en el anexo 4 y permitió obtener los gráficos 11, 12 y 13. En la tabla 7 se presentan los valores obtenidos para la constante de Higuchi ( $K_H$ ) y para los coeficientes de determinación de las rectas obtenidas por regresión lineal. Los intervalos de tiempo señalados en la tabla son los valores para los que se tuvo mayores coeficientes de determinación, es decir son los intervalos que se adaptan mejor a una línea recta.

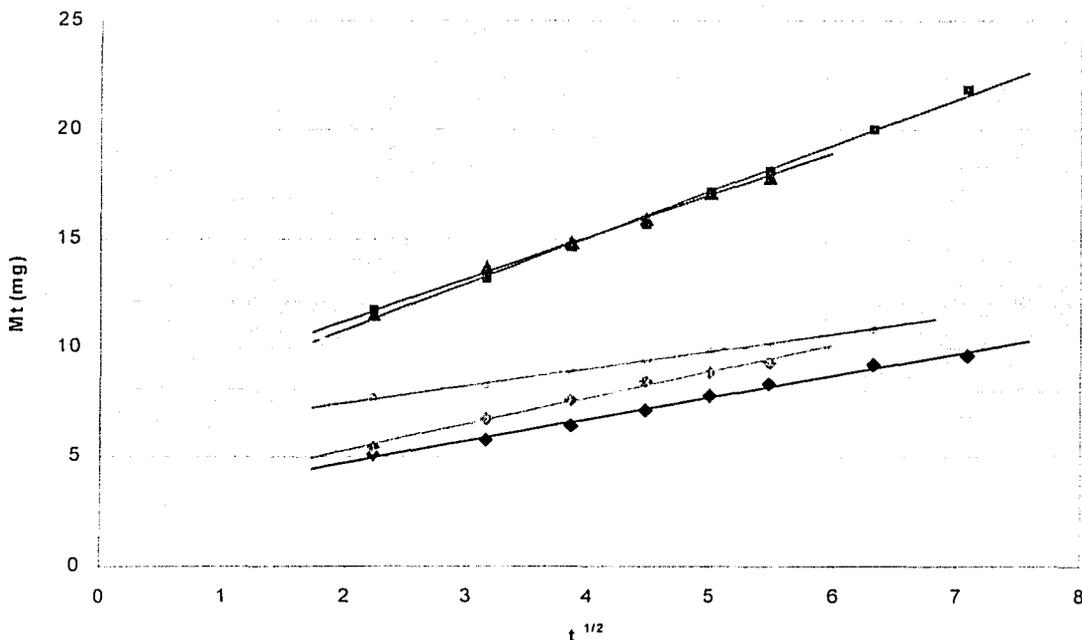
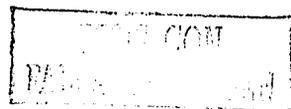


Gráfico 11. Modelo de Higuchi aplicado a la liberación de triclosán a partir de nanoesferas de PLGA. —◆— Lote 2 (1.23 % de Triclosán); —■— Lote 3 (4.76 % de Triclosán); —▲— Lote 4 (9.09 % de Triclosán); —○— Lote 5 (16.67 % de Triclosán); —\*— Lote 6 (23.08 % de Triclosán) y —●— Lote 7 (33.33% de Triclosán).



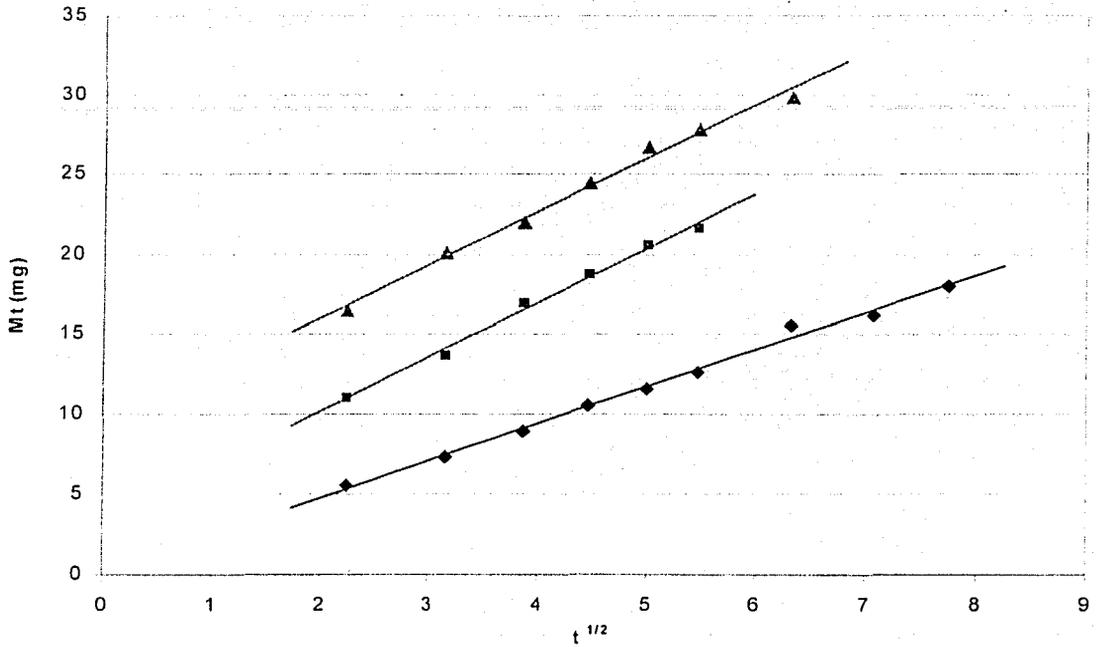


Gráfico 12. Modelo de Higuchi aplicado a la liberación de triclosán a partir de nanoesferas de PLA. —◆— Lote 9 (1.23 % de Triclosán); —■— Lote 10 (4.76 % de Triclosán) y —▲— Lote 11 (9.09 % de Triclosán).



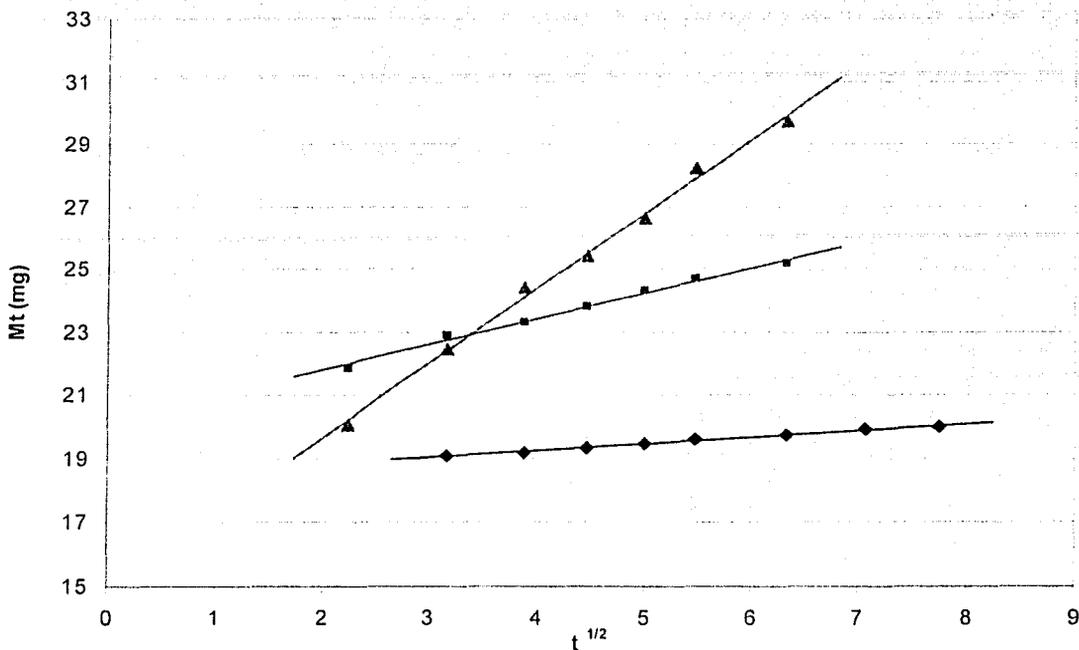


Gráfico 13. Modelo de Higuchi aplicado a la liberación de triclosán a partir de nanoesferas de CAP. ◆ Lote 13 (1.23 % de Triclosán); ■ Lote 14 (4.76 % de Triclosán) y ▲ Lote 15 (9.09 % de Triclosán).

Tabla 7. Coeficientes de determinación y valor de "K<sub>H</sub>" de acuerdo al modelo de Higuchi, el tiempo que se reporta es el intervalo en el que se obtiene la máxima linealidad para el cálculo de las constantes.

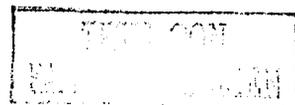
Lote	K <sub>H</sub>	r <sup>2</sup>	t (min)
2	1.0098	0.9924	5-50
3	2.1061	0.9943	5-50
4	1.9076	0.9959	5-30
5	1.2242	0.9918	5-30
6	0.7900	0.9966	5-40
7	0.2120	0.9967	5-30
9	2.3168	0.9935	5-60
10	3.4003	0.9932	5-30
11	3.3348	0.9913	5-40
13	0.2036	0.9815	5-25
14	0.8092	0.9906	5-40
15	2.3743	0.9959	5-40



Los valores de los coeficientes de determinación obtenidos después del análisis de regresión lineal por el modelo propuesto por Higuchi son mayores a 0.99 para todos los lotes, lo anterior nos indica que este modelo permite describir la liberación de triclosán a partir de las nanoesferas obtenidas. Las nanoesferas preparadas son sistemas matriciales en los que el activo (triclosán) se encuentra disperso homogéneamente en toda la matriz, de manera que el fármaco que sale primero es el que se encuentra localizado en la parte más superficial de la matriz y posteriormente el que se encuentra en la región más interna. Además, dado que el grosor de la capa hidrodinámica de difusión se incrementa al aumentar el tiempo, el fármaco que se encuentra en la región más interna va a tardar un poco más en salir.

Para determinar el tipo de cinética de liberación que siguen las liberaciones se analizaron los datos de acuerdo a una cinética de primer orden. Los valores obtenidos para la constante de primer orden ( $K_1$ ) se incluyen en la tabla 8 y los gráficos obtenidos para estas cinéticas son los gráficos 14, 15 y 16.

Con base en los resultados obtenidos del análisis de los datos de las liberaciones se afirma que la cinética de liberación del triclosán a partir de las nanoesferas sigue una cinética de primer orden únicamente en la primera parte de las liberaciones. Los datos empleados para los gráficos 8 a 16 y tablas 6 a 8 se presentan en el anexo 4.



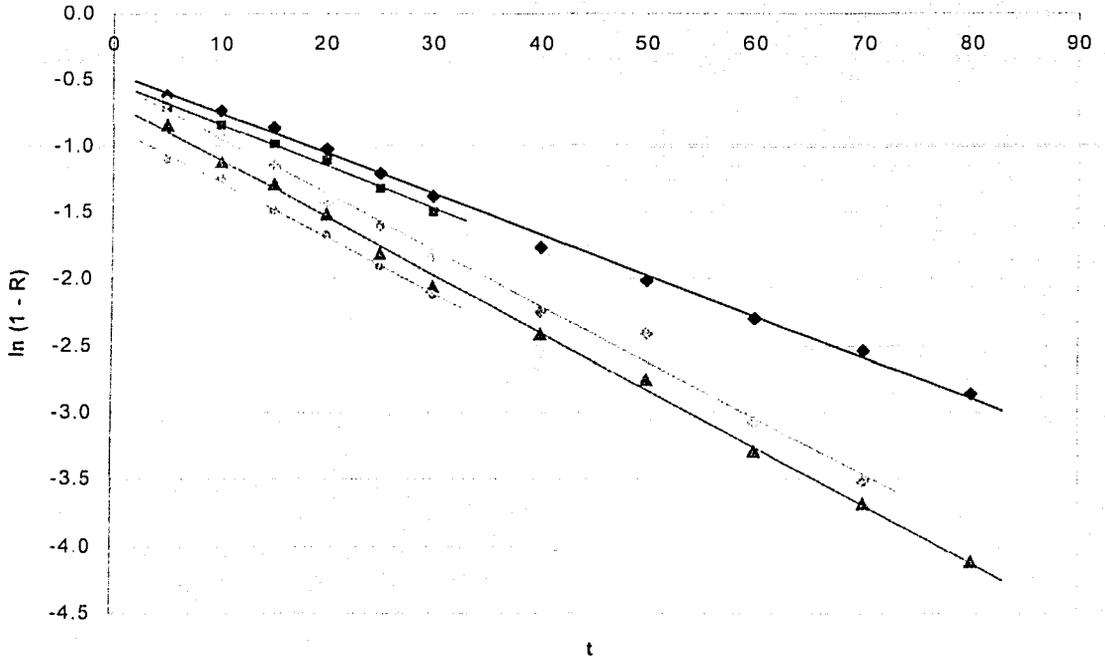
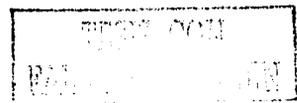


Gráfico 14. Cinética de Primer Orden aplicada a la liberación de triclosán a partir de nanoesferas de PLGA. —◆— Lote 2 (1.23 % de Triclosán); —■— Lote 3 (4.76 % de Triclosán); —▲— Lote 4 (9.09 % de Triclosán); —×— Lote 5 (16.67 % de Triclosán); —\*— Lote 6 (23.08 % de Triclosán) y —▲— Lote 7 (33.33% de Triclosán).



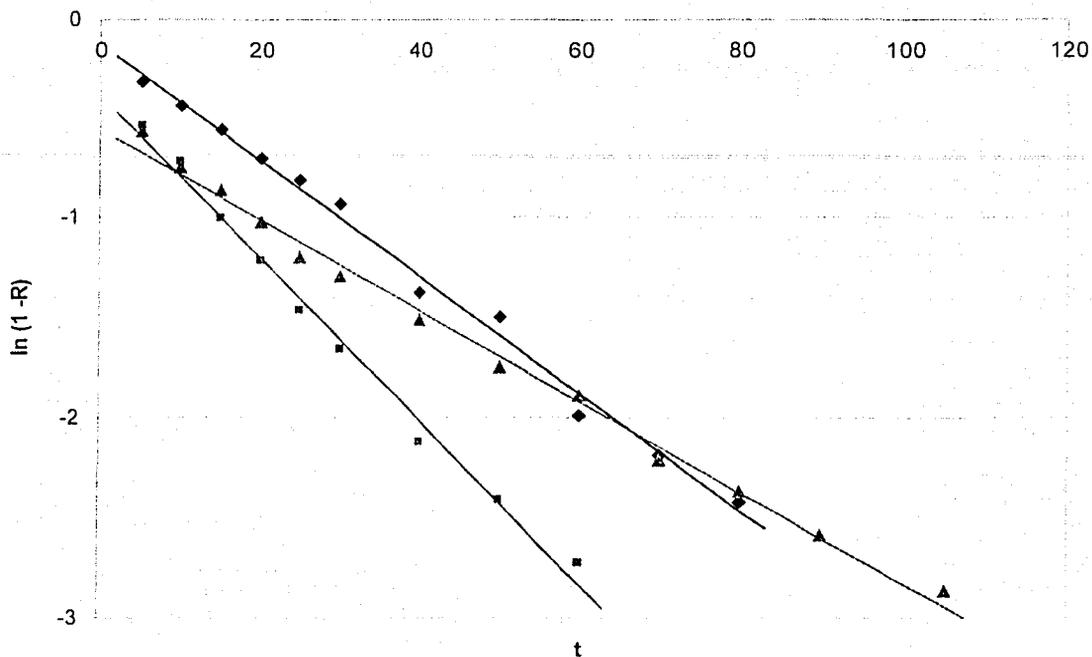
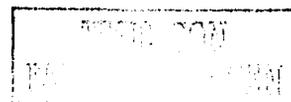


Gráfico 15. Cinética de Primer Orden aplicada a la liberación de triclosán a partir de nanoesferas de PLA.  $\blacklozenge$  Lote 9 (1.23 % de Triclosán);  $\blacksquare$  Lote 10 (4.76 % de Triclosán) y  $\blacktriangle$  Lote 11 (9.09 % de Triclosán).



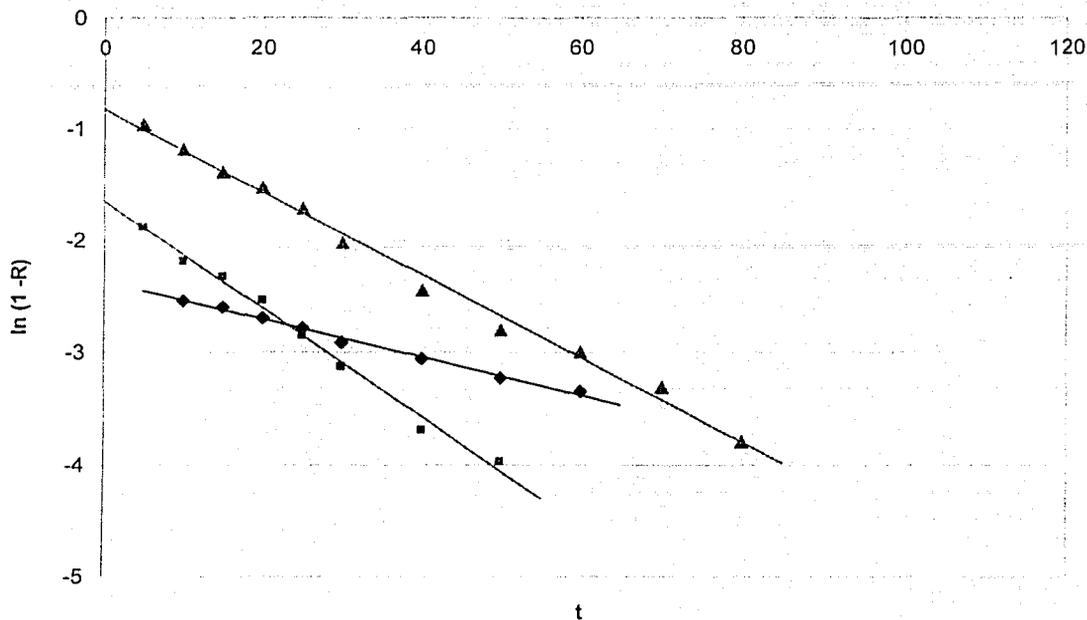
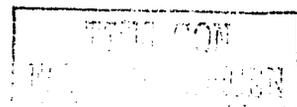


Gráfico 16. Cinética de Primer Orden aplicada a la liberación de triclosán a partir de nanoesferas de CAP. —●— Lote 13 (1.23 % de Triclosán); —■— Lote 14 (4.76 % de Triclosán) y —▲— Lote 15 (9.09 % de Triclosán).

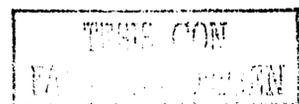
Tabla 8. Coeficientes de determinación y valor de "K<sub>1</sub>" de acuerdo a cinética de primer orden, el tiempo que se reporta es el intervalo en el que se obtiene la máxima linealidad para el cálculo de las constantes.

Lote	K <sub>1</sub>	r <sup>2</sup>	t (min)
2	0.0306	0.9970	5-80
3	0.0318	0.9927	5-30
4	0.0431	0.9980	5-80
5	0.0420	0.9920	5-70
6	0.0414	0.9967	5-30
7	0.0194	0.9979	5-40
9	0.0293	0.9932	5-80
10	0.0408	0.9914	5-60
11	0.0227	0.9940	5-105
13	0.0169	0.9933	10-60
14	0.0483	0.9912	5-50
15	0.0372	0.9928	5-80



Como fue señalado con anterioridad existen estudios *ex vivo* de la penetración de nanopartículas en el tejido gingival de mandíbulas de cerdo. En tales investigaciones se evaluó la capacidad de penetración de las nanopartículas cargadas con un marcador fluorescente utilizando microscopía confocal láser. Las mandíbulas fueron bañadas con agua destilada y una suspensión de nanopartículas cargadas con rojo de nilo, alternando ciclos de cinco minutos; la velocidad de irrigación se mantuvo constante (200  $\mu\text{l}/\text{min}$ ). Los tiempos de exposición fueron de 1, 2, 4 y 6 horas. En los cortes ópticos obtenidos para las muestras de 1 hora de exposición se apreció que la mayor parte de las nanopartículas se localizaban de 0 a 10  $\mu\text{m}$  por debajo de la superficie; en cortes de hasta 20  $\mu\text{m}$  se detectaron nanopartículas, aunque en menor cantidad. Para las muestras de 2 horas de contacto se detectó fluorescencia hasta 28  $\mu\text{m}$  por debajo de la superficie. Después de 6 horas de contacto las nanopartículas lograron penetrar hasta 40-45  $\mu\text{m}$  por debajo de la superficie del tejido [Ganem-Quintanar, 1997a].

Es importante mencionar que, en este trabajo de tesis, se realizó un estudio preliminar, *in vivo*, en colaboración con cirujanos dentistas pasantes de la especialidad de parodoncia de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad de la Secretaría de la Defensa Nacional. Para el estudio se utilizaron nanopartículas cargadas con triclosán y un colorante (Sudán III); el material biológico empleado fueron tres perros raza criolla. Las nanopartículas fueron preparadas por el método de emulsificación-difusión utilizando como polímero PLGA, de acuerdo a lo indicado en la metodología de esta tesis. Antes de aplicar las nanopartículas en las mandíbulas de los perros criollos se indujo experimentalmente un cuadro de periodontitis entre el primer y segundo premolares como se aprecia en la figura 33 [Martínez y cols., 2002].



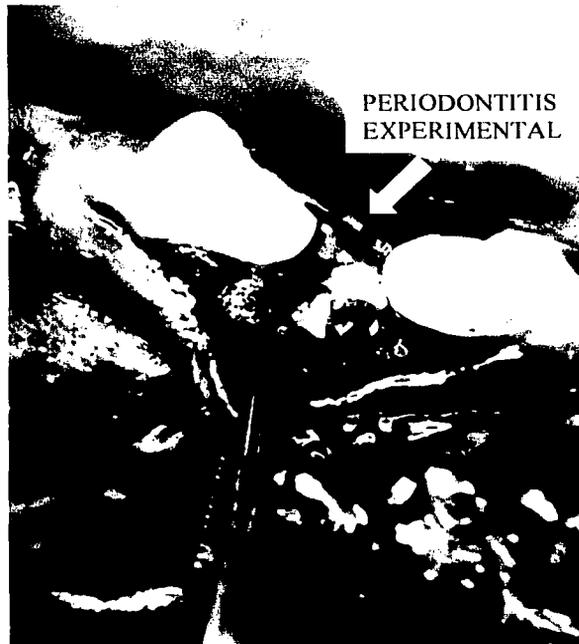


Figura 33. Fotografía de las lesiones periodontales provocadas entre el 2° y 3° premolares en perro criollo macho.

Después de 2 meses de provocar los defectos periodontales en tres perros, se eligió el cuadrante derecho de sus hocicos como sitio control y el izquierdo como sitio experimental. En ambos cuadrantes se realizó raspado y alisado radicular y en el sitio experimental se colocó dentro de la bolsa periodontal una suspensión de nanoesferas liofilizadas dispersadas en agua inyectable, para la administración se empleó una jeringa con aguja hipodérmica. Transcurridos 8 días se observó que existía una mayor inflamación en los sitios experimentales que en los sitios control tal como se aprecia en la figura 34.

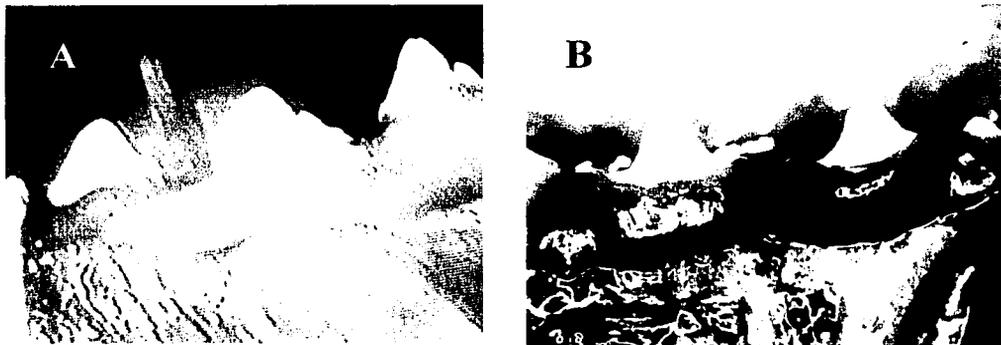


Figura 34. Fotografía tomada después de 8 días de aplicación de las nanopartículas de PLGA con triclosán y sudán III. **A)** Sitio control (inflamación moderada), **B)** Sitio experimental (inflamación severa).

Después de 8 días la inflamación de los sitios experimentales fue mucho más severa, como si los tejidos hubieran reaccionado a un cuerpo extraño. Lo anterior nos permite suponer que las nanopartículas lograron penetrar el epitelio y se originó algún tipo de interacción entre las nanopartículas y el tejido, o bien, penetración de las nanopartículas en estos tejidos; aunque no es posible afirmar si la respuesta inflamatoria se originó por el colorante cargado en las nanopartículas, por el polímero o por el triclosán.

Quince días después de la aplicación de las nanoesferas se observó una inflamación moderada, tanto en sitios control como en sitios experimentales, en la figura 35 puede apreciarse que la inflamación del sitio tratado es menor con respecto a la presentada en la figura 34 (B).



**Figura 35.** Fotografía tomada después de 15 días de aplicación de las nanopartículas de PLGA con triclosán y sudán III (Sitio experimental).

Es importante recalcar que originalmente se había planeado realizar un análisis de cortes histológicos de los sitios tratados utilizando microscopía confocal láser por lo que se incorporó en las nanoesferas el colorante sudán III (marcador fluorescente); desafortunadamente no se llevó a cabo dicho análisis y no se pudo evaluar la penetración de las nanoesferas en estos tejidos.

Podría considerarse que las nanopartículas administradas provocaron un daño en los tejidos periodontales de los perros utilizados en el estudio, sin embargo, considerando que después de 15 días la inflamación era similar en los cuadrantes control y experimental puede pensarse que el efecto adverso es sólo transitorio. También puede suponerse que las nanopartículas lograron penetrar a través del epitelio sulcular y al ser reconocidas como una sustancia extraña al organismo se desencadenó una reacción inflamatoria mucho más severa que la originada por la simple inducción del cuadro de periodontitis en los perros.

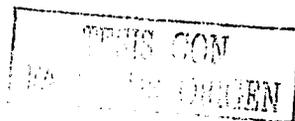
Como se señaló dentro del marco teórico la preparación de nanopartículas por el método de emulsificación difusión requiere eliminar grandes volúmenes de agua, puesto que debe adicionarse agua durante la etapa de difusión para lograr la formación de las nanopartículas. Esta desventaja limita el escalamiento de la producción de las nanopartículas por este método, aunque generalmente se obtienen altos rendimientos y las tasas de encapsulamiento son elevadas. Por otro lado, el método de preparación de nanopartículas por desplazamiento de solvente es, probablemente, el método más sencillo para la preparación de nanopartículas pero está limitado al encapsulamiento de fármacos solubles en solventes polares y es difícil encontrar un sistema polímero/fármaco/solvente/no solvente que permita alcanzar altas tasas de encapsulamiento y rendimientos aceptables.

Considerando lo expuesto en el párrafo anterior se realizó un estudio que permitiera evaluarla influencia de los factores que afectan el rendimiento del proceso de formación de nanoesferas de un polímero biodegradable (poli-ε-caprolactona) por el método convencional de desplazamiento de solvente y se propuso un nuevo sistema de recirculación que permitiera aumentar el rendimiento del proceso industrial.

Stainmesse y colaboradores (1995) analizaron la formación de suspensiones coloidales de poli-ε-caprolactona preparadas por el método convencional de desplazamiento de solvente; es decir por la precipitación del polímero en un medio incapaz de solubilizar al polímero. La formación de nanoesferas por desplazamiento de solvente por la forma convencional se lleva a cabo utilizando concentraciones de polímeros muy bajas (1-5 %) pues cuando se aumenta la cantidad de polímero en la fase orgánica se forman agregados y se tienen bajos rendimientos.

El método de desplazamiento de solvente fue patentado por Fessi y colaboradores (1992) para obtener partículas esféricas tipo matriz de una talla menor a 500 nm y puede ser resumido en las siguientes etapas

- (1) Preparación de una fase líquida, con un solvente o mezcla de solventes orgánicos polares, capaz de disolver el polímero y la sustancia activa. Dicha fase puede contener surfactantes (por ejemplo, fosfatidilcolina).



- (2) Preparación de una segunda fase líquida incapaz de solubilizar al polímero y miscible con la fase 1. Puede contener un solo tipo de no-solvente o una mezcla de éstos; además de estabilizantes (por ejemplo, polisorbatos o poloxameros).
- (3) Adición de la fase orgánica (1) a la segunda fase (2) con agitación moderada, produciéndose una suspensión coloidal de nanopartículas del polímero.
- (4) Finalmente, se remueve el no-solvente o la mezcla de no-solventes para obtener una solución coloidal más concentrada, o bien, se seca o se liofiliza el sistema para obtener un polvo seco.

En el paso (3) las nanopartículas son formadas prácticamente en forma instantánea por la rápida difusión del solvente polar a la fase acuosa que provoca cierta turbulencia. La mutua miscibilidad entre los solventes provoca una violenta propagación del solvente orgánico y pequeñas gotas son arrancadas de la interfase durante el proceso de difusión. Davies y Rideal (1961) sugirieron que esa turbulencia es causada por regiones localizadas de baja tensión superficial donde la fase oleosa sufre pulsaciones erráticas o "kicks", cada una de las cuales es rápidamente expulsada al exterior debido a un arrastre viscoso. La energía necesaria para estos movimientos es sacudida proviene de la energía libre liberada cuando el solvente tiende al estado de equilibrio. El mecanismo molecular de la turbulencia interfacial puede ser explicada por la continua formación de remolinos de solvente en la interfase. Entonces, una vez que el proceso ha comenzado, movimientos asociados con las pulsaciones cambian la presión dentro del solvente, incrementando la presión superficial o disminuyendo la tensión interfacial. Así pues, si las gotas de solvente formadas contienen moléculas de polímero, éstas tienden a agregarse y formar nanopartículas debido a la continua difusión del solvente y a su exposición a un medio no solvente. Estos fenómenos se representan en el esquema de la figura 36.

## Difusión

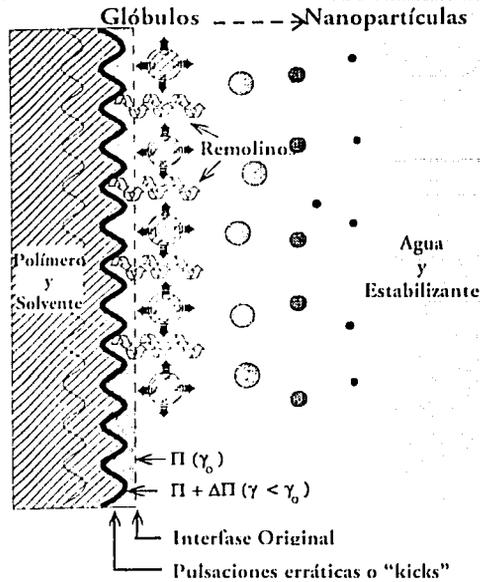


Figura 36. Representación esquemática de la formación de nanopartículas por un mecanismo de turbulencia interfacial.  $\Pi$  = Presión superficial y  $\gamma$  = Tensión interfacial [Modificado de D. Quintanar-Guerrero y cols., 1998a].

En la primera parte del estudio se analizó la influencia de la concentración de la fase orgánica y la velocidad de adición de la misma a la fase acuosa (125 ml) sobre el rendimiento del proceso y la talla de partícula de las nanoesferas obtenidas (ver figura 11). Se trabajaron tres diferentes concentraciones de poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) en acetona: 2.5, 5.0 y 7.5 % p/v. Las velocidades de inyección fueron 14 2, 25 0 y 35 0 ml/min. El volumen de la fase orgánica se mantuvo constante para todos los lotes (20 ml)

En la segunda parte del estudio se prepararon nanopartículas del mismo polímero utilizando el sistema de reflujo que se esquematizó en la figura 12; se adicionaron 20 ml de una solución orgánica de PCL

en acetona a tres diferentes velocidades 14.2, 25.0 y 35.0 ml/min y el volumen de agua del sistema de reflujo (125 ml) se mantuvo recirculando a tres velocidades 27.5, 55 y 83 ml/min.

Todos los experimentos se llevaron a cabo por quintuplicado, se prepararon en total 180 lotes. Los resultados de las determinaciones de la talla de partícula se presentan en la tabla 9. Las determinaciones de tamaño de partícula se llevaron a cabo por triplicado utilizando un contador NanoSizer<sup>®</sup> N4 Plus; sólo se muestran los promedios obtenidos de las tres determinaciones.

Tabla 9. Talla de partícula (nm) para nanopartículas obtenidas por el método de desplazamiento de solvente por la forma convencional y con sistema de reflujo propuesto.

Velocidad Inyección (ml/min)	CONCENTRACIÓN 2.5 %				CONCENTRACIÓN 5.0 %				CONCENTRACIÓN 7.5 %			
	Velocidad Recirculación (ml/min)			Método Convencional	Velocidad Recirculación (ml/min)			Método Convencional	Velocidad Recirculación (ml/min)			Método Convencional
	27.5	55.0	83.0		27.5	55.0	83.0		27.5	55.0	83.0	
14.2	322.47	269.68	383.54	220.57	245.16	286.18	239.85	336.37	326.34	206.67	239.17	240.20
	301.93	250.67	387.14	235.13	208.54	301.14	246.62	349.20	308.70	203.90	180.53	270.60
	340.53	269.74	397.46	233.30	209.11	294.09	243.93	304.00	350.40	222.70	221.57	246.20
	327.27	260.74	354.52	244.50	205.50	254.31	252.74	301.77	328.93	216.20	154.37	259.00
	333.10	259.26	302.17	224.43	246.58	272.05	246.77	310.07	297.37	218.97	168.43	277.43
25.0	273.57	209.91	285.93	183.37	318.30	237.52	207.07	212.17	310.82	223.80	267.10	184.77
	309.00	201.23	313.62	190.45	316.57	248.42	195.20	202.70	245.70	187.36	259.47	176.63
	252.70	203.48	302.27	183.00	283.32	239.73	205.00	230.00	255.83	171.05	241.27	184.87
	288.00	220.26	246.05	178.50	325.49	189.00	206.03	251.53	258.92	175.14	195.60	185.07
	289.63	234.13	302.19	186.07	306.80	225.25	181.87	225.87	274.96	169.89	175.77	187.13
35.0	359.76	191.42	199.40	203.77	243.37	181.63	167.07	188.23	201.60	223.81	154.67	162.05
	376.26	177.03	238.87	201.03	216.90	175.41	161.43	197.73	189.76	180.52	147.33	146.73
	372.57	190.83	203.81	202.00	246.73	181.21	154.00	192.03	197.51	173.32	160.63	170.10
	356.60	176.71	200.84	193.70	256.27	190.45	169.17	204.40	165.35	186.68	156.27	152.33
	358.94	182.32	198.96	198.97	289.57	210.42	159.47	200.67	181.63	187.40	158.37	160.90

En la tabla 10 se presenta el rendimiento del proceso, expresado en porcentaje, para los diferentes lotes preparados tanto por el método convencional como por el sistema de reflujo. Los rendimientos fueron calculados considerando el peso de los agregados que se formaron durante el proceso y que fueron retenidos en el tamiz.

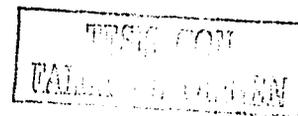
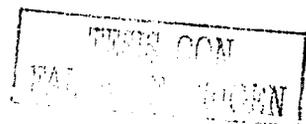


Tabla 10. Rendimiento del proceso (%) de preparación de nanopartículas obtenidas por el método de desplazamiento de solvente por la forma convencional y con sistema de reflujo

Velocidad Inyección (ml/min)	CONCENTRACIÓN 2.5 %				CONCENTRACIÓN 5.0 %				CONCENTRACIÓN 7.5 %			
	Velocidad Recirculación (ml/min)			Método Convencional	Velocidad Recirculación (ml/min)			Método Convencional	Velocidad Recirculación (ml/min)			Método Convencional
	27.5	55.0	83.0		27.5	55.0	83.0		27.5	55.0	83.0	
14.2	84.04	90.38	93.76	86.44	33.48	40.88	51.22	27.33	25.15	26.97	22.29	23.27
	82.92	94.10	92.32	86.70	32.70	30.60	53.86	23.00	24.65	32.80	25.21	20.96
	85.36	93.44	94.46	86.68	34.41	34.12	51.13	26.33	32.84	21.43	20.79	21.28
	82.20	92.70	91.54	86.26	31.60	47.60	50.16	27.09	28.53	21.07	27.24	22.11
	82.22	89.88	92.36	85.30	28.27	44.31	53.67	26.76	25.93	22.33	25.20	22.73
25.0	86.04	92.30	95.38	95.00	38.88	36.51	57.40	41.04	29.98	31.37	29.01	16.65
	90.58	92.58	96.30	93.68	38.95	42.65	54.39	45.01	31.28	30.77	32.06	18.75
	85.72	93.52	95.80	92.78	30.09	33.89	54.90	44.71	31.28	34.71	32.13	18.39
	88.26	92.44	95.88	93.00	38.63	36.45	58.68	45.38	36.94	33.53	33.15	16.21
	89.90	90.96	96.80	91.70	38.35	35.09	51.31	44.61	31.12	35.94	34.25	19.01
35.0	83.22	95.56	95.76	90.50	48.81	47.40	41.30	35.58	39.28	41.01	38.73	14.50
	90.28	94.28	95.26	90.12	44.43	56.67	39.09	35.86	36.99	29.33	38.07	14.75
	88.38	93.88	93.96	91.86	42.64	53.76	44.16	35.99	39.46	32.98	33.14	14.65
	86.34	94.88	92.42	92.86	39.92	49.79	37.52	32.43	37.25	33.89	41.27	14.37
	86.76	92.98	92.68	91.38	37.81	57.32	39.45	35.55	46.93	36.67	36.19	14.11

Con los resultados presentados en las tablas 9 y 10 se construyeron los gráficos 17 a 26. En los gráficos 17 y 18 se aprecia el efecto de la velocidad de inyección y de la concentración de la fase orgánica sobre el rendimiento del proceso y la talla de partícula cuando se aplica el método convencional de desplazamiento de solvente

En los gráficos 19 a 21 y 23 a 25 se representa el efecto que ejercen la velocidad de inyección y la velocidad de recirculación sobre el rendimiento del proceso y la talla de las partículas obtenidas por el método de desplazamiento de solvente utilizando el sistema de reflujo propuesto. Se construyó un gráfico por cada concentración de la fase orgánica y en los gráficos 22 y 26 se reúnen los resultados obtenidos para las tres diferentes concentraciones. Los puntos incluidos en los gráficos 17 a 26 son los promedios de las cinco repeticiones para cada dispersión de nanoesferas.



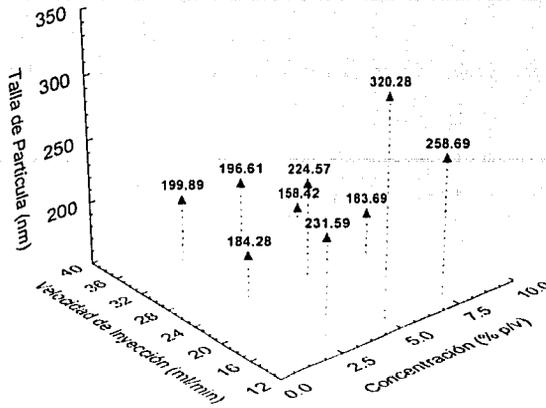


Gráfico 17. Efecto de la concentración y la velocidad de inyección sobre la talla de partícula de nanoesferas obtenidas por el método convencional de desplazamiento de solvente.

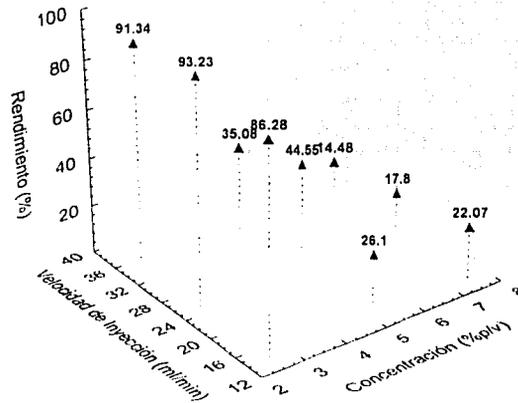
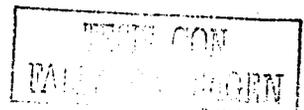


Gráfico 18. Efecto de la concentración y la velocidad de inyección sobre el rendimiento del proceso de obtención de nanoesferas por el método convencional de desplazamiento de solvente.



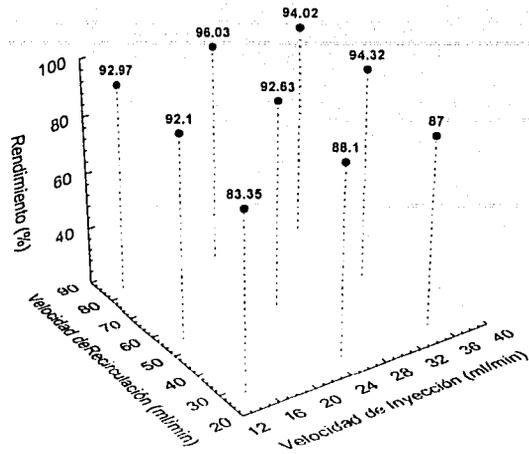


Gráfico 19. Efecto de la velocidad de inyección y velocidad de recirculación sobre el rendimiento del proceso de obtención de nanoesferas por el método de desplazamiento de solvente con el sistema de reflujo para la concentración de 2.5 % p/v.

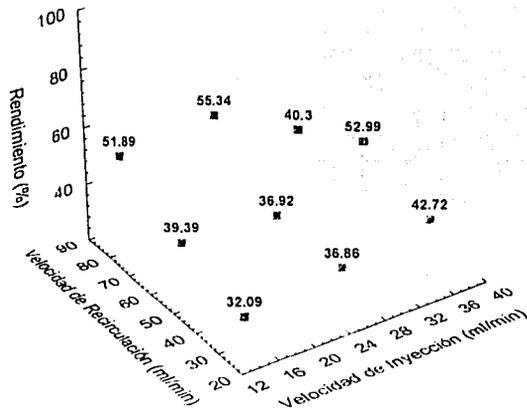
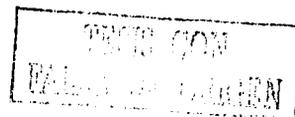


Gráfico 20. Efecto de la velocidad de inyección y velocidad de recirculación sobre el rendimiento del proceso de obtención de nanoesferas por el método de desplazamiento de solvente con el sistema de reflujo para la concentración de 5.0 % p/v.



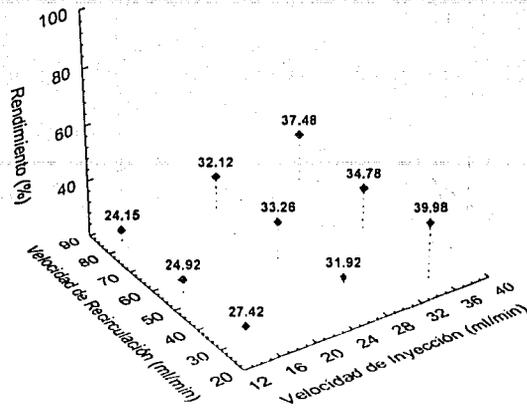


Gráfico 21. Efecto de la velocidad de inyección y velocidad de recirculación sobre el rendimiento del proceso de obtención de nanoesferas por el método de desplazamiento de solvente con el sistema de reflujo para la concentración de 2.5 % p/v.

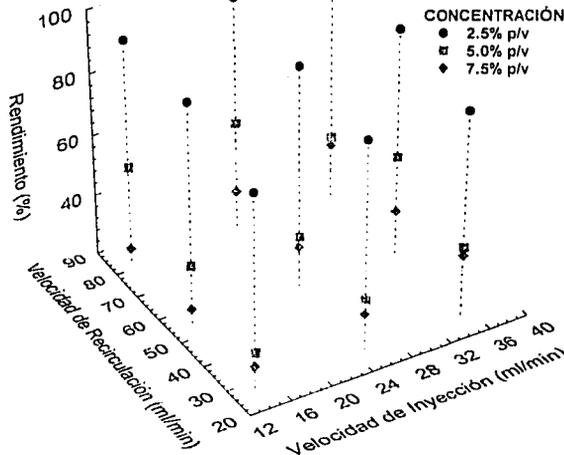


Gráfico 22. Efecto de la velocidad de inyección y velocidad de recirculación sobre el rendimiento del proceso de obtención de nanoesferas por el método de desplazamiento de solvente con el sistema de reflujo para las concentraciones de 2.5, 5.0 y 7.5 % p/v.

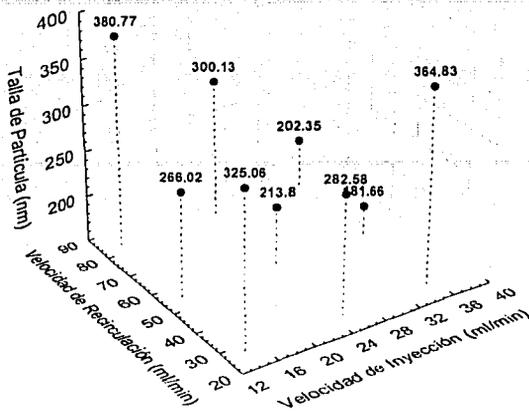


Gráfico 23. Efecto de la velocidad de inyección y velocidad de recirculación sobre la talla de partícula de nanoesferas obtenidas por el método de desplazamiento de solvente con el sistema de reflujo para la concentración de 2.5 % p/v.

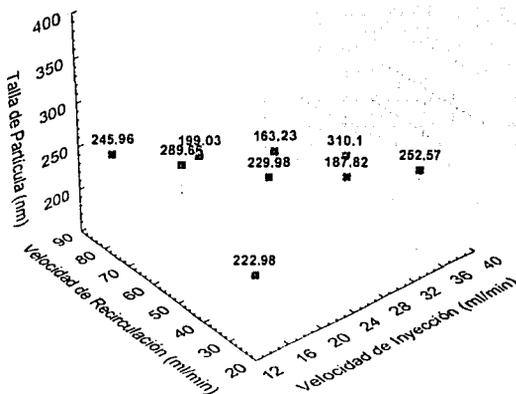


Gráfico 24. Efecto de la velocidad de inyección y velocidad de recirculación sobre la talla de partícula de nanoesferas obtenidas por el método de desplazamiento de solvente con el sistema de reflujo para la concentración de 5.0 % p/v.

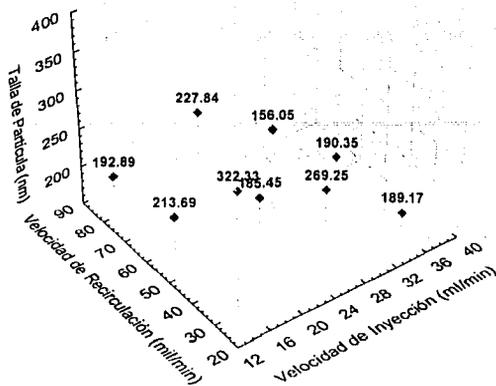


Gráfico 25. Efecto de la velocidad de inyección y velocidad de recirculación sobre la talla de partícula de nanoesferas obtenidas por el método de desplazamiento de solvente con el sistema de reflujo para la concentración de 7.5 % p/v.

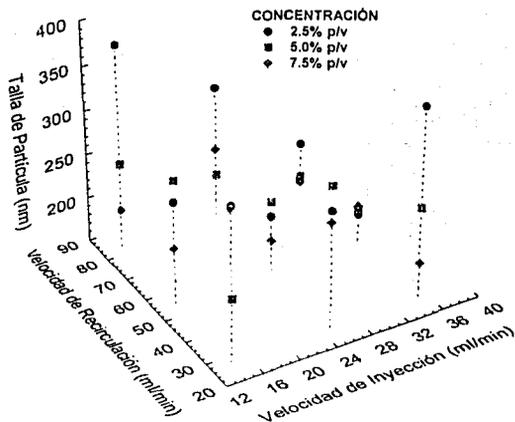
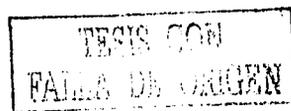


Gráfico 26. Efecto de la velocidad de inyección y velocidad de recirculación sobre la talla de partícula de nanoesferas obtenidas por el método de desplazamiento de solvente con el sistema de reflujo para las concentraciones de 2.5, 5.0 y 7.5 % p/v.



Por el método convencional de desplazamiento de solvente se obtuvieron nanoesferas de tamaños de 160 a 320 nm aproximadamente. Para las nanoesferas obtenidas con el sistema de recirculación se registraron tallas de 160 a 380 nm aproximadamente. No se aprecia una diferencia notable en las tallas de partícula de las nanoesferas obtenidas por los dos métodos.

En cambio, en los gráficos 18 y 23 al 26 se aprecia que el rendimiento del proceso se ve aumentado cuando se utiliza el sistema de recirculación propuesto para las tres concentraciones empleadas. Por ejemplo, para la concentración de 7.5 % p/v se obtuvieron rendimientos de 22.07, 17.8 y 14.48 % para las velocidades de inyección 14.2, 25.0 y 35 ml/min, respectivamente, y con el sistema de reflujo se obtuvieron rendimientos de 27.42, 31.92 y 39.98 para las mismas velocidades de inyección y la velocidad de recirculación más baja (27.5 ml/min).

Como se señaló con anterioridad, las nanopartículas formadas por desplazamiento de solvente se forman prácticamente en forma instantánea por la rápida difusión del solvente polar hacia la fase acuosa cuando ambas fases entran en contacto. El sistema de reflujo permite cambiar constantemente el medio acuoso que entra en contacto inicialmente con la fase orgánica, lo que favorece el proceso de difusión y por tanto el rendimiento del proceso aumenta.

En los gráficos 19 y 20 se aprecia con claridad que para las concentraciones de 2.5 y 5.0 % p/v mejora el rendimiento del proceso cuando se aumenta la velocidad de recirculación sistema. Para la concentración de 7.5 % (Gráfico 21) el rendimiento puede considerarse constante, no se modifica al aumentar la velocidad de recirculación; sin embargo, se aprecia que al aumentar la velocidad de inyección el rendimiento del proceso aumenta para todas las velocidades de recirculación.

Stainmesse y colaboradores (1995) reportaron la formación de nanoesferas de poli-ε-caprolactona únicamente a concentraciones de polímero en acetona menores al 1.5 % con rendimientos cercanos al 100% y tallas de partícula de 150 a 200 nm. Los rendimientos obtenidos con el sistema de recirculación para la concentración de 2.5 % p/v son bastante aceptables (83.35 a 96.03 %).

Con la finalidad de conocer el efecto de las variables que intervienen en la obtención de nanoesferas con el sistema de reflujo (concentración, velocidad de inyección y velocidad de recirculación) sobre el rendimiento del proceso se llevó a cabo un análisis estadístico de varianza considerando un diseño en bloques completo 3x3x3 con 5 repeticiones. Se utilizó el programa SPSS Data Editor 10.0 para

ambiente Windows. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 11 y 12. Las variables de respuesta fueron el rendimiento (%) y la talla (nm), los factores analizados fueron concentración, velocidad de inyección y velocidad de recirculación; para cada factor se estudiaron tres niveles. Se determinó la probabilidad de la significancia de los factores y sus interacciones.

Tabla 11. Resumen del análisis de varianza para la variable de respuesta rendimiento del proceso.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: REND

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	93887.564 <sup>a</sup>	26	3611.060	375.065	.000
Intercept	413759.533	1	413759.533	42975.354	.000
CONC	89310.856	2	44655.428	4638.160	.000
INyec	868.068	2	434.034	45.081	.000
RECIRC	842.049	2	421.025	43.730	.000
CONC * INyec	404.005	4	101.001	10.491	.000
CONC * RECIRC	844.384	4	211.096	21.926	.000
INyec * RECIRC	528.779	4	132.195	13.730	.000
CONC * INyec * RECIRC	1089.424	8	136.178	14.144	.000
Error	1039.806	108	9.628		
Total	508686.904	135			
Corrected Total	94927.370	134			

a. R Squared = .989 (Adjusted R Squared = .986)

Tabla 12. Resumen del análisis de varianza para la variable de respuesta talla de partícula.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: TALLA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	489978.140 <sup>a</sup>	26	18845.313	57.447	.000
Intercept	7982670.470	1	7982670.470	24333.859	.000
CONC	96633.138	2	48316.569	147.285	.000
INyec	91407.731	2	45703.865	139.321	.000
RECIRC	105634.393	2	52817.197	161.005	.000
CONC * INyec	12284.265	4	3071.066	9.362	.000
CONC * RECIRC	49713.753	4	12428.438	37.886	.000
INyec * RECIRC	28107.802	4	7026.950	21.421	.000
CONC * INyec * RECIRC	106197.058	8	13274.632	40.466	.000
Error	35429.170	108	328.048		
Total	8508077.780	135			
Corrected Total	525407.309	134			

a. R Squared = .933 (Adjusted R Squared = .916)

De las tablas anteriores se obtiene que todos los factores tienen un efecto estadísticamente significativo ( $\text{sig} < 0.05$ ) sobre el rendimiento del proceso y la talla de partícula.

Para hacer una comparación entre los dos métodos empleados, convencional y con reflujo, se hizo un análisis de varianza. La variable respuesta fue el rendimiento del proceso y los factores analizados fueron velocidad de inyección y concentración (tres niveles cada factor) y método (dos niveles). Se consideraron las cinco repeticiones para cada combinación y la máxima velocidad de recirculación para el método de recirculación. Los resultados se presentan en la tabla 13.

Tabla 13. Resumen del análisis de varianza para la variable de respuesta rendimiento, comparación de los dos métodos

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: REND

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	79002.468 <sup>a</sup>	17	4647.204	1604.682	.000
Intercept	253459.136	1	253459.136	87519.580	.000
CONC	73910.226	2	36955.113	12760.621	.000
INyec	569.418	2	284.709	98.310	.000
MÉTODO	2420.929	1	2420.929	835.948	.000
CONC * INyec	505.859	4	126.465	43.668	.000
CONC * MÉTODO	451.491	2	225.746	77.950	.000
INyec * MÉTODO	18.487	2	9.243	3.192	.047
CONC * INyec * MÉTODO	1126.059	4	281.515	97.207	.000
Error	208.514	72	2.896		
Total	332670.119	90			
Corrected Total	79210.982	89			

a. R Squared = .997 (Adjusted R Squared = .997)

De la tabla 13 se obtiene que todos los factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el rendimiento del proceso. Hay una diferencia estadística entre los dos métodos. La interacción entre los factores Velocidad de Inyección y Método es la que presenta menor influencia sobre la variable respuesta

## 6. CONCLUSIONES.

Durante el desarrollo de este trabajo de investigación se logró la obtención de nanoesferas biodegradables utilizando la técnica de emulsificación-difusión, el principio activo encapsulado (triclosán) es un agente antibacteriano eficaz contra muchos de los microorganismos causantes de enfermedades periodontales. La eficiencia de encapsulamiento fue superior al 70%.

Mediante los estudios de calorimetría diferencial de barrido pudo determinarse que el triclosán se encontraba disperso molecularmente en las matrices poliméricas cargadas con triclosán.

El tamaño de las nanopartículas de PLGA tiende a aumentar conforme se incrementa la proporción de activo/polímero en las nanoesferas; además se encontró una disminución en la temperatura de transición vítrea del PLGA, lo cual es un indicativo de que el triclosán está actuando como un plastificante no convencional

Los estudios de liberación *in vitro* se llevaron a cabo utilizando un sistema que permite el contacto directo entre el medio de disolución y las nanoesferas analizadas. En general, la liberación del triclosán a partir de las nanoesferas de PLGA, PLA y CAP fue muy rápida (75% en 40 minutos) y los datos obtenidos se adaptan al modelo propuesto por Higuchi.

Los resultados preliminares de los estudios realizados *in vivo* en perros criollos a los que se les administraron nanopartículas de PLGA con triclosán y sudán III demuestran que existió una respuesta inflamatoria en los tejidos tratados, sin embargo, no se puede determinar si la respuesta fue ocasionada por el colorante, el polímero o el activo

Con respecto a la preparación de nanopartículas por el método de desplazamiento de solvente se logró diseñar un sistema de reflujo que permite la preparación de nanoesferas de PCL, los rendimientos del proceso propuesto son mucho mayores que los alcanzados por el método de obtención convencional, lo anterior abre la posibilidad del escalamiento industrial de las nanopartículas.

## 7. PERSPECTIVAS.

Para continuar los estudios realizados en este trabajo de tesis se propone la evaluación *ex vivo* de nanopartículas utilizando mandíbula de cerdo con el fin de determinar, mediante microscopía confocal láser, la capacidad de penetración de las nanoesferas cargadas con triclosán a través del epitelio sulcular.

Así mismo se requiere continuar los estudios en perros para determinar las concentraciones del activo en el fluido crevicular y determinar si la concentración alcanzada en ese fluido es efectiva contra microorganismos causantes de la gingivitis y la periodontitis.

Con respecto a la preparación de nanopartículas por el método de desplazamiento de solventes se propone utilizar un sistema que utilice el mismo mecanismo de reflujo propuesto en este trabajo y que permita trabajar con mayores volúmenes, para comenzar el escalamiento de la producción de estos sistemas.

El diseño de formas farmacéuticas a partir de entidades nanométricas permite un mayor control de la liberación de los principios activos. Este trabajo pone de manifiesto la importancia de la nanotecnología dentro del área farmacéutica y aporta una nueva línea de investigación para el desarrollo de sistemas terapéuticos que permitan dirigir un principio activo directamente al sitio de acción, aumentando la efectividad de muchos tratamientos y dando mayores beneficios al paciente.

## 8. REFERENCIAS.

- 1 Addy, M y Langeroudi, M. 1984 "Comparison of the immediate effects on the sub-gingival microflora of acrylic strips containing 40% chlorhexidine, metronidazole or tetracycline". *J. Periodontol.* 11:379-386.
- 2 Addy, M., Hassan, H., Moran, J., Wade, W y Newcombe, R. 1988 "Use of antimicrobial containing acrylic strips in the treatment of chronic periodontal disease". *J. Periodontol.* 59:557-564.
- 3 Addy, M., Rawle, L., Handley, R., Newman, H. N. y Coventry, J. F. 1982 "The development and in vitro evaluation of acrylic strips and dialysis tubing for local drug delivery". *J. Periodontol.* 53:693-699.
- 4 Agarwal, R. K., Robinson, D.H., Maze, G. I. y Reinhardt, R. A., 1993. "Development and characterization of tetracycline-poly(lactide/glycolide) films for treatment of periodontitis". *J. Control. Rel.* 23:137-146.
- 5 Ainamo, J., Lie, T., Ellingsen, B. H., Hansen, B. F., Johansson, L. A., Karring, T., Kish, J., Paunio, K. y Stoltze, K. 1992. "Clinical responses to subgingival application of a metronidazole 25% gel compared to the effect of subgingival scaling in adult periodontitis". *J. Clin. Periodontol.* 19:723-729.
- 6 Allémann, E., Gurny, R. y Doelker, E. 1992. "Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible salting-out process influence of process parameters on particle size". *Int. J. Pharm.* 87:247-253.
- 7 Allémann, E., Doelker, E. y Gurny, R. 1993. "Drug loaded poly(lactic acid) nanoparticles produced by a reversible salting-out process purification of an injectable dosage form". *J. Pharm. Biopharm.* 39 (1):13-18.
- 8 Alonso, M. J. 1996. "Nanoparticulate Drug Carrier Technology". *Drugs Pharm. Sci.* 77:203-242.
- 9 Azoury, R., Elkayam, R. y Friedman, M. 1988. "Nuclear magnetic resonance study of an ethyl cellulose sustained release delivery system II Release rate behavior of tetracycline". *J. Pharm. Sci.* 77:428-431.
- 10 Baker, R. W., Krisko, E.A., Kochinke, F., Grassi, M., Armitage, G. y Robertson, P. 1988. "A controlled release drug delivery system for the periodontal pocket". *Procced. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 15:238a-238b.
- 11 Bindschadler, C., Gurny, R. y Doelker, E. 1990. "Process for preparing a powder of water-insoluble polymer which can be redispersed in a liquid fase, the resulting powder and utilization thereof". *US Patent, 4 968 350*
- 12 Blanco, M. D. y Alonso, M. J. 1997. "Development and characterization of protein-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanospheres". *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 43:287-294.
- 13 Brannon-Peppas, L. 1995. "Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery". *Int. J. Pharm.* 116:1-9.
- 14 Brayer, L., Schwartz, Z., Stabholtz, A., Schibi, H. y Friedman, M. 1988. "The effect of local application of a sustained release delivery system of chlorhexidine on plaque accumulation". *Clin. Prev. Dent.* 10:23-27.

15. Calvo, P. Vila-Jato, J. L. y Alonso, M. J. 1996. "Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules and nanoemulsions as ocular drug carriers". *J. Pharm. Sci.* 85(5):530-536.
16. Chavez-Monroy, F. 2002. "Estudio de la liberación de sustancias lipofílicas en sistemas nanoencapsulados". *Tesis de Licenciatura*. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, U.N.A.M. México
17. Collins, A. E. M., Deasy, P. B., Maccarthy, D. J. y Shanley, D. B. 1989. "Evaluation of a controlled release compact containing tetracycline hydrochloride bonded to tooth for the treatment of periodontal disease" *Int. J. Pharm.* 51:103-114
18. Coventry, J. y Newman, H. N. 1982. "Experimental use of a slow release device employing chlorhexidine gluconate in areas of acute periodontal inflammation". *J. Clin. Periodontol.* 9:129-133
19. Davies, J. T. y Rideal, E. K. 1961. *Interfacial Phenomena*. Academic Press. E. U. A. pp 319-326 y 359-366
20. De Jaeghere, F., Doelker, E. y Gurny, R. 1999. "Nanoparticles" en *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*, Vol. 2 (Mathiowitz, E., ed) John Wiley & Sons, Inc. E. U. A. pp 641-664.
21. Deasy, P. B., Collins, A. E. M., Maccarthy, D. J. y Russell, R.J. 1989. "Use of strips containing tetracycline hydrochloride or metronidazole for the treatment of advanced periodontal disease". *J. Pharm. Pharmacol.* 41:694-699
22. Drisko, C. L., Cobb, C. M., Killoy, W. J., Michalowicz, B. S., Pihlstrom, B. L., Lowenguth R. A., Caton, J. G., Encarnación, M., Knowles, M. y Goodson, J. M. 1995. "Evaluation of periodontal treatments using controlled release tetracycline fibers" *J. Periodontol.* 66:692-699
23. Drisko, C.H. 1996. "Non-surgical pocket therapy: Pharmacotherapeutics" *Ann. Periodontol.* 1 (1):491-566
24. Dunn, R. L., Perkins, B. H. y Goodson, J. M. 1983. "Controlled release of tetracycline from biodegradable fibres" *J. Dent. Res.* 62:289.
25. Eckles, T. A., Reinhardt, R. A. y Dyer, J. K. 1990. "Intracrevicular application of tetracycline in white petrolatum for the treatment of periodontal disease" *J. Clin. Periodontol.* 17:454-462
26. Elkayam, R., Friedman, M., Stabholz, A., Soskolne, A., Sela, M. N. y Golub, L. 1988. "Sustained release device containing minocycline for local treatment of periodontal disease" *J. Control. Rel.* 7:231-236
27. Esposito, E., Carotta, V., Scabbia, A., Trombelli, L., D'Antona, P., Menegatti, E. y Nastruzzi, C. 1996. "Comparative analysis of tetracycline-containing dental gels: poloxamer and monoglyceride-based formulations" *Int. J. Pharm.* 142:9-23
28. Esposito, E., Cortesi, R., Cervellati, F., Menegatti, E. y Nastruzzi, C. 1997. "Biodegradable microparticles for sustained delivery of tetracycline to the periodontal pocket: formulatory and drug release studies" *J. Microencapsulation* 14(2):175-187.
29. Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J. P., Ammoury, N. y S. Benita. 1989. "Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* 55:R1-R4.

- 30 Fessi, H., Devissaguet, J. P., Puisieux, F., Thies, K. 1992. "Process for the preparation of dispersible colloidal systems of a substance in the form of nanoparticles", *US Patent No. 5118528*.
- 31 Finley, J H 1961 "Spectrophotometric determination of polyvinyl alcohol in paper coatings". *Anal. Chem* 33(13):1925-1927.
- 32 Fitzgerald, J F y Corrigan, O. I. 1996. "Investigation of the mechanisms governing the release of levamisole from poly-lactide-co-glycolide delivery systems", *J. Control. Rel.* 42:125-132.
33. Friedman, M. y Golomb, G. 1982. "New sustained release dosage form of chlorhexidine for dental use". *J. Periodont. Res.* 17:323-238.
34. Friedman, M., y Steinberg, D. 1990 "Sustained-release delivery systems for the treatment of dental diseases" *Pharm Res* 7(4) 313-317.
35. Furuichi, Y, Ramberg, P., Krok, L y Lindhe, J. 1997. "Short term effects of triclosan on healing following subgingival scaling" *J. Clin Periodontol* 24:777-782.
36. Ganem-Quintanar A. 1997a. "Étude de la perméabilité de la muqueuse orale: évaluation de différentes approches pour augmenter le passage des principes actifs". *Tesis Doctoral*. Université de Genève / Université Claude Bernard-Lyon 1 Genève. 1997
37. Ganem-Quintanar, A, Falson-Rieg, F y Buri, P. 1997b. "Contribution of lipid components to the permeability barrier of oral mucosa". *Eur J Pharm Biopharm.* 44:107-120.
38. Ganem-Quintanar, A, Quintanar-Guerrero, D, Allemán, E, Falson-Rieg, F y Buri, P. 1998 "Transport of poly(L-lactic acid) nanoparticles from the gingival sulcus through the sulcular epithelium". *Proceed Intern Symp Control Rel Bioact Mater* 25 699-700
39. Garcia-Godoy, F, De Vizio, W, Volpe, A R, Ferlauto, R J y Miller, J M. 1990. "Effect of a triclosan/copolymer/fluoride dentifrice on plaque formation and gingivitis: A 7-month clinical study". *Am. J. Dent* 3 S15-S26
40. Garret, S, Adams, D. y Bandt C. 1997 "Two multicenter clinical trials of subgingival doxycycline in the treatment of periodontitis". *J Dent Res* 76:153 (Abstract 1113)
41. Gates, K. A, Grad, H, Brek, P y Lee, P I. 1994 "A new bioerodible polymer insert for the controlled release of metronidazole". *Pharm. Res* 11:1605-1609.
42. Gibson, M T, Mangat, D y Gagliano, G. 1994 "Evaluation of the efficacy of a redox agent in the treatment of chronic periodontitis" *J. Clin. Periodontol* 21 690-700
43. Goffin, G. 1998 "Efficacy of a sustained local delivery of chlorhexidine Periochip as an adjunct to scaling and root planning in the treatment of chronic periodontal disease". *Int. Dent. Rev.* 1-18.
44. Golomb, G, Friedman, M, Soskolne, A, Stabholz, A y Sela, M. N. 1984. "Sustained release device containing metronidazole for periodontal use" *J. Dent. Res.* 63:1149-1153.
45. Goodson, J M, Holborow, D, Dunn, R L, Hogan, P. y Dunham, S. 1983. "Monolithic tetracycline-containing fibers for controlled delivery to periodontal pockets". *J. Periodontol.* 54:575-579
46. Goodson, J.M. 1979. "Hollow-fiber devices for and a method of the treatment and diagnosis of oral diseases". *U S Patent* 4,175,326.

47. Gordon, J. M., Walker, C. B., Murphy, J.C., Goodson, J. M. y Socransky, S. S. 1981a. "Concentration of tetracycline in human gingival fluid after single doses". *J. Clin. Periodontol.* 8:117-121.
48. Gordon, J. M., Walker, C.B., Murphy, J.C., Goodson, J. M. y Socransky, S. S. 1981b. "Tetracycline Levels achievable in gingival crevice fluid and in vitro effect on subgingival organisms. Part I. Concentrations in crevicular fluid after repeated doses". *J. Periodontol.* 52:609-612
49. Görner, T., Gref, R., Michenot, D., Sommer, F., Trna, M. N. y Dellacherie, E. 1999. "Lidocaine-loaded biodegradable nanospheres. I. Optimization of the drug incorporation into the polymer matrix". *J. Control. Rel.* 57:259-268.
50. Graca, M. A., Watts, T. L. P., Wilson, R. F. y Palmer, R. M. 1997. "A randomized controlled trial of a 2% minocycline gel as an adjunct to non-surgical periodontal treatment, using a design with multiple matching criteria". *J. Clin. Periodontol.* 24:249-253
51. Greenstem, G. y Polson, A. 1998. "The role of local drug delivery in the management of periodontal diseases", *J. Periodontol.* 59:507-520
52. Gref, R., Quellec, P., Sanchez, A., Calvo, P., Dellacherie, E. y Alonso, M. J. 2001. "Development and characterization of CyA-loaded poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) PEG micro- and nanoparticles. Comparison with conventional PLA particulate carriers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 51:111-118
53. Griffith, L. G. 2000. "Polymeric Biomaterials". *Acta mater.* 48:263-277
54. Gurny, R. y Peppas, N. A. 1981. "Development of biodegradable and injectable latices for controlled release of potent drugs". *Drug Dev. Ind. Pharm.* 7:1-25.
55. Higashi, K., Morsaki, K., Hayashi, S., Kitamura, M., Fujimoto, N., Kimura, S., Ebisu, S. y Okada, H. 1990. "Local ofloxacin delivery using a controlled release insert (PT-01) in the human periodontal pocket". *J. Periodontol. Res.* 25:1-5
56. Jain, R. A. 2000. "The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices". *Biomaterials* 21:2475-2490.
57. Kalaitzakis, C. J., Tynelius-Brattthall, G. y Attstrom, R. 1993. "Clinical and microbiological effects of subgingival application of a chlorhexidine gel in chronic periodontitis". *Swed Dent J.* 17:129-137.
58. Kawashima, Y., Yamamoto, H., Takeuchi, H., Fujioka, S. y Hino, H. 1999. "Pulmonary delivery of insulin with nebulized dl-lactide / glycolide copolymer (PLGA) nanospheres to prolong hypoglycemic effect". *J. Control. Rel.* 62:279-287
59. Kimura, S., Toda, H., Shimabukuro, Y., Kitamura, M., Fujimoto, N., Miki, Y. y Okada, H. 1991. "Topical chemotherapy in human periodontitis using a new controlled release insert containing ofloxacin. I. Microbiological Observation". *J. Periodont. Res.* 26:33-41.
60. Klinge, B., Attstrom, R., Karring, T., Kisch, J., Lewin, B. y Stolze, K. 1992. "3 regimens of topical metronidazole compared with subgingival scaling on periodontal pathology in adults". *J. Clin. Periodontol.* 19:708-714
61. Kostovski, A., Sintov, A., Moldovan, M. y Tal, H. 1994. "Inhibition of plaque formation by local application of a degradable controlled release system containing cetylpyridinium chloride". *J. Clin. Periodontol.* 21:32-37.

- 62 Kreuter, J. 1995. "Nanoparticles" en *Colloidal Drug Delivery Systems* (Kreuter, J., ed). Marcel Dekker, E. U. A. pp 575-611.
- 63 Lawter, J. R., Lanzilotti, M., Brizzolara, N., Fransson, C., Christersson, L. A. y Johanson, O. 1990. "Sustained drug delivery to the periodontal pocket". *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 17:230-231.
- 64 Leelarasamee, N., Howard, S. A., Malanga, C. J., Luzzi, L. A., Hogan, T. F., Kandzari, S. J. y Ma J. H. K. 1986. "Kinetics of drug release from polylactic acid-hydrocortisone microcapsules". *J. Microencapsulation* 3:171-179.
- 65 Leroux, J. C., Allémann, E., Doelker, E. y Gurny, R. 1995. "New approach for the preparation of nanoparticles by an emulsification-diffusion method" *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41(1):14-18.
- 66 Levy, M. Y. y Benita, S. 1990. "Drug release from submicronized o/w emulsion: a new in vitro kinetic evaluation model". *Int. J. Pharm.* 66:29-37.
- 67 Li, S. y Veit, M. 1999. "Biodegradable Polymers. Polyesters" en *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*, Vol. 1 (Mathiowitz, E., ed) John Wiley & Sons, Inc. E. U. A. pp 641-664.
- 68 Loesche, W. J., Giordano, J., Soehren, S., Hutchinson, R., Rau, C. F., Walsh, L., Schork, A., Arbor, A. y Mich, D. 1996. "Nonsurgical treatment of patients with periodontal disease" *Oral Sur. Oral. Med. Oral Pathol. Endod.* 81:533-543.
- 69 Lowenguth, R. A., Chin, I., Caton, J. G., Cobb, C. M., Drisko, C. L., Killow, W. J., Michalowicz, B. S., Pihlstrom, B. L. y Goodson, J. M. 1995. "Evaluation of periodontal treatments using controlled release tetracycline fibers. Microbiological response" *J. Periodontol.* 66:700-707.
- 70 Lowman, M. y Peppas, N. A. 1999. "Hydrogels" en *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*, Vol. 1 (Mathiowitz, E., ed) John Wiley & Sons, Inc. E. U. A. pp 397-418.
- 71 Magenheimer, B. y Benita, S. 1991. "Nanoparticle characterization a compressive physicochemical approach" 1991. *STP Pharm. Sci.* 1(4):221-241.
- 72 Manor, A., Eli, I., Varon, M., Judes, H. y Rosenberg, E. 1989. "Effect of adhesive antibiotic TA on plaque and gingivitis in man" *J. Clin. Periodontol.* 16:621-624.
- 73 Martínez, Y. P., Ramírez, O. G. y Flores, I. 2002. "Efecto tisular de la aplicación subgingival de nanopartículas cargadas con triclosán en periodontitis experimental en perros" *Tesis para obtener la especialidad de parodontología*. Escuela Militar de Graduados de Sanidad de la Secretaría de la Defensa Nacional México.
- 74 Marty, J. J., Oppenheim, R. C. y Speiser, P. 1978. "Nanoparticles, a New Colloidal Drug Delivery System" *Pharm. Acta Helv.* 53:17-23.
- 75 Medlicott, N. J., Jones, D. S., Tucker, I. G. y Holborow, D. 1992. "Preliminary release studies of chlorhexidine (base and diacetate) from poly(L-caprolactone) films prepared by solvent evaporation". *Int. J. Pharm.* 84:85-89.
- 76 Medlicott, N. J., Rathbone, M. J., Tucker, I. G. y Holborow, D. W. 1994. "Delivery systems for the administration of drugs to the periodontal pocket". *Adv. Drug Deliv. Rev.* 13:181-203.
- 77 Michalowicz, B. S., Pihlstrom, B. L., Drisko, C. I., Cobb, C. M., Killow, W. J., Caton, J. G., Lowenguth, R. A., Encarnación, M., Knowles, M. y Goodson, J. M. 1995. "Evaluation of periodontal

- treatments using controlled-release tetracycline fibers: Maintenance response". *J. Periodontol.* 66:708-715.
- 78 Minabe, M., Uematsu, A., Nishijima, K., Tomomatsu, E., Tamura, T., Hori, T., Umemoto, T., Hino, T. 1989a. "Application of a local drug delivery system to periodontal therapy: I. Development of collagen preparations with immobilized tetracycline". *J. Periodontol.* 60:113-117.
- 79 Minabe, M., Takeuchi, K., Tomomatsu, E., Hori, T. y Umemoto, T. 1989b. "Clinical effects of local application of collagen film-immobilized tetracycline". *J. Clin. Periodontol.* 16:291-294.
- 80 Minabe, M., Takeuchi, K., Tamura, T., Hori, T. y Umemoto, T. 1989c. "Subgingival administration of tetracycline on a collagen film". *J. Periodontol.* 60:552-556.
- 81 Mu, L. y Feng, S. S. 2002. "Vitamin E TPGS used as emulsifier in the solvent evaporation/extraction technique for fabrication of polymeric nanospheres for controlled release of paclitaxel (Taxol)". *J. Control. Rel.* 80:129-144.
- 82 Nakagawa, T., Yamada, S., Oosuka, Y., Saito, A., Osaka, Y., Ishikawa, K. y Okuda, K. 1991. "Clinical and microbiological study of local minocycline delivery (Periocline™) following scaling and root planning in recurrent periodontal pockets". *Bull. Tokio Dent. Coll.* 32:63-70.
- 83 Narasimhan, B., Mallapragada, S. K. y Peppas, N. A. 1999. "Release kinetics, data interpretation" en *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*, Vol. 2 (Mathiowitz, E., ed) John Wiley & Sons, Inc. E. U. A. pp 921-935.
- 84 Niwa, T., Takeuchi, T., Hino, T., Kunou, N. y Kawashima, Y. 1993. "Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D,L- lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior". *J. Control. Rel.* 25:89-98.
- 85 Noguchi, T., Izumizawa, K., Fukuda, M., Kitamura, S., Suzuki, Y. e Ikura, H. 1984. "New method for local drug delivery using resorbable base material in periodontal therapy". *Bull. Tokio Med. Dent. Univ.* 31:145-153.
- 86 Norling, T., Lading, P., Engström, S., Larsson, K., Krog, N. y Nissen, S. S. 1992. "Formulation of a drug delivery system based on a mixture of monoglycerides and triglycerides for use in the treatment of periodontal disease". *J. Clin. Periodontol.* 19:687-692.
- 87 Noyan, S., Yilmaz, S., Kuru, B., Kadir, T., Acar, O. y Buget, E. 1997. "A clinical and microbiological evaluation of systemic and local metronidazole delivery in adult periodontitis patients". *J. Clin. Periodontol.* 24:158-165.
- 88 Oosterwaal, P. J., Mikx, F. H., Van't Hof M. A. y Renggli, H. H. 1991. "Comparison of the antimicrobial effect of the application of chlorhexidine gel, amine fluoride gel and stannous fluoride gel in debried periodontal pockets". *J. Clin. Periodontol.* 18:245-251.
- 89 Oppenheim, R. C. 1986. "Nanoparticles" en *Drug Delivery Systems* (Juliano, R. L. ed.). Oxford University Press. E. U. A. pp 177-188.
- 90 Paquette, D. W., Waters, G. S., Stefanidou, H. P., Lawrence, H. P., Friden, P. M., O'Connor, S. M., Sperati, F. G., Oppenheim, F. G., Hutchens, L. H. y Williams, R. C. 1997. "Inhibition of experimental gingivitis in beagle dogs with topical salivary histatines". *J. Clin. Periodontol.* 24:216-222.

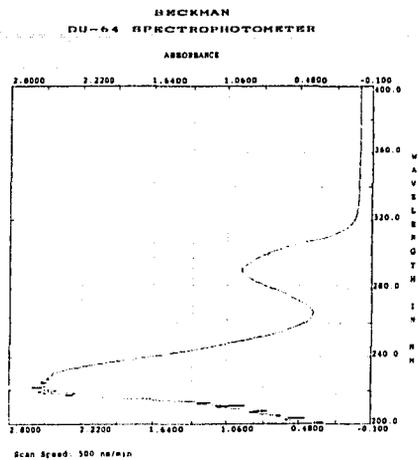
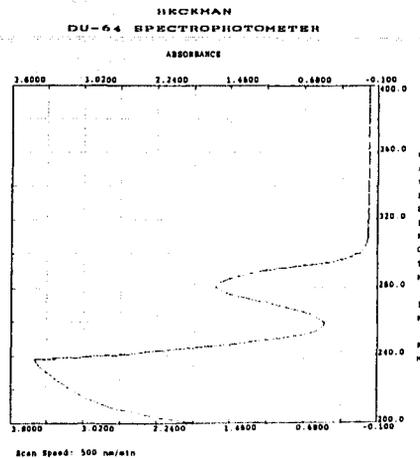
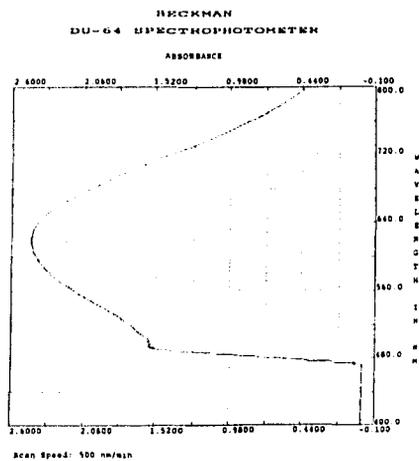
91. Pedrazzoli, V., Kilian, M. y Karring, T. 1992. "Comparative clinical and microbiological effects of topical subgingival application of metronidazole 25% gel compared to the effect of subgingival scaling in adult periodontitis" *J. Clin. Periodontol.* 19:715-722.
92. Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W. y Ichikawa, H. 2000. "Hydrogels in pharmaceutical formulations". *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50:27-46.
93. Peracchia, M.T., Gref, R., Minamitake, Y., Domb, A., Lotan, N. y Langer, R. 1997. "PEG-coated nanospheres from amphiphilic diblock and multiblock copolymers: Investigation of their drug encapsulation and release characteristics" *J. Control. Rel.* 46:223-231.
94. Piñón-Segundo, E. 2000. "Diseño de un sistema terapéutico nanoparticulado destinado al tratamiento de la gingivitis y la periodontitis" *Tesis Licenciatura*. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
95. Pitcher, G. R., Newman, H. N. y Strahan, J. D. 1980. "Acces to subgingival plaque by disclosing agents using mouthrinsing and direct irrigation". *J. Clin. Periodontol.* 7:300-308.
96. Polson, A. M., Stoller, N. H., Hanes P. J., Killow, W. J., Southard G. L., Duke, S. P., Bogle, G. C., Drisko, C. H. y Friesen, L. R. 1997. "Multi-center comparative evaluation of subgingivally delivered sanguinarine and doxycycline in the treatment of periodontitis" *J. Periodontol.* 68:110-118.
97. Quintanar-Guerrero, D. "Étude de nouvelles techniques d'obtention de suspensions de nanoparticules à partir de polymères preformes" *Tesis Doctoral*. Université de Genève / Université Claude Bernard-Lyon 1. Genève. 1997a.
98. Quintanar-Guerrero, Allémann, E., Doelker, E. y Fessi, H. 1997b. "A mechanistic study of the formation of polymer nanoparticles by the emulsification-diffusion technique". *Colloid. Polym. Sci.* 275:640-647.
99. Quintanar-Guerrero D. 1997c. "Procede de préparation nanocapsules type vesiculaire, utilisables notamment comme vecteurs colloïdaux de principes actifs pharmaceutiques ou autres". *French. Patent Appl.* 97 09 672.
100. Quintanar-Guerrero, D., Allémann, E., Fessi, H. y Doelker, E. 1998a. "Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers". *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 24:1113-1117.
101. Quintanar-Guerrero, D., Ganem-Quintanar, A., Allémann, E., Fessi, H. y Doelker, E. 1998b. "Influence of the stabilizer coating on the purification and freeze drying of poly(D,L-lactid acid) nanoparticles prepared by an emulsion-diffusion technique" *J. Microencapsulation.* 15:107-119.
102. Ramberg, P., Furuchi, Y., Volpe, A. R., Nabi, N., Gaffar, A. y Lindhe, J. 1995. "The effect of triclosan on developing gingivitis". *J. Clin. Periodontol.* 22:442-448.
103. Raterichak, K. H., Wolf, H.F. y Hasell, T.M. 1989. *Periodontology 1*, 2a ed. Thieme Medical Publishers, Inc., E. U. A. pp 1-21, 314-318.
104. Raygoza T., D. 1995. "Estudio de la liberación del clorhidrato de pseudoefedrina en matrices hidrofílicas de PVA 5222 y su relación con el hinchamiento". *Tesis de Licenciatura*. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, U.N.A.M. México.

- 105 Rosling, B., Dahlén, G., Volpe, A., Furuichi, Y., Ramberg, P. y Lindhe, J. 1997a. "Effect of triclosan on the subgingival microbiota of periodontitis-susceptible subjects". *J. Clin Periodontol.* 24:881-887
- 106 Rosling, B., Wannfors, B., Volpe, A. R., Furuichi, Y., Ramberg, P. y Lindhe, J. 1997b. "The use of a triclosan/copolymer dentifrice may retard the progression of periodontitis". *J. Clin Periodontol.* 24:873-880
- 107 Schwach-Abdellaoui, K., Vivien-Castioni, N. y Gurny, R. 2000 "Local delivery of antimicrobial agents for the treatment of periodontal diseases" *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50:83-99.
108. Shapira, J., Sgan-Cohen, H. D., Stabholz, A., Sela, M. N., Schurr, D. y Goultschin, J. 1994. "Clinical and microbiological effects of chlorhexidine and arginine sustained-release varnishes in the mentally retarded" *Spec. Care. Dentist.* 14:158-163.
109. Somayaji, B. V., Janiwal, U., Jayachandran, P., Vidyalakshmi, K. y Dudan, R. V. 1998. "Evaluation of antimicrobial efficacy and release pattern of tetracycline and metronidazole using a local delivery system" *J. Periodontol.* 69:409-413
110. Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R. y Rudzinski, W. E. 2001. "Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices" *J. Control. Rel.* 70:1-20.
111. Soskolne, A., Golomb, G., Friedman, M. y Sela, M.N. 1983. "New sustained release dosage form of chlorhexidine for dental use II Use in periodontal therapy". *J. Periodont. Res.* 18:330-336
112. Soskolne, W. A., Heasman, P. A. y Stabholz, A. 1997. "Sustained local delivery of chlorhexidine in the treatment of periodontitis: a multicenter study" *J. Periodontol.* 68:32-38
113. Stabholz, A., Sela, M. N., Friedman, M., Golomb, G. y Soskolne, A. 1986. "Clinical and microbiological effects of sustained release chlorhexidine in periodontal pockets". *J. Clin. Periodontol.* 13:783-788.
114. Stannesse, S., Orecchioni, A. M., Nakache, E., Puisseux, F. y Fessi, H. 1995. "Formation and stabilization of a biodegradable polymeric colloidal suspension of nanoparticles" *Colloid Polym. Sci.* 273:505-511
115. Steinberg, D., Friedman, M., Soskolne, A. y Sela, M.N. 1990. "A new degradable controlled release device for treatment of periodontal disease. in vitro release study". *J. Periodontol.* 61:393-398.
116. Stelzel, M. y Flores de Jacobi, L. 1996. "Topical metronidazole application compared with subgingival scaling. A clinical and microbiologic study on recall patients". *J. Clin. Periodontol.* 23:24-29.
117. Stelzel, M. y Flores de Jacobi, L. 1997. "Topical metranidazole application in recall patients. Long-term results". *J. Clin. Periodontol.* 24:914-915
118. Stolze, K. y Stellfeld, M. 1992. "Systemic absorption of metronidazole after application of a metronidazole 25% dental gel" *J. Clin. Periodontol.* 19:693-697
119. Taner, I. L., Ozcan, G. y Doganay, T. 1994. "Comparison of the antibacterial effects on subgingival microflora of two different resorbable base materials containing doxycycline". *J. Nihon Univ. Sch. Dent.* 36:183-190

- 120 Timmermans, M. F., Van der Weijden, G. A. y Van Steenberghe, T. J. M. 1996. "Evaluation of the long term efficacy and safety of locally applied minocycline in adult periodontitis patients". *J. Clin. Periodontol.* 23: 707-716.
- 121 Tonetti, M., Cugini, M. A. y Goodson, J. M. 1990. "Zero-order delivery with periodontal placement of tetracycline loaded ethylene vinyl acetate fibers". *J. Periodont. Res.* 25: 243-249.
- 122 Uhrich, K. E., Cannizzaro, S. M., Langer, R. S. y Shakesheff, K. M. 1999. "Polymeric Systems for Controlled Drug Release". *Chem. Rev.* 99: 3181-3198.
- 123 Unsal, E., Walsh, T. F. y Akkaya, M. 1995. "The effect of a single application of subgingival antimicrobial or mechanical therapy on the clinical parameters of juvenile periodontitis". *J. Periodontol.* 66: 47-51.
- 124 Van Steenberghe, D., Bercy, P. y Kohl, J. 1993. "Subgingival minocycline hydrochloride ointment in moderate to severe chronic adult periodontitis: A randomized double-blind, vehicle-controlled, multicenter study". *J. Periodontol.* 64: 637-644.
- 125 Vasavada, R. C. y Junnarkar, G. H., 1997. "Release of metronidazole from poly(ortho ester) matrices". *Procced Intern Symp Control. Rel. Bioact. Mater* 24: 499-500.
- 126 Waaler, S. M., Rolla, G., Skjörland, K. y Ögaard, B. 1993. "Effects of oral rinsing with triclosan and sodium lauryl sulphate on dental plaque formation - a pilot study". *Scan.J.Dent. Res.* 101: 192-195.
- 127 Wade, W. G., Moran, J., Morgan, J.R., Newcombe, R. y Addy, M. 1992. "The effects of antimicrobial acrylic strips on the subgingival microflora in chronic periodontitis". *J. Clin. Periodontol.* 19: 127-134.
- 128 Wan Yusof, W. Z., Newman, H. N., Strahan, J. D. y Coventry, J. F. 1984. "Subgingival metronidazole in dialysis tubing and subgingival chlorhexidine irrigation in the control of chronic inflammatory periodontal disease". *J. Clin. Periodontol.* 11: 166-175.
- 129 Washington, C. 1990. "Drug Release from microdisperse systems - a critical review". *Int. J. Pharm.* 58: 1-12.
- 130 Webber, W. L. y Mathiowitz, E. 1997. "Modulating tetracycline release from PLA/PG films". *Procced Intern Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24: 575-576.
- 131 Yeom, H.R., Park, Y.J., Lee, S.J., Rhyu, I. C., Chung, C. P. y Nisengard, R.J. 1997. "Clinical and microbiological effects of minocycline-loaded microcapsules in adult periodontitis". *J. Periodontol.* 68: 1102-1109.
- 132 Yeung, F. I., Newman, H. N. y Addy, M. 1983. "Subgingival metronidazole in acrylic resin vs. Chlorhexidine irrigation in the control of chronic periodontitis". *J. Periodontol.* 54: 651-657.

ANEXO 1. Espectros de absorción y coeficientes de absortividad ( $\epsilon$ ).

A) Triclosán en NaOH 0.1 N

B) Triclosán en Brij<sup>®</sup> 58 al 2 % p/vC) Complejo de PVAL - H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> - I<sub>2</sub> - KI

Sistema	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon$ (ml/mg.cm)
Triclosán / NaOH	290	24 009827
Triclosán / Brij <sup>®</sup> 58	282	16 584848
Complejo PVAL	640	47 086039

A) Porcentajes de triclosán liberado de nanoesferas de PLGA considerando como 100% el triclosán cargado en las nanoesferas. Lote 2 (1.23 % de Triclosán); Lote 3 (4.76 % de Triclosán); Lote 4 (9.09 % de Triclosán); Lote 5 (16.67 % de Triclosán); Lote 6 (23.08 % de Triclosán) y Lote 7 (33.33% de Triclosán).

t (min)	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	Lote 6	Lote 7
	Prom. ± d.e.	Prom. ± d.e.	Prom. ± d.e.	Prom. ± d.e.	Prom. ± d.e.	Prom. ± d.e.
5	39.92 ± 1.56	48.95 ± 9.35	48.22 ± 11.65	46.75 ± 6.91	62.52 ± 4.89	72.01 ± 3.38
10	45.11 ± 2.38	55.02 ± 5.58	57.32 ± 9.80	58.19 ± 3.02	66.78 ± 5.87	73.06 ± 1.15
15	50.58 ± 4.24	60.95 ± 5.97	61.91 ± 9.68	65.79 ± 6.03	72.65 ± 7.21	74.30 ± 3.61
20	56.04 ± 5.59	65.13 ± 7.03	66.47 ± 4.37	73.11 ± 4.33	76.09 ± 0.58	75.13 ± 2.57
25	61.27 ± 6.10	71.30 ± 5.78	71.28 ± 1.40	76.79 ± 4.73	79.76 ± 1.84	75.96 ± 3.16
30	65.55 ± 5.27	75.36 ± 4.86	74.33 ± 2.08	80.71 ± 3.77	82.45 ± 2.53	76.58 ± 1.05
40	72.43 ± 3.59	83.16 ± 4.32	77.62 ± 4.37	85.92 ± 8.88	88.06 ± 7.37	77.82 ± 2.01
50	75.78 ± 4.12	90.87 ± 5.92	79.78 ± 5.31	87.51 ± 1.84	89.31 ± 4.22	79.47 ± 0.63
60	78.63 ± 4.23	94.43 ± 6.35	82.06 ± 3.21	91.68 ± 2.07	89.57 ± 1.26	79.69 ± 2.62
70	80.54 ± 1.49	95.96 ± 4.28	83.08 ± 8.07	93.26 ± 1.90	90.54 ± 3.35	79.27 ± 2.28
80	82.44 ± 6.92	96.09 ± 2.06	83.84 ± 1.45	94.83 ± 6.03	91.76 ± 1.98	79.89 ± 1.27
90	83.40 ± 2.11	96.22 ± 4.96	83.59 ± 7.38	94.84 ± 2.24	90.80 ± 2.67	80.30 ± 2.76
105	83.87 ± 2.17	94.59 ± 3.67	84.22 ± 1.26	95.88 ± 6.76	93.71 ± 5.31	80.72 ± 2.29
120	86.00 ± 4.05	96.96 ± 3.19	84.10 ± 5.05	94.84 ± 6.70	90.81 ± 3.79	80.93 ± 1.52
150	84.60 ± 4.99	95.47 ± 7.35	84.48 ± 3.84	94.32 ± 5.16	93.47 ± 4.99	81.34 ± 2.08
180	85.30 ± 6.72	93.45 ± 3.51	84.23 ± 2.86	96.13 ± 3.31	92.02 ± 3.39	82.37 ± 1.27
210	85.54 ± 4.87	94.07 ± 2.93	84.73 ± 1.75	95.63 ± 2.07	92.01 ± 4.61	81.35 ± 1.52
240	86.48 ± 1.49	97.08 ± 4.54	83.60 ± 4.18	95.36 ± 3.56	91.28 ± 1.59	81.55 ± 2.75
270	87.43 ± 1.79	95.97 ± 4.20	83.84 ± 6.94	93.02 ± 0.57	91.04 ± 3.78	83.61 ± 2.36
300	85.55 ± 5.95	96.47 ± 2.88	84.85 ± 2.64	94.83 ± 1.67	91.28 ± 3.08	83.82 ± 3.57
330	87.43 ± 4.93	95.97 ± 3.39	85.11 ± 3.11	95.62 ± 2.51	90.79 ± 5.19	83.41 ± 2.13
360	87.20 ± 2.47	96.09 ± 1.09	85.24 ± 1.58	95.88 ± 1.74	91.03 ± 0.77	83.21 ± 1.25

B) Porcentajes de triclosán liberado de nanoesferas de PLA considerando como 100% el triclosán cargado en las nanoesferas. Lote 9 (1.23 % de Triclosán); Lote 10 (4.76 % de Triclosán) y Lote 11 (9.09 % de Triclosán).

t (min)	Lote 9 Prom. ± d.e.	Lote 10 Prom. ± d.e.	Lote 11 Prom. ± d.e.
5	25.96 ± 2.87	39.38 ± 1.64	35.27 ± 6.98
10	34.11 ± 5.44	48.74 ± 7.34	43.04 ± 3.93
15	41.46 ± 1.55	60.38 ± 6.90	47.23 ± 2.51
20	48.94 ± 1.20	66.99 ± 5.02	52.42 ± 1.54
25	53.90 ± 3.87	73.26 ± 2.19	57.23 ± 4.35
30	58.98 ± 3.56	77.16 ± 2.93	59.52 ± 2.16
40	72.62 ± 4.97	83.94 ± 0.29	63.86 ± 4.16
50	75.51 ± 5.20	86.77 ± 1.24	67.70 ± 5.23
60	83.94 ± 6.37	89.04 ± 1.56	69.60 ± 3.79
70	86.38 ± 4.47	90.56 ± 2.17	73.03 ± 3.68
80	88.64 ± 6.39	90.78 ± 3.14	74.35 ± 5.78
90	90.90 ± 2.28	92.71 ± 4.12	75.84 ± 2.19
105	93.30 ± 3.47	92.40 ± 2.29	77.33 ± 2.69
120	95.14 ± 4.51	94.33 ± 2.47	80.57 ± 3.90
150	97.11 ± 5.45	95.31 ± 1.66	79.30 ± 4.12
180	95.86 ± 4.98	93.81 ± 2.37	81.17 ± 2.37
210	96.69 ± 0.14	94.88 ± 2.73	81.37 ± 2.58
240	97.12 ± 1.32	95.10 ± 2.75	81.96 ± 1.54
270	96.56 ± 1.71	94.78 ± 3.25	81.57 ± 3.33
300	97.26 ± 1.38	94.99 ± 1.27	80.60 ± 4.05
330	96.84 ± 1.69	95.10 ± 1.29	82.02 ± 2.72
360	97.12 ± 1.87	94.99 ± 0.87	81.89 ± 1.19

C) Porcentajes de triclosán liberado de nanoesferas de CAP considerando como 100% el triclosán cargado en las nanoesferas. Lote 13 (1.23 % de Triclosán); Lote 14 (4.76 % de Triclosán) y Lote 15 (9.09 % de Triclosán).

t (min)	Lote 13 Prom. $\pm$ d.e.	Lote 14 Prom. $\pm$ d.e.	Lote 15 Prom. $\pm$ d.e.
5	86.09 $\pm$ 4.89	82.49 $\pm$ 5.48	55.84 $\pm$ 4.46
10	89.58 $\pm$ 2.78	86.40 $\pm$ 6.95	62.46 $\pm$ 5.37
15	90.02 $\pm$ 3.47	87.90 $\pm$ 2.81	67.87 $\pm$ 2.64
20	90.73 $\pm$ 3.23	89.73 $\pm$ 3.49	70.67 $\pm$ 3.35
25	91.30 $\pm$ 2.93	91.79 $\pm$ 2.70	74.12 $\pm$ 2.57
30	92.01 $\pm$ 2.62	93.17 $\pm$ 2.66	78.50 $\pm$ 1.82
40	92.72 $\pm$ 1.82	95.00 $\pm$ 1.37	82.72 $\pm$ 2.78
50	93.44 $\pm$ 1.66	95.58 $\pm$ 1.26	85.01 $\pm$ 3.34
60	93.86 $\pm$ 2.27	95.81 $\pm$ 1.85	86.03 $\pm$ 2.71
70	94.15 $\pm$ 1.84	96.27 $\pm$ 3.15	87.21 $\pm$ 3.89
80	93.87 $\pm$ 1.14	96.16 $\pm$ 2.67	88.48 $\pm$ 2.65
90	94.72 $\pm$ 1.93	95.93 $\pm$ 2.55	89.91 $\pm$ 2.49
105	95.57 $\pm$ 1.37	96.72 $\pm$ 3.94	90.25 $\pm$ 3.02
120	95.15 $\pm$ 2.03	97.18 $\pm$ 2.03	90.51 $\pm$ 4.21
150	95.01 $\pm$ 1.45	96.96 $\pm$ 1.78	89.17 $\pm$ 4.64
180	95.85 $\pm$ 2.03	97.18 $\pm$ 1.35	89.24 $\pm$ 4.53
210	94.73 $\pm$ 1.81	97.41 $\pm$ 0.94	89.91 $\pm$ 4.82
240	95.57 $\pm$ 1.70	97.30 $\pm$ 0.87	88.83 $\pm$ 3.87
270	96.85 $\pm$ 1.38	96.96 $\pm$ 1.32	89.66 $\pm$ 2.37
300	96.71 $\pm$ 2.47	97.07 $\pm$ 1.62	89.25 $\pm$ 1.81
330	97.28 $\pm$ 2.05	96.84 $\pm$ 2.08	89.58 $\pm$ 2.48
360	96.43 $\pm$ 1.23	97.18 $\pm$ 2.12	89.50 $\pm$ 1.23

A) Porcentajes de triclosán liberado de nanoesferas de PLGA respecto al porcentaje de triclosán máximo liberado. Lote 2 (1.23 % de Triclosán); Lote 3 (4.76 % de Triclosán); Lote 4 (9.09 % de Triclosán); Lote 5 (16.67 % de Triclosán); Lote 6 (23.08 % de Triclosán) y Lote 7 (33.33% de Triclosán).

t (min)	Lote 2 Prom. ± d.e.	Lote 3 Prom. ± d.e.	Lote 4 Prom. ± d.e.	Lote 5 Prom. ± d.e.	Lote 6 Prom. ± d.e.	Lote 7 Prom. ± d.e.
5	45.65 ± 1.78	50.42 ± 9.63	56.57 ± 13.67	48.62 ± 7.19	66.71 ± 5.22	85.90 ± 4.03
10	51.60 ± 2.72	56.67 ± 5.75	67.25 ± 11.50	60.53 ± 3.14	71.27 ± 6.26	87.15 ± 1.37
15	57.85 ± 4.85	62.78 ± 6.15	72.63 ± 11.36	68.44 ± 6.27	77.52 ± 7.69	88.63 ± 4.31
20	64.10 ± 6.39	67.09 ± 7.24	77.98 ± 5.13	76.05 ± 4.50	81.19 ± 0.62	89.63 ± 3.07
25	70.08 ± 6.98	73.45 ± 5.95	83.62 ± 1.64	79.88 ± 4.92	85.11 ± 1.96	90.61 ± 3.77
30	74.98 ± 6.03	77.62 ± 5.01	87.20 ± 2.44	83.95 ± 3.92	87.99 ± 2.70	91.36 ± 1.25
40	82.84 ± 4.11	85.66 ± 4.45	91.06 ± 5.13	89.38 ± 9.24	93.98 ± 7.86	92.83 ± 2.40
50	86.67 ± 4.71	93.60 ± 6.10	93.60 ± 6.23	91.03 ± 1.91	95.31 ± 4.50	94.80 ± 0.75
60	89.93 ± 4.84	97.27 ± 6.54	96.27 ± 3.77	95.36 ± 2.15	95.58 ± 1.34	95.06 ± 3.13
70	92.11 ± 1.70	98.84 ± 4.41	97.47 ± 9.47	97.01 ± 1.98	96.62 ± 3.57	94.57 ± 2.72
80	94.29 ± 7.91	98.98 ± 2.12	98.36 ± 1.70	98.64 ± 6.27	97.92 ± 2.11	95.31 ± 1.52
90	95.38 ± 2.41	99.11 ± 5.11	98.07 ± 8.66	98.65 ± 2.33	96.89 ± 2.85	95.80 ± 3.29
105	95.93 ± 2.48	97.43 ± 3.78	98.81 ± 1.48	99.73 ± 7.03	100.00 ± 5.67	96.30 ± 2.73
120	98.36 ± 4.63	99.87 ± 3.29	98.66 ± 5.92	98.66 ± 6.97	96.90 ± 4.04	96.54 ± 1.81
150	96.76 ± 5.71	98.34 ± 7.57	99.11 ± 4.51	98.11 ± 5.37	99.74 ± 5.32	97.04 ± 2.48
180	97.56 ± 7.69	96.26 ± 3.62	98.81 ± 3.36	100.00 ± 3.44	98.20 ± 3.62	98.27 ± 1.52
210	97.83 ± 5.57	96.89 ± 3.02	99.40 ± 2.05	99.47 ± 2.15	98.19 ± 4.92	97.05 ± 1.81
240	98.91 ± 1.70	100.00 ± 4.68	98.08 ± 4.90	99.20 ± 3.70	97.41 ± 1.70	97.28 ± 3.28
270	100.00 ± 2.05	98.86 ± 4.33	98.36 ± 8.14	96.76 ± 0.59	97.15 ± 4.03	99.74 ± 2.82
300	97.85 ± 6.81	99.37 ± 2.97	99.55 ± 3.10	98.64 ± 1.74	97.41 ± 3.29	100.00 ± 4.26
330	99.99 ± 5.64	98.85 ± 3.49	99.85 ± 3.65	99.46 ± 2.61	96.89 ± 5.54	99.51 ± 2.54
360	99.74 ± 2.82	98.98 ± 1.12	100.00 ± 1.85	99.74 ± 1.81	97.14 ± 0.82	99.26 ± 1.49

B) Porcentajes de triclosán liberado de nanoesferas de PLA respecto al porcentaje de triclosán máximo liberado. Lote 9 (1.23 % de Triclosán); Lote 10 (4.76 % de Triclosán) y Lote 11 (9.09 % de Triclosán).

t (min)	Lote 9		Lote 10		Lote 11	
	Prom.	± d.e.	Prom.	± d.e.	Prom.	± d.e.
5	26.69	± 2.95	41.32	± 1.72	43.01	± 8.51
10	35.07	± 5.59	51.13	± 7.70	52.48	± 4.79
15	42.63	± 1.59	63.35	± 7.24	57.58	± 3.06
20	50.32	± 1.23	70.29	± 5.27	63.91	± 1.88
25	55.41	± 3.98	76.86	± 2.30	69.78	± 5.30
30	60.64	± 3.66	80.95	± 3.07	72.57	± 2.63
40	74.66	± 5.11	88.07	± 0.30	77.87	± 5.07
50	77.63	± 5.35	91.04	± 1.30	82.55	± 6.38
60	86.31	± 6.55	93.42	± 1.64	84.86	± 4.62
70	88.81	± 4.60	95.01	± 2.28	89.05	± 4.49
80	91.14	± 6.57	95.25	± 3.29	90.65	± 7.05
90	93.46	± 2.34	97.28	± 4.32	92.47	± 2.67
105	95.93	± 3.57	96.95	± 2.40	94.29	± 3.28
120	97.82	± 4.64	98.97	± 2.59	98.24	± 4.76
150	99.85	± 5.60	100.00	± 1.74	96.69	± 5.02
180	98.56	± 5.12	98.43	± 2.49	98.97	± 2.89
210	99.42	± 0.14	99.55	± 2.86	99.22	± 3.15
240	99.86	± 1.36	99.78	± 2.89	99.93	± 1.88
270	99.28	± 1.76	99.44	± 3.41	99.46	± 4.06
300	100.00	± 1.42	99.67	± 1.33	98.27	± 4.94
330	99.57	± 1.74	99.78	± 1.35	100.00	± 3.32
360	99.86	± 1.92	99.67	± 0.91	99.85	± 1.45

C) Porcentajes de triclosán liberado de nanoesferas de CAP respecto al porcentaje de triclosán cargado. Lote 13 (1.23 % de Triclosán); Lote 14 (4.76 % de Triclosán) y Lote 15 (9.09 % de Triclosán).

t (min)	Lote 13	Lote 14	Lote 15
	Prom. $\pm$ d.e.	Prom. $\pm$ d.e.	Prom. $\pm$ d.e.
5	88.50 $\pm$ 5.03	84.68 $\pm$ 5.63	61.70 $\pm$ 4.93
10	92.09 $\pm$ 2.86	88.70 $\pm$ 7.13	69.02 $\pm$ 5.93
15	92.54 $\pm$ 3.57	90.24 $\pm$ 2.88	74.99 $\pm$ 2.92
20	93.27 $\pm$ 3.32	92.12 $\pm$ 3.58	78.08 $\pm$ 3.70
25	93.86 $\pm$ 3.01	94.23 $\pm$ 2.77	81.90 $\pm$ 2.84
30	94.59 $\pm$ 2.69	95.65 $\pm$ 2.73	86.74 $\pm$ 2.01
40	95.32 $\pm$ 1.87	97.52 $\pm$ 1.41	91.40 $\pm$ 3.07
50	96.05 $\pm$ 1.71	98.12 $\pm$ 1.29	93.93 $\pm$ 3.69
60	96.49 $\pm$ 2.33	98.36 $\pm$ 1.90	95.06 $\pm$ 2.99
70	96.79 $\pm$ 1.89	98.82 $\pm$ 3.23	96.36 $\pm$ 4.30
80	96.50 $\pm$ 1.17	98.71 $\pm$ 2.74	97.76 $\pm$ 2.93
90	97.37 $\pm$ 1.98	98.48 $\pm$ 2.62	99.34 $\pm$ 2.75
105	98.24 $\pm$ 1.41	99.29 $\pm$ 4.04	99.72 $\pm$ 3.34
120	97.81 $\pm$ 2.09	99.76 $\pm$ 2.08	100.00 $\pm$ 4.65
150	97.67 $\pm$ 1.49	99.53 $\pm$ 1.83	98.52 $\pm$ 5.13
180	98.54 $\pm$ 2.09	99.77 $\pm$ 1.39	98.60 $\pm$ 5.01
210	97.38 $\pm$ 1.86	100.00 $\pm$ 0.96	99.34 $\pm$ 5.33
240	98.24 $\pm$ 1.75	99.88 $\pm$ 0.89	98.15 $\pm$ 4.28
270	99.56 $\pm$ 1.42	99.53 $\pm$ 1.36	99.06 $\pm$ 2.62
300	99.42 $\pm$ 2.54	99.65 $\pm$ 1.66	98.61 $\pm$ 2.00
330	100.00 $\pm$ 2.11	99.42 $\pm$ 2.14	98.97 $\pm$ 2.74
360	99.13 $\pm$ 1.26	99.76 $\pm$ 2.18	98.88 $\pm$ 1.36

## A) Resultados de la liberación de Triclosán en nanoesferas de PLGA. Lote 2 (1.23 % de triclosán).

t (min)	$t^{1/2}$	ln t	Mt (mg)	Mt/M <sub>∞</sub> *100	Mt/M <sub>∞</sub>	ln Mt/M <sub>∞</sub>	1-R	ln (1-R)
5	2.2361	1.6094	5.0950	45.65	0.4565	-0.7841	0.5435	-0.6098
10	3.1623	2.3026	5.7587	51.60	0.5160	-0.6617	0.4840	-0.7256
15	3.8730	2.7081	6.4561	57.85	0.5785	-0.5474	0.4215	-0.8639
20	4.4721	2.9957	7.1537	64.10	0.6410	-0.4448	0.3590	-1.0243
25	5.0000	3.2189	7.8211	70.08	0.7008	-0.3556	0.2992	-1.2065
30	5.4772	3.4012	8.3678	74.98	0.7498	-0.2880	0.2502	-1.3853
40	6.3246	3.6889	9.2453	82.84	0.8284	-0.1883	0.1716	-1.7625
50	7.0711	3.9120	9.6727	86.67	0.8667	-0.1431	0.1333	-2.0150
60	7.7460	4.0943	10.0370	89.93	0.8993	-0.1061	0.1007	-2.2958
70	8.3666	4.2485	10.2804	92.11	0.9211	-0.0822	0.0789	-2.5399
80	8.9443	4.3820	10.5230	94.29	0.9429	-0.0588	0.0571	-2.8623
90	9.4868	4.4998	10.6451	95.38	0.9538	-0.0473	0.0462	-3.0748
105	10.2470	4.6540	10.7061	95.93	0.9593	-0.0416	0.0407	-3.2008
120	10.9545	4.7875	10.9778	98.56	0.9836	-0.0165	0.0164	-4.1113
150	12.2474	5.0106	10.7986	96.76	0.9676	-0.0330	0.0324	-3.4281
180	13.4164	5.1930	10.8879	97.56	0.9756	-0.0247	0.0244	-3.7115
210	14.4914	5.3471	10.9186	97.83	0.9783	-0.0219	0.0217	-3.8308
240	15.4919	5.4806	11.0394	98.91	0.9891	-0.0109	0.0109	-4.5218
270	16.4317	5.5984	11.1607	100.00	1.0000	0.0000	0.0000	
300	17.3205	5.7038	10.9202	97.85	0.9785	-0.0218	0.0215	-3.8376
330	18.1659	5.7991	11.1600	99.99	0.9999	-0.0001	0.0001	9.6564
360	18.9737	5.8861	11.1313	99.74	0.9974	-0.0026	0.0026	-5.9383

## B) Resultados de la liberación de Triclosán en nanoesferas de PLGA. Lote 3 (4.76 % de triclosán).

t (min)	$t^{1/2}$	ln t	Mt (mg)	Mt/M <sub>∞</sub> *100	Mt/M <sub>∞</sub>	ln Mt/M <sub>∞</sub>	1-R	ln (1-R)
5	2.2361	1.6094	11.7577	50.42	0.5042	-0.6848	0.4958	-0.7016
10	3.1623	2.3026	13.2151	56.67	0.5667	-0.5679	0.4333	-0.8363
15	3.8730	2.7081	14.6408	62.78	0.6278	-0.4655	0.3722	-0.9884
20	4.4721	2.9957	15.6442	67.09	0.6709	-0.3992	0.3291	-1.1113
25	5.0000	3.2189	17.1275	73.45	0.7345	-0.3086	0.2655	-1.3260
30	5.4772	3.4012	18.1011	77.62	0.7762	-0.2533	0.2238	-1.4971
40	6.3246	3.6889	19.9761	85.66	0.8566	-0.1547	0.1434	-1.9423
50	7.0711	3.9120	21.8264	93.60	0.9360	-0.0662	0.0640	-2.7485
60	7.7460	4.0943	22.6817	97.27	0.9727	-0.0277	0.0273	-3.5991
70	8.3666	4.2485	23.0486	98.84	0.9884	-0.0117	0.0116	-4.4555
80	8.9443	4.3820	23.0809	98.98	0.9898	-0.0103	0.0102	-4.5828
90	9.4868	4.4998	23.1113	99.11	0.9911	-0.0090	0.0089	-4.7188
105	10.2470	4.6540	22.7195	97.43	0.9743	-0.0261	0.0257	-3.6603
120	10.9545	4.7875	23.2900	99.87	0.9987	-0.0013	0.0013	6.6754
150	12.2474	5.0106	22.9316	98.34	0.9834	-0.0168	0.0166	4.0966
180	13.4164	5.1930	22.4471	96.26	0.9626	-0.0381	0.0374	-3.2859
210	14.4914	5.3471	22.5949	96.89	0.9689	-0.0316	0.0311	-3.4716
240	15.4919	5.4806	23.3194	100.00	1.0000	0.0000	0.0000	
270	16.4317	5.5984	23.0524	98.86	0.9886	-0.0115	0.0114	-4.4698
300	17.3205	5.7038	23.1714	99.37	0.9937	-0.0064	0.0063	5.0597
330	18.1659	5.7991	23.0515	98.85	0.9885	-0.0116	0.0115	4.4665
360	18.9737	5.8861	23.0809	98.98	0.9898	-0.0103	0.0102	-4.5828

## C) Resultados de la liberación de Triclosán en nanoesferas de PLGA Lote 4 (9.09 % de triclosán).

t (min)	t <sup>1/2</sup>	ln t	Mt (mg)	MUM <sub>t</sub> *100	Mt/M <sub>t</sub>	ln MUM <sub>t</sub>	1-R	ln (1-R)
5	2 2361	1 6094	11 5467	56 57	0 5657	-0 5697	0 4343	-0 8340
10	3 1623	2 3026	13 7263	67 25	0 6725	-0 3968	0 3275	-1 1162
15	3 8730	2 7081	14 8247	72 63	0 7263	-0 3198	0 2737	-1 2956
20	4 4721	2 9957	15 9166	77 98	0 7798	0 2488	0 2202	-1 5131
25	5 0000	3 2189	17 0688	83 62	0 8362	0 1789	0 1638	-1 8092
30	5 4772	3 4012	17 7993	87 20	0 8720	-0 1370	0 1280	-2 0558
40	6 3246	3 6889	18 5875	91 06	0 9106	-0 0936	0 0894	-2 4149
50	7 0711	3 9120	19 1048	93 60	0 9360	0 0662	0 0640	-2 7483
60	7 7460	4 0943	19 6505	96 27	0 9627	0 0380	0 0373	-3 2888
70	8 3666	4 2485	19 8950	97 47	0 9747	0 0257	0 0253	-3 6760
80	8 9443	4 3820	20 0773	98 36	0 9836	0 0165	0 0164	-4 1111
90	9 4868	4 4998	20 0181	98 07	0 9807	0 0195	0 0193	-3 9481
105	10 2470	4 6540	20 1685	98 81	0 9881	0 0120	0 0119	-4 4293
120	10 9545	4 7875	20 1393	98 66	0 9866	0 0134	0 0134	-4 3158
150	12 2474	5 0106	20 2296	99 11	0 9911	0 0090	0 0089	-4 7180
180	13 4164	5 1930	20 1698	98 81	0 9881	-0 0119	0 0119	-4 4345
210	14 4914	5 3471	20 2900	99 40	0 9940	-0 0060	0 0060	-5 1209
240	15 4919	5 4806	20 0194	98 08	0 9808	-0 0194	0 0192	-3 9514
270	16 4317	5 5984	20 0781	98 36	0 9836	-0 0165	0 0164	-4 1133
300	17 3205	5 7038	20 3196	99 55	0 9955	-0 0045	0 0045	-5 3991
330	18 1659	5 7991	20 3814	99 85	0 9985	-0 0015	0 0015	-6 5053
360	18 9737	5 8861	20 4119	100 00	1 0000	0 0000	0 0000	

## D) Resultados de la liberación de Triclosán en nanoesferas de PLGA Lote 5 (16.67 % de triclosán).

t (min)	t <sup>1/2</sup>	ln t	Mt (mg)	MUM <sub>t</sub> *100	Mt/M <sub>t</sub>	ln MUM <sub>t</sub>	1-R	ln (1-R)
5	2 2361	1 6094	5 4266	48 62	0 4862	-0 7210	0 5138	-0 6660
10	3 1623	2 3026	6 7556	60 53	0 6053	-0 5020	0 3947	-0 9297
15	3 8730	2 7081	7 6378	68 44	0 6844	-0 3792	0 3156	-1 1532
20	4 4721	2 9957	8 4873	76 05	0 7605	-0 2738	0 2395	-1 4292
25	5 0000	3 2189	8 9144	79 88	0 7988	0 2247	0 2012	-1 6033
30	5 4772	3 4012	9 3692	83 95	0 8395	-0 1749	0 1605	-1 8296
40	6 3246	3 6889	9 9749	89 38	0 8938	-0 1123	0 1062	-2 2424
50	7 0711	3 9120	10 1594	91 03	0 9103	0 0940	0 0897	-2 4116
60	7 7460	4 0943	10 6429	95 36	0 9536	-0 0475	0 0464	-3 0715
70	8 3666	4 2485	10 8267	97 01	0 9701	0 0303	0 0299	-3 5104
80	8 9443	4 3820	11 0087	98 64	0 9864	-0 0137	0 0136	-4 2994
90	9 4868	4 4998	11 0098	98 65	0 9865	0 0136	0 0135	-4 3067
105	10 2470	4 6540	11 1304	99 73	0 9973	-0 0027	0 0027	-5 9248
120	10 9545	4 7875	11 0105	98 66	0 9866	-0 0135	0 0134	-4 3115
150	12 2474	5 0106	10 9495	98 11	0 9811	0 0191	0 0189	-3 9696
180	13 4164	5 1930	11 1602	100 00	1 0000	0 0000	0 0000	
210	14 4914	5 3471	11 1011	99 47	0 9947	0 0053	0 0053	-5 2414
240	15 4919	5 4806	11 0706	99 20	0 9920	-0 0081	0 0080	-4 8251
270	16 4317	5 5984	10 7991	96 76	0 9676	0 0329	0 0324	-3 4310
300	17 3205	5 7038	11 0085	98 64	0 9864	0 0137	0 0136	-4 2983
330	18 1659	5 7991	11 1002	99 46	0 9946	-0 0054	0 0054	-5 2261
360	18 9737	5 8861	11 1309	99 74	0 9974	-0 0026	0 0026	-5 9431

## E) Resultados de la liberación de Triclosán en nanoesferas de PLGA. Lote 6 (23 08 % de triclosán).

t (min)	t <sup>1/2</sup>	ln t	Mt (mg)	MUM <sub>0,t</sub> *100	Mt/M <sub>∞</sub>	ln MUM <sub>0,t</sub>	1-R	ln (1-R)
5	2.2361	1.6094	7.7480	66.71	0.6671	-0.4048	0.3329	-1.1000
10	3.1623	2.3026	8.2769	71.27	0.7127	-0.3388	0.2873	-1.2471
15	3.8730	2.7081	9.0036	77.52	0.7752	-0.2546	0.2248	-1.4927
20	4.4721	2.9957	9.4300	81.19	0.8119	-0.2083	0.1881	-1.6710
25	5.0000	3.2189	9.8848	85.11	0.8511	-0.1612	0.1489	-1.9045
30	5.4772	3.4012	10.2192	87.99	0.8799	-0.1280	0.1201	-2.1193
40	6.3246	3.6889	10.9146	93.98	0.9398	-0.0621	0.0602	-2.8095
50	7.0711	3.9120	11.0695	95.31	0.9531	-0.0480	0.0469	-3.0598
60	7.7460	4.0943	11.1006	95.58	0.9558	-0.0452	0.0442	-3.1185
70	8.3666	4.2485	11.2214	96.62	0.9662	-0.0344	0.0338	-3.3866
80	8.9443	4.3820	11.3728	97.92	0.9792	-0.0210	0.0208	-3.8736
90	9.4868	4.4998	11.2531	96.89	0.9689	0.0316	0.0311	-3.4710
105	10.2470	4.6540	11.6142	100.00	1.0000	0.0000	0.0000	
120	10.9545	4.7875	11.2546	96.90	0.9690	0.0315	0.0310	-3.4750
150	12.2474	5.0106	11.5841	99.74	0.9974	0.0026	0.0026	-5.9543
180	13.4164	5.1930	11.4052	98.20	0.9820	0.0182	0.0180	-4.0174
210	14.4914	5.3471	11.4041	98.19	0.9819	0.0183	0.0181	-4.0123
240	15.4919	5.4806	11.3136	97.41	0.9741	-0.0262	0.0259	-3.6543
270	16.4317	5.5984	11.2829	97.15	0.9715	-0.0289	0.0285	-3.5571
300	17.3205	5.7038	11.3129	97.41	0.9741	0.0263	0.0259	-3.6519
330	18.1659	5.7991	11.2528	96.89	0.9689	-0.0316	0.0311	-3.4700
360	18.9737	5.8861	11.2826	97.14	0.9714	-0.0290	0.0286	-3.5560

## F) Resultados de la liberación de Triclosán en nanoesferas de PLGA. Lote 7 (33 33 % de triclosán).

t (min)	t <sup>1/2</sup>	ln t	Mt (mg)	MUM <sub>0,t</sub> *100	Mt/M <sub>∞</sub>	ln MUM <sub>0,t</sub>	1-R	ln (1-R)
5	2.2361	1.6094	10.5518	85.90	0.8590	-0.1520	0.1410	-1.9592
10	3.1623	2.3026	10.7056	87.15	0.8715	-0.1375	0.1285	-2.0522
15	3.8730	2.7081	10.8874	88.63	0.8863	-0.1206	0.1137	-2.1746
20	4.4721	2.9957	11.0090	89.63	0.8963	-0.1095	0.1037	-2.2658
25	5.0000	3.2189	11.1304	90.61	0.9061	-0.0986	0.0939	-2.3659
30	5.4772	3.4012	11.2215	91.36	0.9136	-0.0904	0.0864	-2.4482
40	6.3246	3.6889	11.4030	92.83	0.9283	-0.0744	0.0717	-2.6356
50	7.0711	3.9120	11.6452	94.80	0.9480	0.0534	0.0520	-2.9574
60	7.7460	4.0943	11.6769	95.06	0.9506	0.0506	0.0494	-3.0082
70	8.3666	4.2485	11.6167	94.57	0.9457	0.0558	0.0543	-2.9137
80	8.9443	4.3820	11.7068	95.31	0.9531	0.0481	0.0469	-3.0589
90	9.4868	4.4998	11.7677	95.80	0.9580	-0.0429	0.0420	-3.1704
105	10.2470	4.6540	11.8283	96.30	0.9630	-0.0378	0.0370	-3.2955
120	10.9545	4.7875	11.8588	96.54	0.9654	-0.0352	0.0346	-3.3649
150	12.2474	5.0106	11.9193	97.04	0.9704	0.0301	0.0296	-3.5186
180	13.4164	5.1930	12.0704	98.77	0.9827	-0.0175	0.0173	-4.0548
210	14.4914	5.3471	11.9206	97.05	0.9705	-0.0300	0.0295	-3.5221
240	15.4919	5.4806	11.9498	97.28	0.9728	-0.0275	0.0272	-3.6062
270	16.4317	5.5984	12.2515	99.74	0.9974	0.0026	0.0026	-5.9531
300	17.3205	5.7038	12.2834	100.00	1.0000	0.0000	0.0000	
330	18.1659	5.7991	12.2233	99.51	0.9951	-0.0049	0.0049	-5.3207
360	18.9737	5.8861	12.1928	99.26	0.9926	-0.0074	0.0074	-4.9099

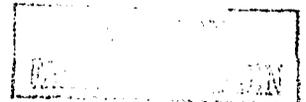


## G) Resultados de la liberación de Triclosán en nanoesferas de PLA. Lote 9 (1.23 % de triclosán).

t (min)	t <sup>1/2</sup>	ln t	Mt (mg)	MUM <sub>CL</sub> *100	MUM <sub>CL</sub>	ln MUM <sub>CL</sub>	1-R	ln (1-R)
5	2 2361	1 6094	5 5774	26 69	0 2669	-1 3209	0 7331	-0 3105
10	3 1623	2 3026	7 3293	35 07	0 3507	-1 0477	0 6493	-0 4319
15	3 8730	2 7081	8 9075	42 63	0 4263	-0 8527	0 5737	-0 5556
20	4 4721	2 9957	10 5148	50 32	0 5032	-0 6868	0 4968	-0 6995
25	5 0000	3 2189	11 5796	55 41	0 5541	-0 5903	0 4459	-0 8078
30	5 4772	3 4012	12 6713	60 64	0 6064	-0 5002	0 3936	-0 9324
40	6 3246	3 6889	15 6022	74 66	0 7466	-0 2922	0 2534	-1 3730
50	7 0711	3 9120	16 2228	77 63	0 7763	-0 2532	0 2237	-1 4976
60	7 7460	4 0943	18 0354	86 21	0 8631	-0 1472	0 1369	-1 9884
70	8 3666	4 2485	18 5588	88 81	0 8881	-0 1186	0 1119	-2 1904
80	8 9443	4 3820	19 0443	91 14	0 9114	-0 0928	0 0886	-2 4232
90	9 4868	4 4998	19 5296	93 46	0 9346	0 0677	0 0654	-2 7270
105	10 2470	4 6540	20 0450	95 93	0 9593	-0 0416	0 0407	-3 2003
120	10 9545	4 7875	20 4400	97 82	0 9782	0 0221	0 0218	-3 8238
150	12 2474	5 0106	20 8645	99 85	0 9985	0 0015	0 0015	-6 4805
180	13 4164	5 1930	20 5957	98 56	0 9856	-0 0145	0 0144	-4 2408
210	14 4914	5 3471	20 7750	99 42	0 9942	-0 0058	0 0058	-5 1470
240	15 4919	5 4806	20 8665	99 86	0 9986	-0 0014	0 0014	-6 5453
270	16 4317	5 5984	20 7464	99 28	0 9928	-0 0072	0 0072	-4 9362
300	17 3205	5 7038	20 8965	100 00	1 0000	0 0000	0 0000	
330	18 1659	5 7991	20 8069	99 57	0 9957	-0 0043	0 0043	-5 4521
360	18 9737	5 8861	20 8667	99 86	0 9986	-0 0014	0 0014	-6 5517

## H) Resultados de la liberación de Triclosán en nanoesferas de PLA. Lote 10 (4.76 % de triclosán).

t (min)	t <sup>1/2</sup>	ln t	Mt (mg)	MUM <sub>CL</sub> *100	MUM <sub>CL</sub>	ln MUM <sub>CL</sub>	1-R	ln (1-R)
5	2 2361	1 6094	11 0643	41 32	0 4132	-0 8839	0 5868	-0 5330
10	3 1623	2 3026	13 6933	51 13	0 5113	-0 6707	0 4887	-0 7161
15	3 8730	2 7081	16 9650	63 35	0 6335	-0 4565	0 3665	-1 0038
20	4 4721	2 9957	18 8237	70 29	0 7029	-0 3525	0 2971	-1 2137
25	5 0000	3 2189	20 5834	76 86	0 7686	-0 2632	0 2314	-1 4637
30	5 4772	3 4012	21 6793	80 95	0 8095	-0 2113	0 1905	-1 6583
40	6 3246	3 6889	23 5852	88 07	0 8807	-0 1270	0 1193	-2 1262
50	7 0711	3 9120	24 3805	91 04	0 9104	-0 0939	0 0896	-2 4125
60	7 7460	4 0943	25 0184	93 42	0 9342	-0 0680	0 0658	-2 7216
70	8 3666	4 2485	25 4443	95 01	0 9501	-0 0512	0 0499	-2 9984
80	8 9443	4 3820	25 5071	95 25	0 9525	-0 0487	0 0475	-3 0466
90	9 4868	4 4998	26 0502	97 28	0 9728	-0 0276	0 0272	-3 6030
105	10 2470	4 6540	25 9630	96 95	0 9695	-0 0310	0 0305	-3 4901
120	10 9545	4 7875	26 5051	98 97	0 9897	-0 0103	0 0103	-4 5802
150	12 2474	5 0106	26 7797	100 00	1 0000	0 0000	0 0000	
180	13 4164	5 1930	26 3593	98 43	0 9843	-0 0158	0 0157	-4 1542
210	14 4914	5 3471	26 6582	99 55	0 9955	-0 0045	0 0045	-5 3959
240	15 4919	5 4806	26 7203	99 78	0 9978	-0 0022	0 0022	-6 1117
270	16 4317	5 5984	26 6303	99 44	0 9944	-0 0056	0 0056	-5 1885
300	17 3205	5 7038	26 6900	99 67	0 9967	-0 0034	0 0033	-5 6992
330	18 1659	5 7991	26 7205	99 78	0 9978	-0 0022	0 0022	-6 1150
360	18 9737	5 8861	26 6906	99 67	0 9967	-0 0033	0 0033	-5 7052

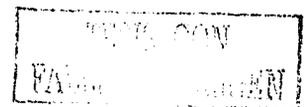


## I) Resultados de la liberación de Triclosán en nanoesferas de PLA. Lote 11 (9.09 % de triclosán).

t (min)	t <sup>1/2</sup>	ln t	Mt (mg)	Mt/M <sub>∞</sub> *100	Mt/M <sub>∞</sub>	ln Mt/M <sub>∞</sub>	1-R	ln (1-R)
5	2.2361	1.6094	16.4608	43.01	0.4301	-0.8437	0.5699	-0.5623
10	3.1623	2.3026	20.0869	52.48	0.5248	-0.6447	0.4752	-0.7441
15	3.8730	2.7081	22.0381	57.58	0.5758	-0.5520	0.4242	-0.8576
20	4.4721	2.9957	24.4617	63.91	0.6391	-0.4476	0.3609	-1.0193
25	5.0000	3.2189	26.7072	69.78	0.6978	-0.3598	0.3022	-1.1967
30	5.4772	3.4012	27.7758	72.57	0.7257	-0.3206	0.2743	-1.2937
40	6.3246	3.6889	29.8021	77.87	0.7787	-0.2501	0.2213	-1.5082
50	7.0711	3.9120	31.5930	82.55	0.8255	-0.1918	0.1745	-1.7457
60	7.7460	4.0943	32.4781	84.86	0.8486	-0.1642	0.1514	-1.8878
70	8.3666	4.2485	34.0812	89.05	0.8905	-0.1160	0.1095	-2.2117
80	8.9443	4.3820	34.6938	90.65	0.9065	-0.0982	0.0935	-2.3698
90	9.4868	4.4998	35.3909	92.47	0.9247	-0.0783	0.0753	-2.5864
105	10.2470	4.6540	36.0885	94.29	0.9429	-0.0588	0.0571	-2.8636
120	10.9545	4.7875	37.6001	98.24	0.9824	-0.0177	0.0176	-4.0417
150	12.2474	5.0106	37.0062	96.69	0.9669	0.0336	0.0331	-3.4087
180	13.4164	5.1930	37.8769	98.97	0.9897	-0.0104	0.0103	-4.5723
210	14.4914	5.3471	37.9726	99.22	0.9922	-0.0079	0.0078	-4.8492
240	15.4919	5.4806	38.2445	99.93	0.9993	-0.0007	0.0007	-7.2226
270	16.4317	5.5984	38.0652	99.46	0.9946	-0.0054	0.0054	-5.2188
300	17.3205	5.7038	37.6119	98.27	0.9827	-0.0174	0.0173	-4.0595
330	18.1659	5.7991	38.2724	100.00	1.0000	0.0000	0.0000	
360	18.9737	5.8861	38.2161	99.85	0.9985	-0.0015	0.0015	-6.5221

## J) Resultados de la liberación de Triclosán en nanoesferas de CAP. Lote 13 (1.23 % de triclosán)

t (min)	t <sup>1/2</sup>	ln t	Mt (mg)	Mt/M <sub>∞</sub> *100	Mt/M <sub>∞</sub>	ln Mt/M <sub>∞</sub>	1-R	ln (1-R)
5	2.2361	1.6094	18.3601	88.50	0.8850	-0.1221	0.1150	2.1632
10	3.1623	2.3026	19.1034	92.09	0.9209	-0.0824	0.0791	-2.5366
15	3.8730	2.7081	19.1983	92.54	0.9254	-0.0775	0.0746	-2.5962
20	4.4721	2.9957	19.3496	93.27	0.9327	-0.0696	0.0673	-2.6991
25	5.0000	3.2189	19.4711	93.86	0.9386	-0.0634	0.0614	-2.7902
30	5.4772	3.4012	19.6226	94.59	0.9459	-0.0556	0.0541	-2.9168
40	6.3246	3.6889	19.7742	95.32	0.9532	-0.0479	0.0468	-3.0620
50	7.0711	3.9120	19.9259	96.05	0.9605	-0.0403	0.0395	-3.2318
60	7.7460	4.0943	20.0172	96.49	0.9649	-0.0357	0.0351	-3.3501
70	8.3666	4.2485	20.0781	96.79	0.9679	-0.0327	0.0321	-3.4374
80	8.9443	4.3820	20.0181	96.50	0.9650	-0.0357	0.0350	-3.3513
90	9.4868	4.4998	20.1987	97.37	0.9737	-0.0267	0.0263	-3.6369
105	10.2470	4.6540	20.3806	98.24	0.9824	-0.0177	0.0176	-4.0419
120	10.9545	4.7875	20.2913	97.81	0.9781	0.0221	0.0219	-3.8226
150	12.2474	5.0106	20.2606	97.67	0.9767	0.0236	0.0233	-3.7572
180	13.4164	5.1930	20.4413	98.54	0.9854	-0.0147	0.0146	-4.2241
210	14.4914	5.3471	20.2012	97.38	0.9738	-0.0266	0.0262	-3.6415
240	15.4919	5.4806	20.3807	98.24	0.9824	-0.0177	0.0176	-4.0420
270	16.4317	5.5984	20.6531	99.56	0.9956	-0.0044	0.0044	-5.4191
300	17.3205	5.7038	20.6246	99.42	0.9942	-0.0058	0.0058	-5.1489
330	18.1659	5.7991	20.7450	100.00	1.0000	0.0000	0.0000	
360	18.9737	5.8861	20.5648	99.13	0.9913	-0.0087	0.0087	-4.7461



## K) Resultados de la liberación de Triclosán en nanoesferas de CAP. Lote 14 (4.76 % de triclosán).

t (min)	t <sup>1/2</sup>	ln t	Mt (mg)	MUM <sub>0</sub> *100	MUM <sub>t</sub>	ln MUM <sub>t</sub>	1-R	ln (1-R)
5	2.2361	1.6094	21.8573	84.68	0.8468	-0.1662	0.1532	-1.8763
10	3.1623	2.3026	22.8929	88.70	0.8870	-0.1200	0.1130	-2.1800
15	3.8730	2.7081	23.2910	90.24	0.9024	-0.1027	0.0976	-2.3268
20	4.4721	2.9957	23.7758	92.12	0.9212	-0.0821	0.0788	-2.5405
25	5.0000	3.2189	24.3214	94.23	0.9423	-0.0594	0.0577	-2.8526
30	5.4772	3.4012	24.6864	95.65	0.9565	0.0445	0.0435	-3.1339
40	6.3246	3.6889	25.1710	97.52	0.9752	0.0251	0.0248	-3.6979
50	7.0711	3.9120	25.3246	98.12	0.9812	0.0190	0.0188	-3.9727
60	7.7460	4.0943	25.3858	98.36	0.9836	0.0166	0.0164	-4.1074
70	8.3666	4.2485	25.5068	98.82	0.9882	-0.0118	0.0118	-4.4428
80	8.9443	4.3820	25.4774	98.71	0.9871	0.0130	0.0129	-4.3503
90	9.4868	4.4998	25.4169	98.48	0.9848	0.0154	0.0152	-4.1834
105	10.2470	4.6540	25.6276	99.29	0.9929	0.0071	0.0071	-4.9499
120	10.9545	4.7875	25.7494	99.76	0.9976	0.0024	0.0024	-6.0479
150	12.2474	5.0106	25.6899	99.53	0.9953	0.0047	0.0047	-5.3665
180	13.4164	5.1930	25.7498	99.77	0.9977	0.0024	0.0023	-6.0541
210	14.4914	5.3471	25.8104	100.90	1.0000	0.0000	0.0000	
240	15.4919	5.4806	25.7807	99.88	0.9988	0.0012	0.0012	-6.7661
270	16.4317	5.5984	25.6900	99.53	0.9953	-0.0047	0.0047	-5.3680
300	17.3205	5.7038	25.7196	99.65	0.9965	-0.0035	0.0035	-5.6504
330	18.1659	5.7991	25.6595	99.42	0.9942	-0.0059	0.0058	-5.1421
360	18.9737	5.8861	25.7496	99.76	0.9976	-0.0024	0.0024	-6.0511

## L) Resultados de la liberación de Triclosán en nanoesferas de CAP. Lote 15 (9.09 % de triclosán).

t (min)	t <sup>1/2</sup>	ln t	Mt (mg)	MUM <sub>0</sub> *100	MUM <sub>t</sub>	ln MUM <sub>t</sub>	1-R	ln (1-R)
5	2.2361	1.6094	20.0786	61.70	0.6170	-0.4829	0.3830	-0.9597
10	3.1623	2.3026	22.4601	69.02	0.6902	-0.3708	0.3098	-1.1717
15	3.8730	2.7081	24.4039	74.99	0.7499	-0.2878	0.2501	-1.3858
20	4.4721	2.9957	25.4104	78.08	0.7808	-0.2474	0.2192	-1.5178
25	5.0000	3.2189	26.6526	81.90	0.8190	-0.1997	0.1810	-1.7092
30	5.4772	3.4012	28.2277	86.74	0.8674	-0.1423	0.1326	-2.0203
40	6.3246	3.6889	29.7446	91.40	0.9140	-0.0899	0.0860	-2.4533
50	7.0711	3.9120	30.5677	93.93	0.9393	0.0626	0.0607	-2.8016
60	7.7460	4.0943	30.9344	95.06	0.9506	0.0507	0.0494	-3.0069
70	8.3666	4.2485	31.3586	96.36	0.9636	0.0371	0.0364	-3.3130
80	8.9443	4.3820	31.8134	97.76	0.9776	0.0227	0.0224	-3.7972
90	9.4868	4.4998	32.3286	99.34	0.9934	-0.0066	0.0066	-5.0204
105	10.2470	4.6540	32.4523	99.72	0.9972	-0.0078	0.0078	-5.8776
120	10.9545	4.7875	32.5435	100.00	1.0000	0.0000	0.0000	
150	12.2474	5.0106	32.0617	98.52	0.9852	0.0149	0.0148	-4.2128
180	13.4164	5.1930	32.0890	98.60	0.9860	0.0141	0.0140	-4.2710
210	14.4914	5.3471	32.3303	99.34	0.9934	-0.0066	0.0066	-5.0281
240	15.4919	5.4806	31.9398	98.15	0.9815	0.0187	0.0185	-3.9873
270	16.4317	5.5984	32.2390	99.06	0.9906	-0.0094	0.0094	-4.6715
300	17.3205	5.7038	32.0900	98.61	0.9861	0.0140	0.0139	-4.2734
330	18.1659	5.7991	32.2097	98.97	0.9897	-0.0103	0.0103	-4.5798
360	18.9737	5.8861	32.1803	98.88	0.9888	0.0112	0.0112	-4.4953

